

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA DURANTE A
INTERAÇÃO *Panagrellus sp* (NEMATÓIDE) E *Duddingtonia flagrans* (FUNGO
NEMATÓFAGO)**

DANIELA GUEDES DA CRUZ

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
MARÇO / 2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA DURANTE A
INTERAÇÃO *Panagrellus sp* (NEMATÓIDE) E *Duddingtonia flagrans* (FUNGO
NEMATÓFAGO)**

DANIELA GUEDES DA CRUZ

**Dissertação apresentada ao
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestrado
em Biociências e Biotecnologia,
área de concentração Biologia
Celular.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLÓVIS DE PAULA SANTOS

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS PERES SILVA

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

MARÇO / 2007

***Dedico esta Dissertação de Tese de
Mestrado aos meus Pais Antonio e Sueli,
a Irmã Camila e ao namorado Alexandre.***

AGRADECIMENTOS

Ao professor, Doutor Clóvis de Paula Santos, minha gratidão pela oportunidade proporcionada e pela dedicação ao processo educacional, coroado de êxito e generosidade na prática de conduzir, incentivar e orientar qual caminho a seguir, contribuindo sobremaneira com a minha formação.

Ao professor, Doutor Carlos Peres Silva, pela generosidade em aceitar me co-orientar e compartilhar comigo suas idéias e experiências.

Ao professor, Claudio Andrés Retamal Martínez, pela colaboração nas análises densitométricas.

Ao corpo docente desta universidade, agradeço pelos seus conhecimentos passados a mim através das disciplinas cursadas, pelo convívio e orientações extraclasse.

A UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em especial ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) e Laboratório de Química e Função de proteínas e Peptídeos (LQFPP) por me disponibilizar à utilização dos seus recursos físicos e materiais, como laboratórios, bibliotecas e o campus em geral para a minha formação profissional.

Aos técnicos do LBCT: Sérgio, Adriana, Beatriz e Giovana e aos técnicos do LQFPP: Isabela e Cristóvão, que contribuírem para o bom andamento deste trabalho.

Aos amigos Cíntia, João, Douglas, Sheila Márcia pela contribuição durante o trabalho experimental.

Aos amigos do laboratório, Rudymilla, Sabrina, Letícia, Indiara e Phillipe pela ajuda e pelos momentos divertidos.

Aos grandes amigos, Fábio, Patrícia, Lara, Elane e Flávia, pela amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração.

SUMÁRIO

ÍNDICE DAS FIGURAS	9
ÍNDICE DAS TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15I
I - INTRODUÇÃO	17
II – REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 - Ovino-caprinocultura	19

2.6 – Processo de infecção dos fungos nematófagos	33
2.7 - Enzimas envolvidas no processo de infecção	34
III – OBJETIVOS	37
IV– MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 - Nematóides de Vida livre	38
4.2 - Manutenção do isolado de <i>Duddingtonia flagrans</i>	38
4.3 – Preparação do Extrato Bruto	39
4.3.1 - Produção de <i>D. flagrans</i> e <i>Panagrellus sp</i> em meio líquido.	39
4.3.2 - Produção das interações fungo-nematóide em meio líquido.	39
4.4- Determinação de Atividades Enzimáticas	40
4.4.1 - Atividade de Fosfatase Ácida Através da Utilização de Substrato Fluorogênico.	40
4.4.2 – Atividade de Fosfatase Ácida por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	42
4.4.3 - Atividade de Fosfatase Ácida Através de Ensaio Enzimáticos	43
4.5- Cromatografias	44
4.5.1 – Cromatografia de troca iônica	44
4.5.2 – Cromatografia de interação hidrofóbica	45
4.6 - Determinação de parâmetros cinéticos	45
V – RESULTADOS	46
5.1 – Análise da atividade fosfatase ácida com substrato fluorogênico	46
5.2 - Atividades enzimáticas	51
5.3 – Atividade <i>in gel</i>	53
5.4- Isolamento da atividade enzimática de fosfatase ácida por cromatografia	55
VI - DISCUSSÃO	58

VII - CONCLUSÕES	61
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida dos nematóides trichostrongilídeos, parasitas do trato gastrintestinal de ruminantes.	20
Figura 2. Fungo ovicida <i>Verticillium chlamydosporium</i>	27
Figura 3. Fungo endoparasita <i>Harposporium anguillulae</i>	29
Figura 4. Fungo predador de nematóides <i>Arthrobotrys oligospora</i>	30
Figura 5. Órgãos de captura dos fungos nematófagos predadores	32
Figura 6. Representação das lâminas para a determinação de fosfatase ácida em <i>D. flagrans</i> , <i>Panagrellus sp</i> e durante o processo de interação <i>D. flagrans</i> x <i>Panagrellus sp</i> cultivados em lâminas contendo ágar-água observadas no transiluminador de luz U.V	41
Figura 7. Representação dos cortes para a determinação de fosfatase ácida em <i>D. flagrans</i> , <i>Panagrellus sp</i> e durante o processo de interação <i>D. flagrans</i> x <i>Panagrellus sp</i> cultivados em placa de Petri contendo ágar-água observados no transiluminador de luz U.V.	42
Figura 8 Determinação da atividade de fosfatase ácida em Lâminas contendo meio de cultivo e substrato fluorogênico.	47

Figura 9. Determinação da atividade de fosfatase ácida em cortes do meio de cultivo na presença ou ausência do substrato fluorogênico. **48**

Figura 10. Resultado das análises das lâminas por densitometria do produto fluorescente a partir da hidrólise do substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato em luz U.V de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e Interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* através da utilização do programa “Gel Perfect” . **49**

Figura 11. Resultado das análises dos cortes por densitometria do produto fluorescente a partir da hidrólise do substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato em luz U.V de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e Interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* através da utilização do programa “Gel Perfect” . **50**

Figura 12. Determinação de pH ótimo da atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans*, *Panagrellus sp*, interação fungo-nematóide e interação fungo-nematóide após prévia interação de 24h. **52**

Figura 13. Determinação da atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans*, *Panagrellus sp*, interação fungo-nematóide e interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h por eletroforese em gel de poliacrilamida. **54**

Figura 14. Determinação da atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans*, *Panagrellus sp*, interação fungo-nematóide e interação fungo-nematóide após prévia interação de 24h foram determinadas por cromatografia de troca iônica. **56**

Figura 15. - Determinação da atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans* e interação fungo-nematóide após prévia interação de 24h foram determinadas por cromatografia de interação hidrofóbica. **57**

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Tampões usados para a determinação do pH ótimo da atividade de fosfatase ácida no fungo nematófago *D. flagrans*, nematóide de vida livre *Panagrellus sp* e nas interações.

44

LISTA DE ABREVIATURAS

Larvas de Primeiro Estádio	L₁
Larvas de Segundo Estádio	L₂
Larva Infectante	L₃
p-nitrofenol fosfato	p-NP
Dodecil Sulfato de Sódio	SDS
Mili unidades	mU

RESUMO

O fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* tem sido investigado nos últimos 15 anos como um método de controle para os nematóides gastrintestinais dos pequenos ruminantes. Estes fungos aprisionam e infectam o nematóide através da penetração da cutícula, imobilização e finalmente a digestão dos conteúdos internos. Esta seqüência de eventos tem sido sugerida devido à combinação de atividades físicas e químicas. Este trabalho teve como objetivo, verificar e determinar a atividade da fosfatase ácida durante o processo de infecção do fungo nematófago *D. flagrans* quando aprisiona o nematóide *Panagrellus sp.* Quatro amostras diferentes foram utilizadas para as análises: o isolado *D. flagrans*, o nematóide *Panagrellus sp.*, a interação fungo-nematóide e a interação entre o nematóide com o fungo em placa de Petri contendo o meio de cultivo ágar-sabouraund durante 24h. Cada amostra foi inoculada em Erlenmeyer contendo meio líquido e posteriormente, incubadas a 30° C durante 48h sob agitação de 90 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas, centrifugadas a 10.000 xg, 4°C por 30 minutos, dialisadas contra água destilada por 48h e armazenadas no freeze -70°C. O meio de cultivo ágar-água inoculado somente com o fungo, ou somente com os nematóides, ou somente com uma combinação de fungos e nematóides, foram adicionados com o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato e visualizados utilizando luz U.V em diferentes períodos de tempo. Foi detectada através de SDS-PAGE 7,5 % e cromatografia de troca iônica seguida da cromatografia de interação hidrofóbica a atividade de uma fosfatase ácida em *D. flagrans* com pH ótimo de 5,4, duas no nematóide com pH ótimo de 2,2 e 5,4, três na interação fungo-nematóide e duas na interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h ambos com pHs ótimos de 2,2 e 5,4. O estudo com o substrato fluorogênico demonstrou que a atividade máxima de

fosfatase ácida no fungo, no nematóide e na interação ocorre com 70 minutos de incubação e a atividade desta enzima durante o processo de interação fungo-nematóide foi 20 % maior quando comparada com a atividade do fungo e do nematóide isoladamente. Estes resultados sugerem que a atividade de fosfatase ácida pode estar envolvida durante a interação fungo-nematóide.

Palavras-chaves: Fosfatase ácida; *Duddingtonia flagrans*; *Panagrellus sp*; Interação fungo-nematóide.

ABSTRACT

The use of *Duddingtonia flagrans*, a nematode-trapping fungus, has been investigated during the last 15 years as a control method for gastrointestinal nematodes of livestock animals. These fungi capture and infect the nematode by cuticle penetration, immobilization and finally digestion the internal contents. This sequence of events has been suggested to occur by a combination of physical and chemical activities. This report aims, to verify and determine the activity of acid phosphatase during the infection process of nematophagous fungus *D. flagrans* when attaching the nematode *Panagrellus sp.* Four different samples were used for the analysis: the isolate *D. flagrans*, the nematode *Panagrellus sp.*, the fungus-nematode interaction and a 24 h interaction of the nematode with fungi in Petri dish on an agar-sabouraud medium. Each sample was inoculated in an Erlenmeyer's containing liquid medium and incubated at 30°C, for 48 h on a rotary shaker (90 rpm). Samples were filtered, centrifuged at 10.000 xg, 4°C for 30 min and dialyzed against distilled water for 48 h and stored in the freeze -70°C. The growing medium water agar inoculated only with the fungus, or only with the nematodes or only with a combination of the fungus and nematodes, was added with the fluorogenic substract 4-methylumbelliferyl phosphate and vizualized using U.V light during different time periods. It was detected by 7.5 % SDS-PAGE and ion-exchange chromatography followed by hydrophobic interaction chromatography the activity of one acid phosphatase from *D. flagrans* with pH optimun of 5.4, two acid phosphatases from the nematode with pH optima of 2.2 and 5.4, three acid phosphatases from the fungus-nematode interaction and two from fungus-nematode interaction after a previous interaction of 24 h, with pH optima of 2.2 and 5.4. The experiment with fluorogenic substract showed that maximun phosphatase acid activity of

the fungus, nematode, and of the interaction fungus-nematode occur with 70 minutes, and the activity of this enzyme during fungus-nematode interaction process was 20 % more when comparison with the activity of *D. flagrans* and *Panagrellus sp* individually. These results suggest that phosphatase acid activit

I – INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, as helmintíases gastrintestinais ocupam lugar de destaque e entre os helmintos, destacam-se os nematóides (MACRAE, 1993). O parasitismo por nematóides gastrintestinais limita a produção dos pequenos ruminantes nos trópicos e sub-trópicos (FAO, 1998). Os prejuízos estão relacionados ao retardo na produção, custos com tratamentos profiláticos e curativos e em casos extremos, a morte dos animais. (ARAÚJO et al., 2004).

O controle dos nematóides gastrintestinais, visando à diminuição da quantidade de larvas infectantes nas pastagens é obtido através das aplicações anti-helmínticas, pertencentes a diversos grupos químicos, na maioria das vezes, administrados sem levar em consideração os fatores epidemiológicos da região, os quais, interferem diretamente na população parasitária ambiental e, conseqüentemente, na reinfecção do rebanho (EMBRAPA, 2004).

Nas últimas décadas, estratégias de controle se baseiam em aplicação de anti-helmínticos em épocas em que as condições ambientais são desfavoráveis ao desenvolvimento dos nematóides. Apesar destas estratégias serem eficientes, apresentam problemas tais como, aparecimento de resistência anti-helmíntica que é considerada um dos principais entraves para o sucesso dos programas estratégicos de controle de verminose, além de resíduos dos compostos químicos nos alimentos e a ecotoxicidade de alguns compostos. Esses problemas têm impulsionado o desenvolvimento de estudos que visem à busca de alternativas complementares aos

métodos tradicionais, que sejam de baixo custo e menos prejudiciais à saúde humana e ao equilíbrio ambiental. Entre as alternativas, está o uso de fungos nematófagos como agente biológico no controle das fases de vida livre dos nematóides gastrintestinais (PADILHA, 1996b).

Os fungos nematófagos compreendem um grupo bastante peculiar de microrganismos com capacidade de infectar e se alimentar de nematóides (BARRON, 1977). Durante o processo de infecção ocorre a penetração da cutícula, imobilização e finalmente a digestão dos conteúdos internos dos nematóides. Esta seqüência de eventos tem sido sugerida devido à combinação de atividades físicas e químicas como enzimas hidrolíticas (WANG et al., 2006).

Arthrobotrys oligospora e *Duddingtonia flagrans* são as espécies mais estudadas entre os fungos nematófagos. Estas têm demonstrado potencial como agente controlador da fase não parasitária dos nematóides gastrintestinais. Estudos caracterizando aspectos da biologia destes fungos têm permitido o estabelecimento de conhecimentos importantes como habilidade dos fungos em reduzir o nível de larvas através da atividade predatória em cultivos fecais, bolos fecais e pastagens (GRONVOLD et al., 1993; LARSEN, 1999; 2000; 2006).

Apesar da intensificação de estudos com *D. flagrans* nos últimos anos, pouco tem sido feito em relação a aspectos ultra-estruturais e bioquímicos do processo de infecção deste fungo. Assim, estudos verificando estes aspectos em *D. flagrans* seriam importantes para o conhecimento das interações fungo-nematóide.

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Ovino-caprinocultura

A ovino-caprinocultura é uma atividade em expansão no mercado nacional e internacional. Os rebanhos mundiais de caprinos e ovinos são de aproximadamente 898.132 milhões de cabeças. O Brasil detém atualmente o título de oitavo produtor mundial com rebanhos que, somados, representam 32 milhões de cabeças, sendo 37 % de caprinos e 63 % de ovinos (PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, 2002).

2.2 - Nematodioses gastrintestinais e ciclo de vida

A verminose é o principal problema sanitário da criação de pequenos ruminantes no Brasil. Antes da domesticação, o equilíbrio entre parasitas e hospedeiros permitia a tolerância dos animais a essa enfermidade. Com a domesticação, e conseqüente aumento no número de animais por área, alterou este equilíbrio, em favor dos parasitas, sendo as helmintoses gastrintestinais, especialmente aquelas causadas pelos nematóides, as mais numerosas, amplamente distribuídas e prejudiciais. Os vermes mais patogênicos e que causam maior mortalidade nos rebanhos pertencem à família Trichostrongylidae (ACCOBA, 2005).

Os nematóides gastrintestinais provocam diferentes patologias que interferem no ganho de peso, ingestão de alimentos e utilização de matéria seca, retardo na idade reprodutiva, decréscimo na capacidade reprodutiva, tristeza e isolamento do rebanho, pêlos arrepiados e sem brilho, as mucosas dos olhos sem cor, diarréia (ACCOBA,

2005) e mortalidade em animais seriamente afetados. De forma, a minimizar seu impacto na produção, medidas preventivas e ou curativas são empregadas constantemente (CHARLES, 1992).

O ciclo de vida dos nematóides trichostrongilídeos envolve uma fase de vida livre e uma parasitária. A fase de vida livre é caracterizada pelo desenvolvimento dos ovos até larvas infectantes e ocorrem nas pastagens. A fase parasitária ocorre durante o desenvolvimento das larvas infectantes ingeridas pelos animais até se tornarem adultos e produzirem ovos (Figura 1).

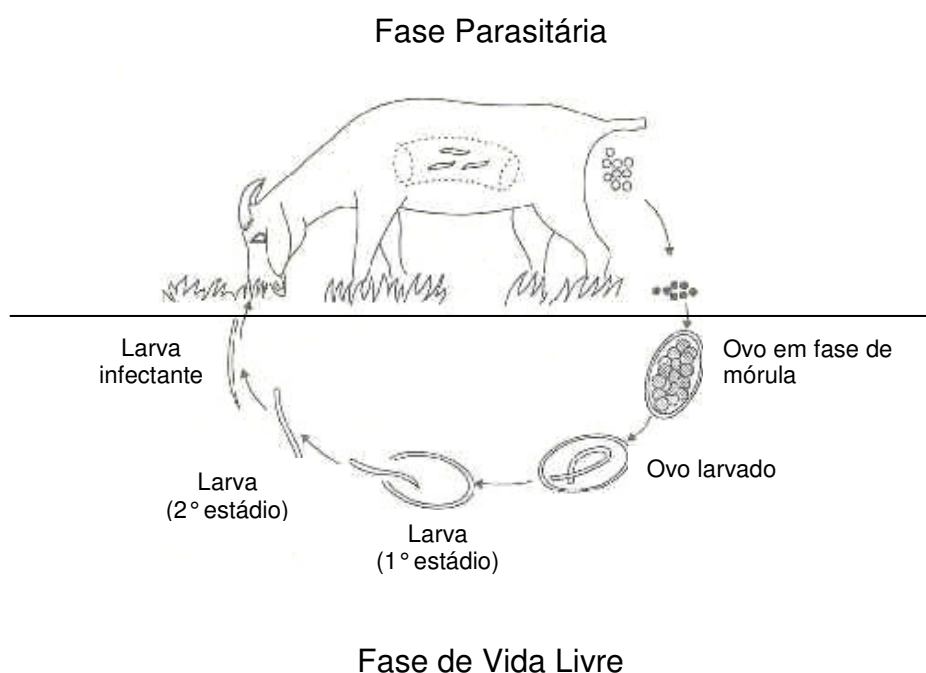


Figura 1. Ciclo de Vida dos nematóides trichostrongilídeos, parasitas do trato gastrointestinal de ruminantes. A fase de vida livre é caracterizada pelo desenvolvimento dos ovos até larvas infectantes. A fase parasitária ocorre durante o desenvolvimento das larvas infectantes até se tornarem adultos e produzirem ovos (EMBRAPA, 2003).

A fase de vida livre inicia-se com a eliminação dos ovos juntamente com as fezes dos animais contaminados. No exterior, em presença de oxigênio, temperatura

adequada e umidade, uma larva se desenvolve dentro do ovo e é liberada após a eclosão. A larva L₁ cresce, sofre uma muda, torna-se L₂ e, em seguida, sofre outra muda originando a larva infectante (L₃) quando, então, migra do interior do bolo fecal para as pastagens ao redor. A evolução da larva desde o ovo até a fase infectante ocorre geralmente em cinco a sete dias.

A larva infectante, após ser ingerida com a pastagem, prossegue o seu desenvolvimento nos animais, atingindo o estágio adulto em cerca de 21-28 dias na maioria das espécies. Ao alcançarem a luz estomacal sofrem muda tornando-se larva de quarto estágio ou adulto imaturo, em seguida as larvas se locomovem para o intestino delgado onde aumentam de tamanho, diferenciam seus órgãos sexuais e se tornam adultas. Após o amadurecimento sexual os nematóides realizam a cópula e as fêmeas iniciam a postura dos ovos que são liberados juntamente com as fezes.

Durante o desenvolvimento no meio ambiente, os ovos e estádios larvares são submetidos ao efeito de fatores abióticos, como temperatura, umidade, tensão de oxigênio, assim como fatores bióticos como ácaros, bactérias, fungos, vírus e outros agentes. Para que haja continuidade do ciclo biológico, os estádios de vida livre necessitam superar as barreiras causadas por esses fatores, que influenciam o desenvolvimento e sobrevivência desses estádios no meio ambiente. Na busca de alternativas para o controle da verminose dos ruminantes, a identificação dos inimigos naturais das fases de vida livre pode permitir o seu uso, juntamente com outras medidas, para redução da contaminação das pastagens e conseqüentemente da população de vermes nos animais em pastoreio (PADILHA & GIVES, 1996).

2.3 – Controle dos nematóides gastrintestinais

Diversas estratégias têm sido estudadas no sentido de promover métodos que auxiliem no controle dos nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Desta forma, o controle integrado de parasitos que é a adoção combinada de métodos de utilização de anti-helmínticos com métodos que não utilizem estes produtos, com a finalidade de manter níveis aceitáveis de infecção em animais de produção vem sendo cada vez mais difundido. Com relação à aplicação do controle integrado de parasitos,

diversas estratégias de controle vêm sendo estudadas na tentativa de contribuir com a diminuição da contaminação dos animais e pastos, e entre as quais podemos citar: seleção de animais resistentes, vacinas, fitoterapia, método FAMACHA e controle biológico (VASCONCELOS, 2007).

2.3.1 - Controle Biológico dos nematóides gastrintestinais

Os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade aos anti-helmínticos enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle biológico. O termo controle biológico se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir a um limiar sub-clínico e economicamente aceitável a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola (GRØNVOLD et al., 1996). Na prática, o controle biológico não atua como o controle químico sobre estágios internos de parasitos; contudo, concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais. Além disso, causam menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (MOTA et al., 2003).

Vários trabalhos têm mostrado que não é suficiente descobrir e isolar fungos predadores de nematóides. A idéia principal do controle biológico destes parasitos é de fazer uma redução preventiva das larvas infectantes nas pastagens, por isso é necessário que o candidato ao controle biológico sobreviva à passagem do trato gastrointestinal dos animais. Nas fezes, esses fungos, são capazes de germinar, crescer, produzir armadilhas e assim matar as larvas (LARSEN, 1999).

Fungos nematófagos, como outros fungos patogênicos, precisam penetrar as barreiras extracelulares presentes no hospedeiro. Deste modo, a cutícula dos nematóides adultos desempenha um importante papel na prevenção da infecção dos fungos nematófagos. A cutícula dos nematóides adultos, camada não celular secretada pela hipoderme, consiste principalmente de proteínas e fibras diagonais (HUANG et al., 2004).

O processo de infecção dos fungos nematófagos é gerado através da aderência

e aprisionamento dos nematóides seguido de penetração, imobilização e finalmente a digestão dos mesmos (YANG et al., 2005). A penetração da cutícula dos nematóides tem sido sugerida devido à combinação da atividade mecânica e enzimas hidrolíticas (WANG et al., 2006).

Duddingtonia flagrans, fungo predador, que produz uma rede adesiva tri-dimensional (PARAUD et al., 2005) é a espécie mais estudada, desde a década de 90, no controle das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos. Pode ser isolada de fezes frescas de ovinos, produz abundantes clamidósporos intercalados cercado de paredes espessas, que é responsável pela sobrevivência durante a passagem através do intestino de ruminantes seguido de uma administração oral (SANYAL, 2000a).

A vantagem para a utilização desse fungo, é que apresentam resistência à passagem pelo trato digestivo dos animais, gerando assim uma característica importante devido à praticidade de utilização no biocontrole. Assim, o fungo seria empregado via oral e após passagem pelo trato digestivo, se desenvolveria nas fezes juntamente com as larvas podendo então atingi-las e como consequência ocasionando a redução destas no bolo fecal.

2.4 – Histórico

A primeira citação de um fungo agindo sobre os nematóides, foi no século XIX. Os primeiros registros foram feitos por LOHDE em 1874 com o fungo endoparásita *Harposporium anguillulae* e posteriormente com ZOPH em 1888, o qual fez as primeiras observações da captura de um nematóide vivo através do fungo *Arthrobotrys oligospora* (PANDEY, 1973).

O conceito de fungos como agentes de controle biológico contra nematóides não é novo. LINFORD e colaboradores, no Havaí em 1930, realizaram alguns experimentos com controle de nematóides parasitas de abacaxi (apud CASWELL, 1989). Inspirado nesses experimentos, um grupo de cientistas da França, entre as décadas de 30 e 40 utilizaram fungos nematófagos predadores visando-os como possíveis agentes de controle dos nematóides parasitas (LARSEN et al., 1997).

Os primeiros experimentos *in vitro* estudaram a atividade de quatro fungos predadores em larvas de diferentes espécies de nematóides de animais DESCAZEUX (1939). Visando uma utilização prática, DESCHIENS (1939) e DESCHIENS & LAMY (1943) desenvolveram métodos de cultivo, armazenagem e secagem de esporos desses fungos.

ROUBAUD & DESCHIENS (1941), em testes *in vivo*, semearam os fungos *A. oligospora* e *Dactylella ellipsospora* em uma área de 25 m², contendo dois caprinos. Verificaram que houve uma redução da carga parasitária, uma vez que diminui a infestação da pastagem, de duas espécies de nematóides, *Strongyloides papillosus* e *Bunostomum sp.*

Posteriormente, trabalhos esporádicos foram desenvolvidos até meados da década de 80, quando uma série de trabalhos foi publicado por pesquisadores dinamarqueses (revisados por GRØNVOLD et al., 1993) utilizando a espécie *A. oligospora* (isolado ATCC 24927) originalmente obtido em um jardim da Suécia. Uma valorosa contribuição foi dada desde então pelos achados dos dinamarqueses que despertaram e incentivaram a retomada dos estudos com estes fungos em vários países.

No Brasil, as pesquisas tiveram início na década passada com dois grupos de Minas Gerais, um da Universidade Federal de Viçosa - UFV e outro da Embrapa Gado de Leite. O grupo de Viçosa demonstrou que *Monacrosporium ellipsosporum* e *Arthrobotrys* spp foram eficazes no controle de larvas de *Haemonchus placei* em condições laboratoriais, e que havia variações na capacidade predatória de diferentes isolados dentro da mesma espécie de *Arthrobotrys* (ARAÚJO et al., 1992, 1993). O grupo da Embrapa demonstrou que a eficácia de um isolado de *A. oligospora* para reduzir larvas infectantes de nematóides Cyathostomineos era dependente da dose de esporo contida nas fezes, e que o mesmo isolado, quando comparado a *Duddingtonia flagrans*, apreendia número maior de larvas infectantes de nematóides trichostrongilídeos em menor tempo e com menor número de esporos (CHARLES et al., 1993a;1993b).

2.5 - Caracterização dos fungos nematófagos

De acordo com a morfologia do fungo nematófago *D. flagrans*, este foi identificado como pertencer ao Reino Fungi, Filo Eumycota, Subfilo Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Ordem Hyphomycetales, Família Moniliaceae, Gênero *Duddingtonia* e Espécie *D. flagrans* (Duddington) Cooke, 1969 (SILVEIRA, 1995; RUBNER, 1996).

Os fungos nematófagos constituem um grupo de microrganismos com grande capacidade de multiplicação no ambiente onde colonizam e vivem na matéria orgânica do solo. São predominantemente cosmopolitas, sendo que poucas espécies estão restritas geograficamente (GRAY, 1983). Ocorrem em diferentes substratos podendo ser isolados do solo de florestas, terras cultivadas, pastagens permanentes e temporárias, vegetação em decomposição, vegetação costeira, esterco, etc.

Estes fungos são assim chamados devido a sua capacidade de infectar e se alimentar de nematóides, através do desenvolvimento de órgãos especializados na captura e destruição dos nematóides (BARRON, 1977). De acordo com a sua atividade, eles podem ser divididos em três grupos: os ovicidas que atuam em ovos, os endoparasitas que atuam em larvas e adultos e os predadores que atuam nas larvas de vida livre (BARRON, 1977).

Os fungos ovicidas são hábeis para atacar os estágios de ovo, especialmente os contidos em cistos e nódulos localizados nas raízes de plantas. A penetração e colonização de um fungo ovicida, *Verticillium chlamidosporium*, foram estudadas em ovos de *Ascaris lumbricoides*, através da microscopia eletrônica (LYSEK & KRAJCI, 1987; LYSEK & STERBA, 1991). Segundo os autores, o fungo ovicida forma uma rede abundante de ramificações miceliais nas proximidades dos ovos. Contudo, as cascas dos ovos são penetradas por adesão somente por algumas hifas sem que qualquer estrutura de penetração especializada seja produzida. Durante a penetração, o complexo quitina-proteína da casca do ovo é danificado, pela ação de enzimas. Após a penetração, a hifa cresce rapidamente entre as estruturas da casca do ovo e a superfície da larva em desenvolvimento. Em seguida, coloniza a larva, ocasionando

mortalidade (Figura 2). Contudo, em trabalho mais recente com ovos de *Meloidogyne javanica*, um nematóide que parasita plantas, demonstrou-se, na realidade, que existe a formação de apressório, uma estrutura de penetração, em superfícies hidrofóbicas, e a participação da enzima protease nos eventos iniciais que antecedem à penetração do fungo (LOPEZ-LLORCA et al., 2002).

Embora os fungos ovicidas tenham um papel na destruição de ovos de nematóides no ambiente, os ovos de nematóides trichostrongilídeos se desenvolvem rapidamente após a deposição do bolo fecal nas pastagens (menos de 24 horas), e podem, portanto, limitar a atuação dos fungos que se utilizam desta estratégia. Entretanto, seu uso poderia ser de interesse sobre ovos de outros helmintos, tais como os do gênero *Ascaris*, que necessitam permanecer longo tempo no ambiente até completar o seu desenvolvimento embrionário (LÝSEK & KRAJŠÍ, 1987, ARAÚJO et al., 1995).

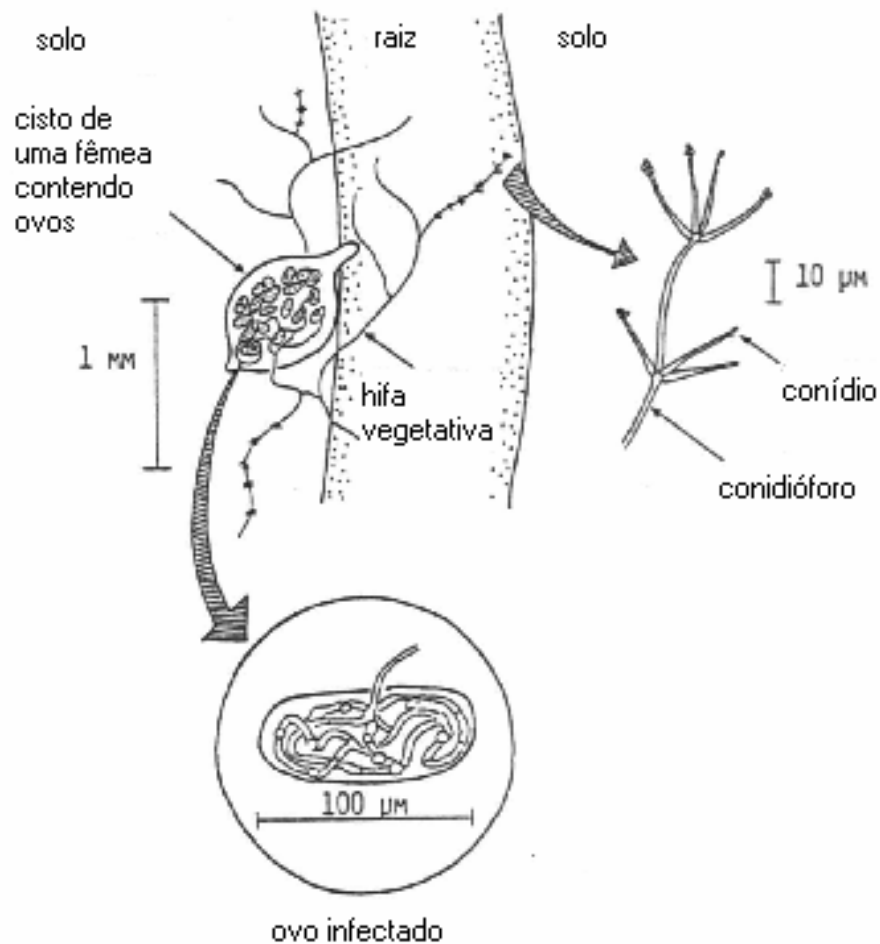


Figura 2 – Representação esquemática do fungo ovidador *Verticillium chlamydosporium*, parasita de cistos de nematóides que se fixam às raízes. As fêmeas mortas, isto é, o cisto repleto de ovos, se fixa na raiz. E alguns desses ovos foram infectados pela hifa vegetativa, que penetra a parede cística e em seguida a casca do ovo. Nota-se também representado um conidióforo com seu conídio (FAO, 1998).

Os fungos endoparasitas atuam em larvas e adultos através da ação de conídios que podem ser adesivos ou que necessitam ser ingerido pelo hospedeiro. Após germinação e penetração, via a cutícula ou o esôfago, ocorre o desenvolvimento rápido

através de hifas assimilativas no interior do hospedeiro, produzindo, posteriormente, grandes quantidades de conídios (BARRON, 1977; GRØNVOLD et al., 1993b).

Neste grupo de fungos, não existe o desenvolvimento hifal externo, exceto no caso de hifas férteis, os conidióforos e os tubos de evacuação, que irão liberar posteriormente os esporos. Assim, os fungos persistem no solo através destes conídios.

Harposporium anguillulae, é um endoparasita que produz uma grande quantidade de pequenos conídios em forma de meia-lua. Para infectar os nematóides, os conídios têm que ser ingeridos pelo nematóide, quando este está se alimentando de bactérias ou pequenas partículas orgânicas. Os conídios, devido ao seu formato, geralmente se alojam na porção anterior do canal alimentar dos nematóides onde germinam, originam hifas que se apresentam septadas e assim conseguem invadir os tecidos dos nematóides, destruindo os órgãos internos. O crescimento do fungo no hospedeiro se dá de dentro para fora, e é durante este crescimento que tem a formação dos conidióforos. Estes conidióforos rompem a cutícula do nematóide e chegam ao exterior. Uma vez no exterior, várias células conidiogênicas esféricas são produzidas. *H. anguillulae* também produz clamidósporos, geralmente após a conidiogênese, quando parte da hifa assimilativa desenvolvem clamidósporos de paredes espessas com a capacidade de produzir conidióforos secundariamente (CHARLES et al., 1996) (Figura 3).

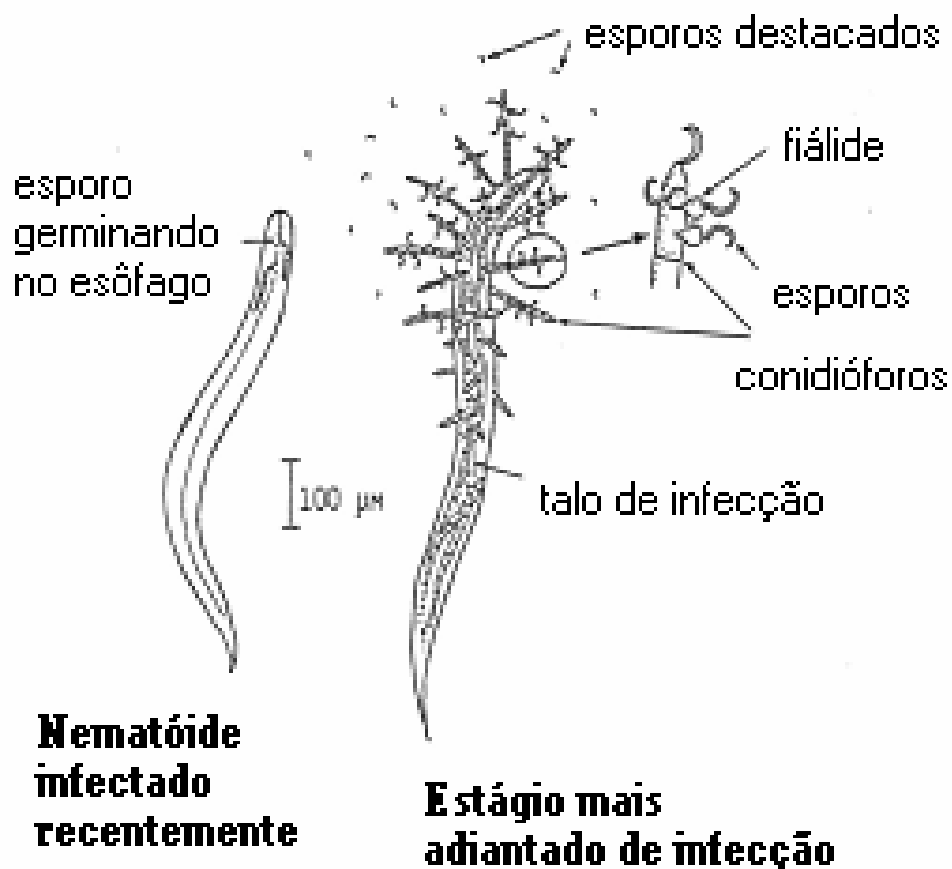


Figura 3 – Representação esquemática do fungo endoparasita *Harposporium anguillulae*. Os nematóides são infectados quando consomem esporos na forma de meia-lua. Estes esporos alojam-se no tecido muscular do esôfago, quando estão sendo engolidos. Os esporos germinam e formam o tubo germinativo que penetra no músculo do esôfago e em seguida passa para a cavidade corpórea. No interior do hospedeiro, o fungo desenvolve talos infectivos. E nos primeiros estágios da infecção, liberam pequenos conidióforos em numerosos pontos da cutícula do nematóide. (FAO, 1998).

Os fungos predadores atuam através da formação de estruturas, ao longo da hifa, especializadas em capturar os nematóides. Quando estabelecidos, têm extensivo desenvolvimento micelial no substrato. Estes são capazes de capturar os nematóides por especializações das hifas em forma de armadilhas (GRAY, 1987). O

aprisionamento por armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide. No interior do nematóide, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos (Figura 4).

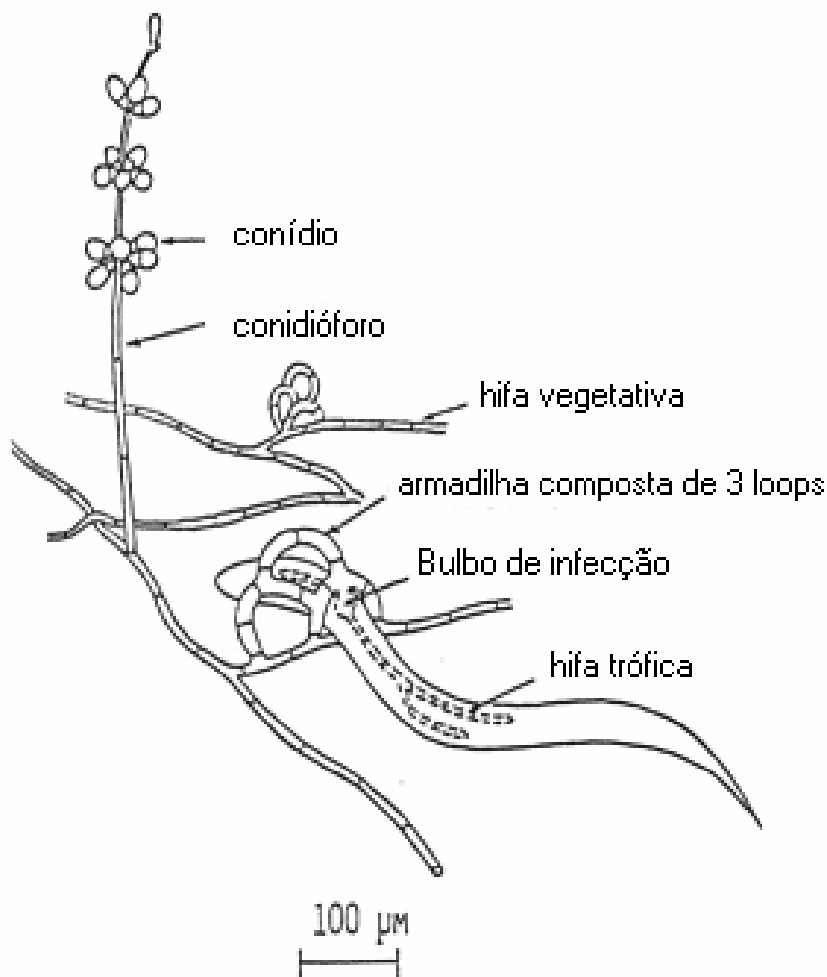


Figura 4 – Representação esquemática do fungo predador de nematóides *Arthrobotrys oligospora*. O nematóide é capturado pela armadilha, formada por três laços. No interior do nematóide, o fungo gera um bulbo infeccioso no qual a hifa trófica cresce, e preenche o corpo do nematóide. O conídio possui cachos em intervalos ao longo do comprimento do conidióforo ereto (FAO, 1998).

As armadilhas dos fungos predadores são variadas, contendo ou não substâncias adesivas. Geralmente, o material adesivo é restrito para órgãos de captura bem definidos que são categorizados como ramos, onde os nematóides são capturados por adesão através de um ramo ereto que apresenta uma superfície inteiramente adesiva; botões, quando eles são capturados através de um botão adesivo sésil ou por um pedúnculo que apresenta o botão adesivo em seu ápice. Porém, apenas o botão propriamente dito é revestido pelo material adesivo ou redes, que capturam os nematóides utilizando laços adesivos bidimensionais ou tridimensionais. Já os órgãos de captura não adesivos são categorizados como anéis constritores, quando os nematóides passam por dentro dos anéis de três células ou anéis não constritores, que apresentam uma ação passiva pelo fato dos nematóides serem capturados quando estão deslizando dentro do anel de três células (BARRON, 1977) (Figura 5).

A formação de armadilhas em intervalos, ao longo de suas hifas, ocorre em resposta à presença do nematóide ou suas excretas, de compostos biológicos ou ainda, é induzida por condições de estresse fisiológico, como na escassez de nutrientes e água (BALAN & GERBER, 1972). O processo de diferenciação das armadilhas ocorre dentro de 24 horas após a interação fungo e nematóide (PRAMER, 1964). Quanto maior a motilidade dos nematóides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (NANSEN et al. 1986, 1988). A formação de armadilhas pode ser atribuída também aos conídios que podem germinar e originar diretamente as mesmas (DACKMAN & NORDBRING-HERTZ, 1992).

Os fungos nematófagos podem apresentar esporos bastante diversificados no tamanho, coloração, forma e resistência no ambiente. A maioria dos fungos nematófagos apresenta esporos secos, emergindo de estruturas de frutificação, denominadas conidióforos, essenciais na dispersão aérea dos conídios. Os conidióforos crescem verticalmente, em direção perpendicular ao substrato no qual o isolado foi cultivado. Algumas espécies produzem conidióforos contendo apenas um conídio em sua extremidade, outras espécies apresentam cachos de conídios em toda a estrutura do conidióforo. Estruturas denominadas clamidósporos também podem ser produzidas. Estes são esporos de parede espessa, diferenciada a partir das hifas, aparecem em

condições de estresse extremo e podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios (BARRON, 1977).

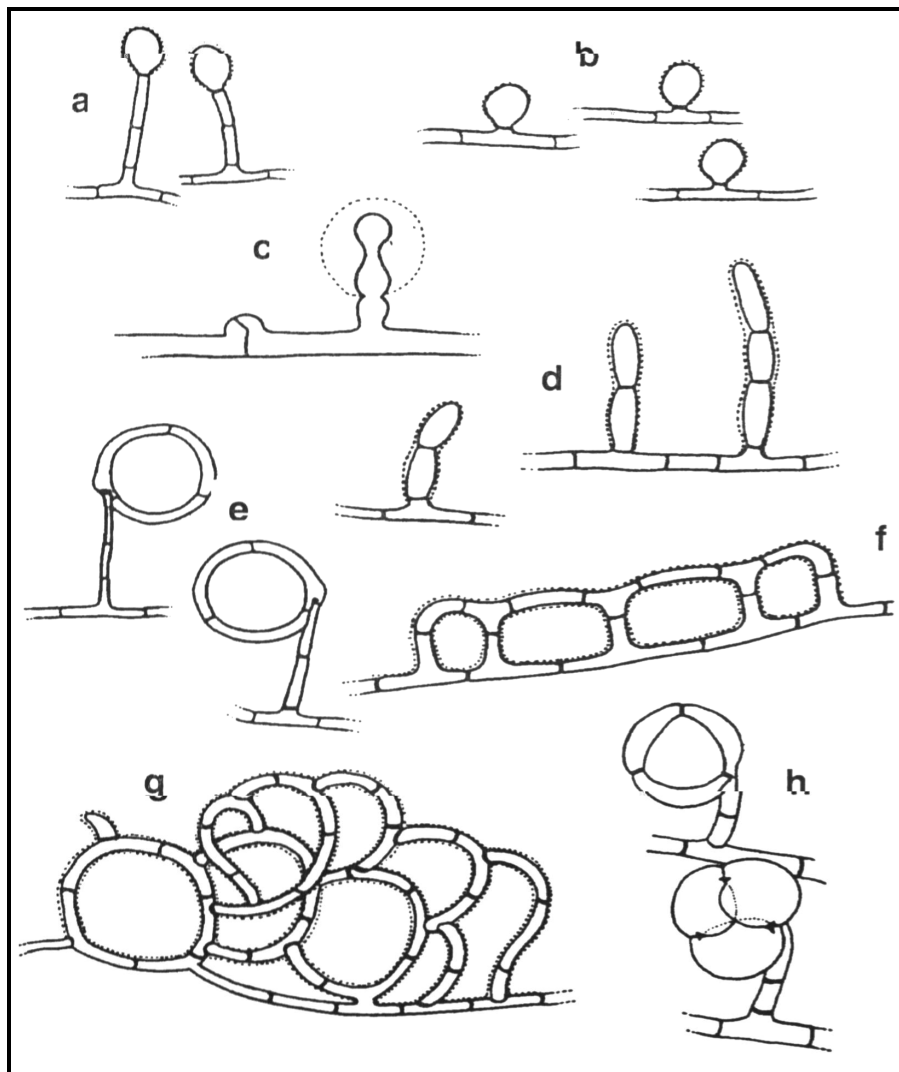


Figura 5 - Órgãos de captura de fungos nematófagos predadores: a) botões adesivos pedunculados; b) botões adesivos sésseis; c) botão adesivo; d) hifas adesivas; e) anéis não-constritores; f) hifa adesiva bidimensional; g) hifa adesiva tridimensional; h) anéis constritores (adaptado de BARRON, 1977).

2.6 – Processo de infecção dos fungos nematófagos

Os eventos críticos que ocorrem durante o processo de infecção dos fungos nematófagos em nematóides são: adesão das estruturas de infecção na superfície do nematóide, penetração da cutícula, imobilização do nematóide e finalmente a invasão e digestão de tecidos internos e translocação dos nutrientes para partes do micélio que está crescendo ativamente (JANSSON & NORDBRING-HERTZ, 1988, TUNLID & JANSSON, 1991, YANG et al., 2005).

Em fungos predadores, o processo de captura inicia-se quando os nematóides são atraídos pela presença das armadilhas (FIELD & WEBSTER, 1977) ou substâncias orgânicas e inorgânicas como o CO₂ (BARRON, 1977) sendo apreendidos nas armadilhas. Neste momento, o processo de adesão começa com o contato físico entre a superfície do nematóide e a armadilha. Este contato conduz a diferentes eventos que incluem ativação de receptores lectínicos (que reconhecem carboidratos), modificação de polímeros de superfície e secreção de enzimas específicas como resultado, uma ligação firme ocorre entre o nematóide e o fungo (NORDBRING-HERTZ & MATIASSEN, 1979, BORREBAECK et al., 1984, 1985; NORDBRING-HERTZ, 1988, ROSÉN et al., 1991, TUNLID & JANSSON, 1991, TUNLID et al., 1992). Em seguida, o fungo penetra na cutícula formando um bulbo e inicia o desenvolvimento da hifa que logo preenche o corpo do nematóide e ocasiona alteração das funções vitais com conseqüente morte (DRECHSLER, 1937).

Estudos ultra-estruturais, histoquímicos e bioquímicos têm sugerido que a penetração da cutícula do nematóide envolve uma combinação de atividade mecânica e atividade de enzimas hidrolíticas incluindo protease (especialmente as subtilisinas da família das proteases serínicas), quitinase e collagenase (JANSSON & NORDBRING-HERTZ, 1988, WANG et al.; 2006). Na década passada, enzimas extracelulares foram intensamente estudadas como fatores de virulência no processo de infecção, e a identificação de numerosas enzimas tem confirmado o envolvimento no mecanismo molecular de infecção (HUANG et al., 2004). Entretanto, as seqüências dos mecanismos moleculares ainda não estão bem elucidadas (WANG et al., 2006).

2.7 - Enzimas envolvidas no processo de infecção

Experimentos com coloração citoquímica indicaram uma intensa atividade de fosfatase ácida (E.C. 3.1.3.2.) no sítio de penetração do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* com o nematóide de vida livre *Panagrellus redivivus*. Esta coloração é restrita na membrana celular, parede celular e parte do revestimento adesivo. Após a penetração do nematóide, estruturas membranosas específicas são formadas através de uma membrana citoplasmática associada com a membrana celular do bulbo infeccioso e das hifas tróficas as quais os estágios posteriores de infecção - 6h após o aprisionamento - apresentaram uma grande quantidade de coloração para a atividade de fosfatase ácida (VEENHUIS et al., 1985). No fungo nematófago *Drechmeria coniospora* também foi encontrado a participação de fosfatase ácida no ponto de contato com o nematóide (DIJKSTERHUIS et al., 1991; JANSSON & FRIMAN, 1999) o que sugere a participação destas e possivelmente outras enzimas como parte integrante do processo de penetração e degradação da cutícula do nematóide.

Entre as enzimas hidrolíticas dos fungos nematófagos, a atividade de protease serínica, tem sido caracterizada como enzima virulenta mediante o domínio catalítico ácido aspártico-histidina-serina. Em 1988, foi detectada uma protease extracelular em *Verticillium suchlasporium*, fungo nematófago endoparasita de cistos de nematóides (LOPEZ-LLORCA & DUNCAN, 1988), sendo que foi a primeira protease serínica P32 purificada (LOPEZ-LLORCA et al., 1990). Outras proteases serínicas de fungos nematófagos foram purificadas e clonadas, incluindo as PII e AozI de *Arthrobotrys oligospora* (TUNLID et al., 1991, TUNLID et al., 1994; AHMAN et al., 1996; AHMAN et al., 2002; ZHAO et al., 2004), pSP-3 de *Paecilomyces lilacinus* (BONANTS et al., 1995) e VCP1 de *Paecilomyces chlamydosporia* (SEGER et al., 1994; 1996; MORTON et al., 2003).

Arthrobotrys oligospora, fungo predador, penetra e imobiliza os nematóides em poucas horas, em parte devido a enzimas extracelulares. A atividade de proteases extracelulares foi avaliada em cultura líquida e reduziu significativamente com a

utilização de um inibidor de protease serínica PMSF, deste modo comprovando que é uma protease da família serínica (TUNLID & JANSSEN, 1991).

Alguns experimentos estão auxiliando na hipótese de que a atividade de protease serínica se inicia na armadilha dos fungos nematófagos degradando a cutícula ou na degradação da casca dos ovos de nematóides. Esta hipótese foi baseada no fato de que uma anulação na mutação de PII apresentou um reduzido número de armadilhas e as múltiplas cópias da mutação um amplo número de armadilhas de *A. oligospora*. A análise desses resultados revelou duas possibilidades: (1) produção de peptídeos através da hidrólise de protease extracelular da cutícula de nematóides pode simular a formação das armadilhas; (2) A protease extracelular pode digerir rapidamente os tecidos do nematóide que foram infectados para proporcionar nutrientes para o desenvolvimento da estrutura de infecção (AHMAN et al., 2002).

Quitinases fúngicas são importantes enzimas para o crescimento das hifas (TAKAYA et al., 1998), participam na infecção de fungos nematófagos e entomopatogênicos e induzem a catálise da quitina que é um importante componente da cutícula dos invertebrados. Quitinase fúngica apresenta um importante papel na infecção de ovos de nematóides (WHARTON, 1980). Atividade de quitinase foi detectada através de ensaio enzimático no isolado *Verticillium spp.* demonstrando que a proporção da infecção em ovos de nematóides aumentou simultaneamente com o aumento da atividade da enzima (DACKMAN et al., 1989). Em 2002, a primeira quitinase servindo como fator nematicida em ovos de nematóides foi purificada e denominada como CHI43 (TIKHONOV et al., 2002).

Colagenase é definida como uma enzima que catalisa a hidrólise do colágeno e gelatina (MACLENNAN et al., 1953). SCHENK et al. (1980) analisaram a capacidade de oito espécies de fungos nematófagos em produzir a enzima colagenase durante o processo de infecção em nematóides, demonstrando que todas as espécies testadas secretaram colagenase extracelular com uma atividade satisfatória.

Em um levantamento sobre fungos nematófagos que ocorrem em fezes decompostas de ruminantes e eqüinos no Brasil foram obtidos dois isolados de *Duddingtonia flagrans*, um em fezes bovinas e o outro em fezes caprinas, ambos

provenientes de municípios localizados no estado do Ceará (SANTOS et al., 1998). Em estudos para caracterização destes isolados e de dois outros isolados exóticos (Canadá e Dinamarca) através de um kit enzimático Api-Zym (Bio meryeux). Todos os isolados apresentaram resposta positiva para as mesmas enzimas. Os isolados apresentaram resposta positiva para fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, leucina arilamidase, valina arilamidase, fosfatase ácida, naftol-a-s-bl-fosfohidrolase, β -glucosidase e α -manosidase. Contudo, houve variação na intensidade de cada reação enzimática entre os isolados (SANTOS, 2000).

Mais recentemente, MENDONZA-DE-GIVES et al. (2003), utilizando o mesmo Kit enzimático, porém com metodologia diferente, demonstraram a produção de algumas enzimas extracelulares por diferentes fungos nematófagos na presença ou ausência dos nematóides *Haemonchus contortus* ou *Caenorhabditis elegans*. *D. flagrans*, *Arthrobotrys* sp., *A. musiformis* e *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*) produziram fosfatase alcalina, esterase (C_4), esterase lipase (C_8) e naftol-AS-BI-fosfohidrolase, em diferentes concentrações de meio soja/peptona. Em adição, leucina arilamidase, fosfatase ácida e α -glucosidase foram detectados em *D. flagrans* somente após 30 dias de incubação no meio soja/peptona. Similarmente, leucina arilamidase, valina arilamidase, fosfatase ácida, β -glucosidase e α -manosidase foram detectadas em *Arthrobotrys* sp. somente após 30 dias de incubação no mesmo meio. A mesma situação foi observada na produção de lipase (C_{14}), α -galactosidase, α -glucosidase e N-A- β -glucosaminidase por *A. musiformis* e *P. chlamydosporia*.

A seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrintestinais de ruminantes está baseado na capacidade de produção do fungo nematófago em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado, no tempo de sobrevivência do fungo em formulações comerciais e na sua atividade patogênica (GRØNVOLD et al., 1996b).

III – OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Estudar a participação da enzima fosfatase ácida durante o processo de infecção do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* quando aprisiona o nematóide de vida livre *Panagrellus sp.*

Objetivo Específico

- Verificar e isolar a atividade da enzima fosfatase ácida em *D. flagrans* e *Panagrellus sp* isoladamente, assim como, durante o processo de infecção do fungo nematófago *D. flagrans* com o nematóide de vida livre *Panagrellus sp* através de técnicas bioquímicas.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Nematóides de Vida livre

Foi utilizado o nematóide de vida livre, *Panagrellus sp* cedido pelo Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo (USP). Estes foram cultivados em Erlenmeyer contendo ágar-aveia (HEINTZ, 1978) e repicados para novos cultivos a cada quinze dias. Para a utilização experimental, os *Panagrellus sp* foram lavados quatro vezes em água destilada estéril por meio de centrifugações, durante 10 minutos a 490 xg.

4.2 - Manutenção do isolado de *Duddingtonia flagrans*

Foi utilizado o fungo nematófago *D. flagrans* (CG 768) isolado por Santos, et al. (1998) no estado do Ceará e depositado no Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia Cenargen - Embrapa.

O fungo foi mantido em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar-água à temperatura ambiente durante dois dias. Em seguida, *Panagrellus sp* foram adicionados ao meio contendo o fungo para estimular a produção de armadilhas, uma vez que na ausência dos nematóides ele pode perder a capacidade de produzir armadilhas, sendo cultivado por três dias à temperatura ambiente. Posteriormente, o fungo foi repicado

através de esporos para uma placa de Petri contendo o meio de crescimento ágar-

água foram adicionados ao Erlenmeyer contendo o caldo Sabouraud. A outra forma de interação foi feita pela adição de uma suspensão contendo 1.500 nematóides e 3 pedaços de 1cm² do ágar-Sabouraud contendo o fungo. Posteriormente, o mesmo cultivo em caldo Sabouraud foi efetuado, como descrito anteriormente.

4.4- Determinação de Atividades Enzimáticas

4.4.1 - Atividade de Fosfatase Ácida Através da Utilização de Substrato Fluorogênico.

Para analisar a presença de fosfatase ácida no fungo, nematóide e na interação foi realizado um experimento preliminar. Neste foram utilizadas oito lâminas contendo 1 mL do meio de cultura ágar-água. *D. flagrans* foi cultivado em quatro lâminas por quatro dias em Câmara de Germinação MOD. 347 a 30°C. Posteriormente, as lâminas contendo ou não o fungo foram observadas em um transiluminador de luz Ultra Violeta. Em seguida, foram adicionados os nematóides e o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato (Sigma), quando necessários, de acordo com a Figura 6. Foram utilizados 60 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 33 *Panagrellus sp* e 40 µL do substrato fluorogênico. Para um segundo experimento foi utilizada uma placa de Petri contendo 5 mL ágar-água e outra contendo fungo cultivado neste meio. O ágar foi cortado em forma circular com diâmetro de 1,6 cm, depositado no Transiluminador de U.V. e quando necessário, um volume da suspensão de *Panagrellus sp* de 20 µL com aproximadamente 304 nematóides e o substrato foram acrescentados de acordo com a Figura 7. As lâminas e os cortes que foram visualizados em luz U.V foram fotografados nos períodos de tempo (2h 30', 3h 50', 4h 50', 5h 30' e 20h) e (0, 5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60', 1 h 10', 1 h 20', 1 h 30', 1 h 40', 2 h, 2h 30', 3h, 15h, 16h, 17h e 18 h) respectivamente. Posteriormente, as imagens foram analisadas densitometricamente mediante o programa computacional "Gel Perfect" (BOZZO & RETAMAL, 1991). Após as análises, os valores dos gráficos serão utilizados para verificar o percentual da atividade de fosfatase ácida da interação em comparação com o da atividade do fungo e do nematóide isoladamente.

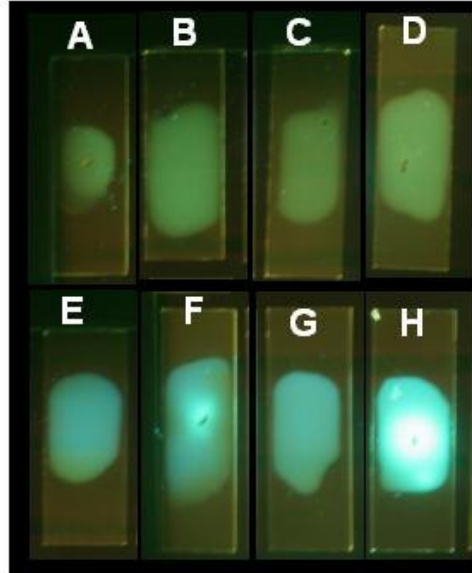


Figura 6 – Representação das lâminas para a determinação de fosfatase ácida em *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e durante o processo de interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* cultivados em lâminas contendo ágar-água observadas no transiluminador de luz U.V. Controles: (A) *D. flagrans* sem substrato; (B) *Panagrellus sp* sem substrato; (C) ágar-água sem substrato; (D) interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* sem substrato. Tratados com Substrato fluorogênico: (E) ágar-água com substrato; (F) *D. flagrans* com substrato; (G) *Panagrellus sp* com substrato; (H) interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* com substrato. Períodos de tempo fotografados (2h 30', 3h 50', 4h 50', 5h 30' e 20h).

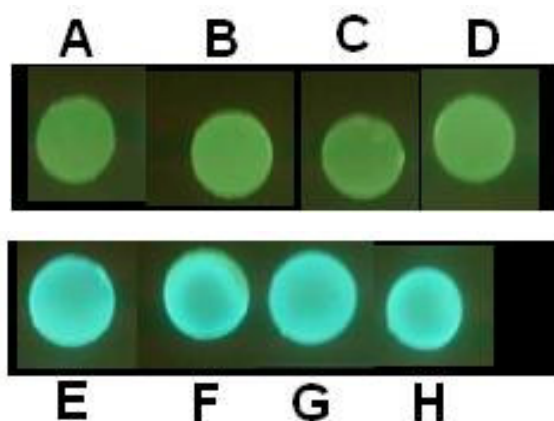


Figura 7 – Representação dos cortes para a determinação de fosfatase ácida em *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e durante o processo de interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* cultivados em placa de Petri contendo ágar-água observados no transiluminador de luz U.V. Controles: (A) ágar-água sem substrato; (B) *D. flagrans* sem substrato; (C) *Panagrellus sp* sem substrato; (D) interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* sem substrato. Tratados com Substrato fluorogênico: (E) ágar-água com substrato; (F) *D. flagrans* com substrato; (G) *Panagrellus sp* com substrato; (H) interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* com substrato. Períodos de tempo fotografados (0, 5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60', 1 h 10', 1 h 20', 1 h 30', 1 h 40', 2 h, 2h 30', 3h, 15h, 16h, 17h e 18 h).

4.4.2 – Atividade de Fosfatase Ácida por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Fosfatases ácidas do extrato bruto de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e das interações foram detectadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5 %. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (2,1 mL de água destilada, 0,5 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 mL de glicerol, 0,8 mL 10 % (m/v) SDS, 0,2 mL 1% (m/v) de azul de bromofenol) em condição semi desnaturante (sem 2-mercaptoetanol) e submetidas à eletroforese (LAEMMLI, 1970) em 150 V e 4 °C sem aquecimento da amostra. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma solução aquosa 2,5 % (m/v) de Triton X-100 por 30 minutos e em seguida transferidos para uma nova solução de Triton X-100 por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, fatias dos géis foram

incubadas em 20 mL de uma solução contendo 5 mL de substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato (sigma) (4 mM) e 15 mL de tampão citrato/fosfato nos pHs 2,2 e 5,4 por 5 minutos, visualizadas em luz U.V. e fotografadas.

4.4.3 - Atividade de Fosfatase Ácida Através de Ensaio Enzimáticos

O ensaio de atividade enzimática foi realizado utilizando o extrato bruto de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e das interações e o substrato sintético descrito na Tabela 1. Em cada determinação, a mistura dos reagentes foi incubada a 30°C por quatro diferentes períodos de tempo. A atividade foi expressa em mili unidades (mU), onde a unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de clivar 1 μ mol de ligação por minuto.

O produto derivado do substrato p-nitrofenol fosfato (p-NP) foi ensaiado nos pHs indicados na Tabela 1 em um volume de reação de 0,05 mL adicionado em 0,05 mL da amostra e a reação foi interrompida pela adição de 0,4 mL de tampão carbonato 0,25 M, bicarbonato 0,25 M, SDS 1%, com a leitura de absorbância de 420 nm no espectrofotômetro (Zeiss). Os períodos de tempo de reação foram 30, 60, 90 e 120 minutos.

Tabela 1 – Tampões usados para a determinação do pH ótimo da atividade de fosfatase ácida no fungo nematófago *D. flagrans*, nematóide de vida livre *Panagrellus sp* e nas interações.

Atividade	Substrato	Concentração	pH	Tampão	Substância ou grupo determinado
Fosfatase	p-NP	10 mM	1,0 -2,2	HCl / KCl	p-nitrofenolato
			2,2 -2,8	glicina – HCl	
			2,6 -7,0	citrato / fosfato	
			7,0 -7,9	fosfato	

Os ensaios foram realizados a 30 °C nos diferentes valores de pH indicados e as velocidades iniciais calculadas.

4.5- Cromatografias

4.5.1 – Cromatografia de troca iônica

O extrato bruto de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e das interações foram aplicados em uma coluna de Econo Q (10 x 0,5 cm i.d.) equilibrada com tampão imidazol 10 mM, NaCl 1 M, pH 6,0, utilizando o aparelho Econo System (BioRad, Richmond, CA). A coluna foi lavada com 5 mL do mesmo tampão e eluída com 45 mL de gradientes lineares de (0-1 M NaCl) em tampão imidazol, seguidos de uma eluição isocrática com 10 mL de tampão contendo NaCl 1M. O fluxo foi de 1,0 mL/min e foram coletadas 60 frações de 1,0 mL que foram ensaiadas para a atividade de fosfatase ácida, segundo o item 4.4.3.

4.5.2 – Cromatografia de interação hidrofóbica

As frações da coluna de troca iônica com atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans* e interação fungo-nematóide com uma prévia interação de 24 h foram reunidas e diluídas 2x com uma solução de sulfato de amônio 2 M (concentração final de 1 M). As amostras foram aplicadas em uma coluna de Fenil-aguarose (10 x 0,5 cm i.d.) equilibrada com 10 mM de tampão imidazol, pH 6,0, contendo 1M de sulfato de amônio, utilizando o aparelho Econo System. A coluna foi lavada com 5 mL do mesmo tampão e eluída com 45 mL de um gradiente linear decrescente de (1-0 M de sulfato de amônio) em tampão imidazol, seguido de uma eluição com 10 mL isocrática utilizando apenas o tampão imidazol. O fluxo foi de 1,0 mL/min e foram coletadas 60 frações de 1,0 mL que foram ensaiadas para a atividade de fosfatase ácida, segundo o item 4.4.3.

4.6 - Determinação de parâmetros cinéticos

Para a determinação do K_m e V_{max} da fosfatase ácida de *D. flagrans* sobre o substrato p-NP, as frações da coluna de interação hidrofóbica com atividade de fosfatase ácida foram reunidas e incubada com dez concentrações diferentes do substrato (0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 mM) em tampão citrato/fosfato pH 5,4, nas condições de ensaio descrita no item 4.4.3. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos através da utilização do programa para computador Enzfitter®.

V – RESULTADOS

5.1 – Análise da atividade fosfatase ácida com substrato fluorogênico

D. flagrans, *Panagrellus sp* e interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* cultivados em lâminas contendo ágar-água ou em placas de Petri contendo ágar-água, que posteriormente foram cortado, foram incubados com o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato e observados nos diferentes intervalos de exposição a luz Ultra Violeta, demonstraram a produção da enzima fosfatase ácida (Figuras 8 e 9).

A análise por densitometria da intensidade do produto fluorescente das lâminas e dos cortes do meio de cultivo demonstrou a atividade da enzima fosfatase ácida pelo fungo nematófago *D. flagrans*, nematóide *Panagrellus sp* e durante a interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp*. (Figura 10 e 11). Foi verificado, em todas as amostras, um aumento da atividade de fosfatase ácida a partir do tempo inicial com atividade máxima em 70 minutos de incubação e um posterior decréscimo após este período de tempo. A interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* apresentou atividade 20% maior quando comparada com a atividade de *D. flagrans* e de *Panagrellus sp* isoladamente (Figura 10 e 11).

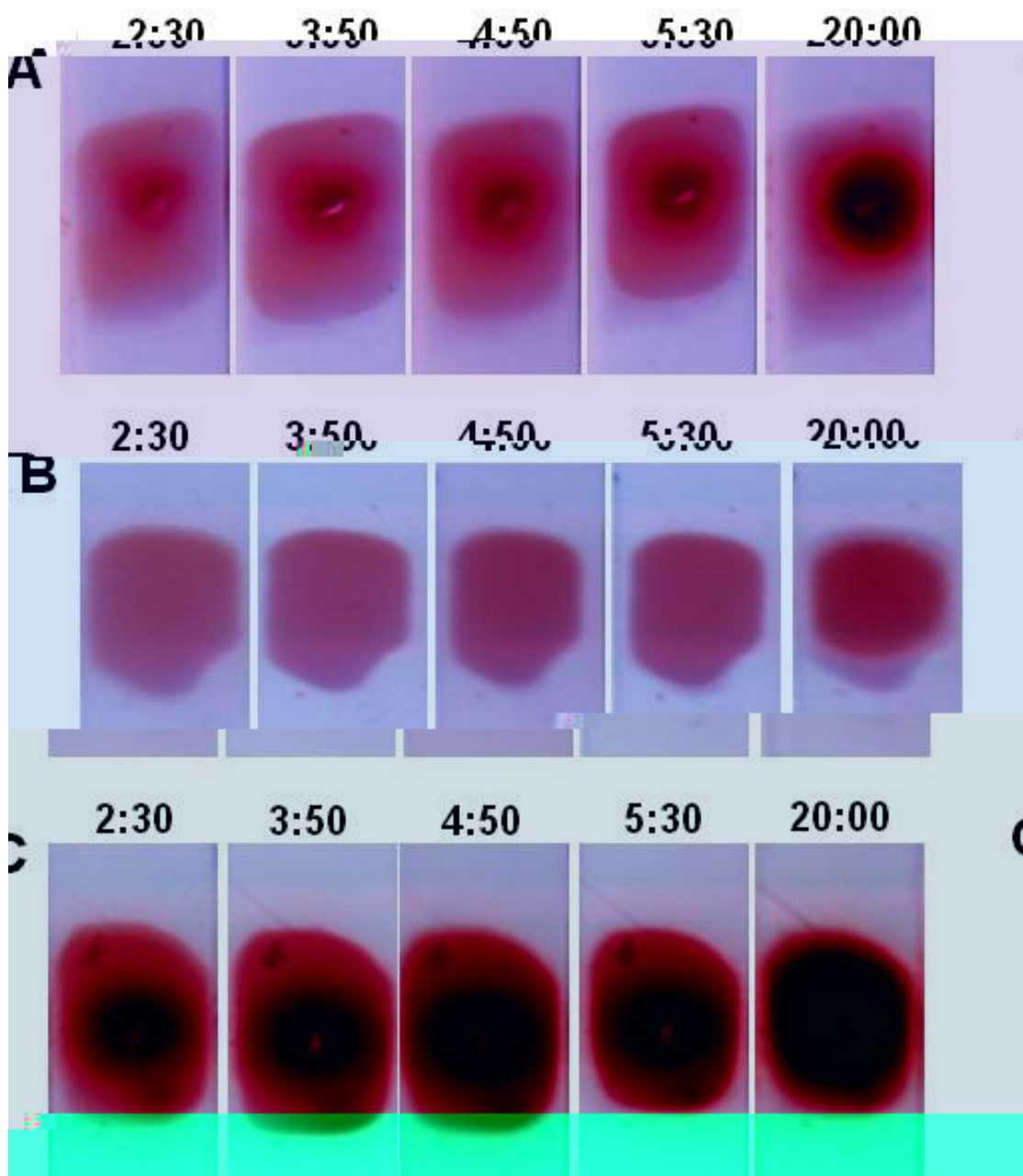


Figura 8 – Determinação da atividade de fosfatase ácida em Lâminas contendo meio de cultivo e substrato fluorogênico na presença de (A) *D. flagrans*, (B) *Panagrellus sp* e (C) interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp*. Os números acima são os períodos de tempo fotografados.

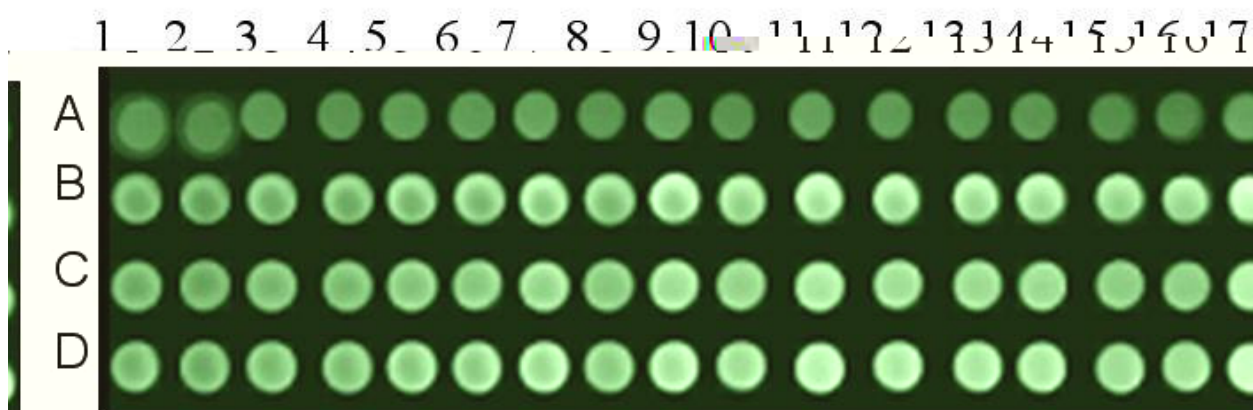
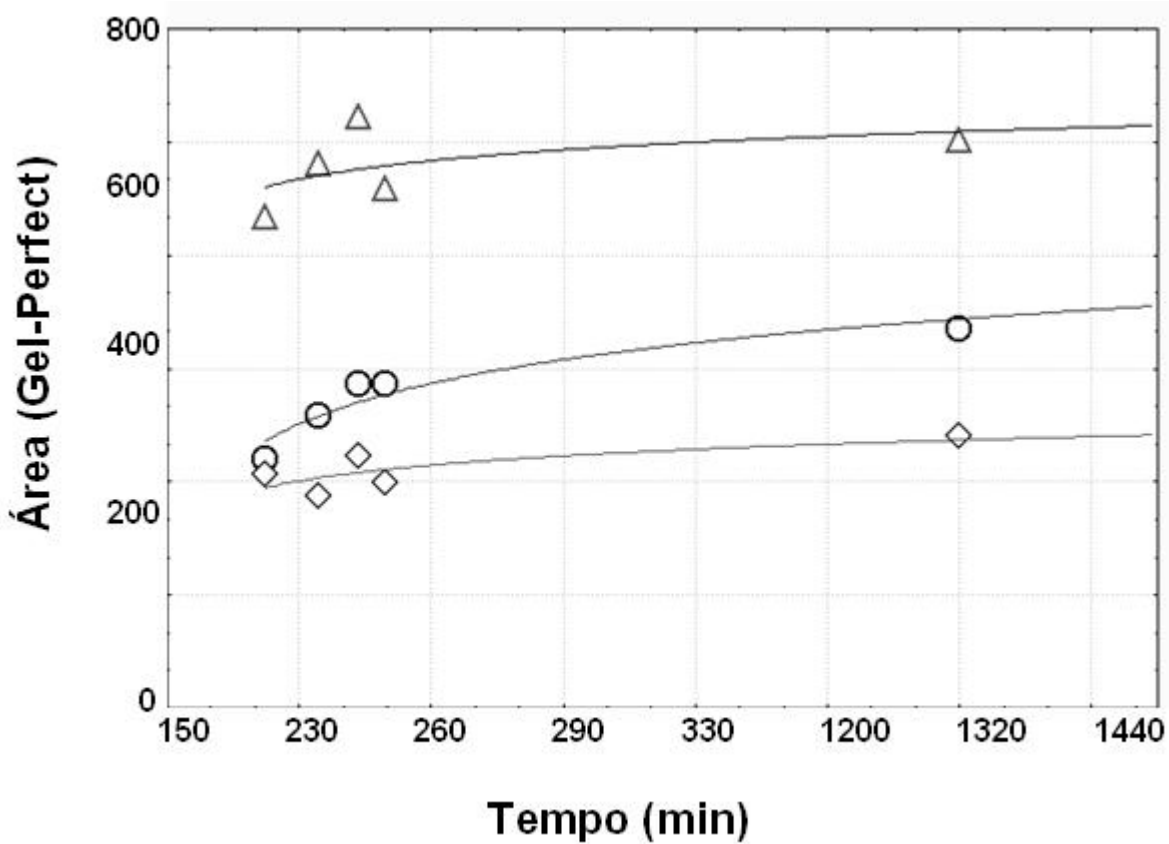


Figura 9 – Determinação da atividade de fosfatase ácida em cortes do meio de cultivo na presença ou ausência do substrato fluorogênico. Controle: (A) Ágar-água sem substrato; Tratados: (B) *D. flagrans*, (C) *Panagrellus sp.*, (D) Interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp.* Os números acima estão correlacionados com os períodos de tempo fotografados. 1 (0), 2 (5'), 3 (10'), 4 (15'), 5 (20'), 6 (25'), 7 (30'), 8 (40'), 9 (50'), 10 (60'), 11 (1 h 10'), 12 (1 h 20'), 13 (1 h 30'), 14 (1 h 40'), 15 (2 h), 16 (2h 30'), 17 (3h).



- D. flagrans*
- Panagrellus sp*
- Interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp*

Figura 10 – Resultado das análises das lâminas (Figura 8) por densitometria do produto fluorescente a partir da hidrólise do substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato em luz U.V de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e Interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* através da utilização do programa “Gel Perfect” (BOZZO & RETAMAL, 1991).

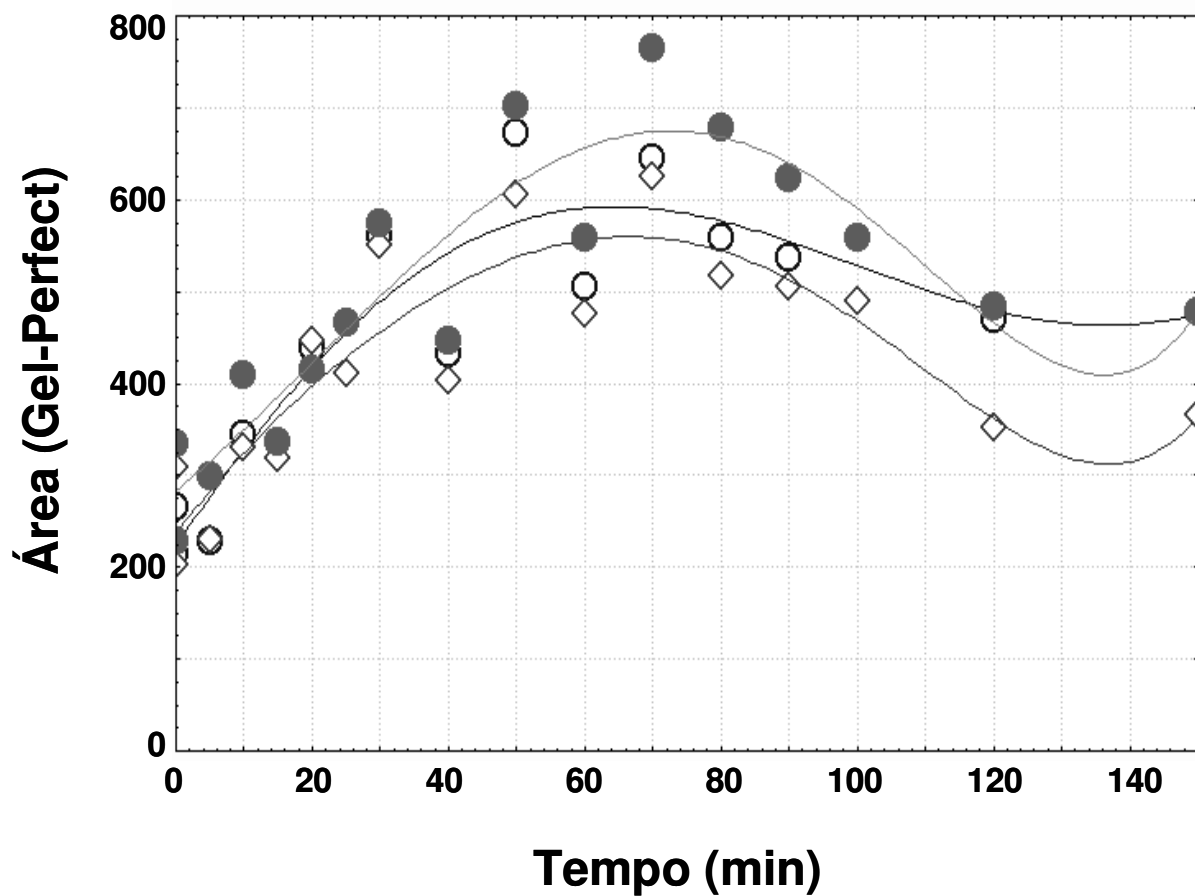


Figura 11 - Resultado das análises dos cortes (Figura 9) por densitometria do produto fluorescente a partir da hidrólise do substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato em luz U.V de *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e Interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* através da utilização do programa “Gel Perfect” (BOZZO & RE

5.2 - Atividades enzimáticas

O ensaio de atividade enzimática foi realizado utilizando o extrato bruto de *D. flagrans*, *Panagrellus sp*, interação fungo-nematóide e interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h.

O pH ótimo da hidrólise do substrato p-nitrofenol fosfato (p-NP) pela fosfatase ácida de *D. flagrans* foi investigado em valores entre 3,0 – 7,9 em tampão citrato/fosfato. Foram verificadas altas atividades no intervalo de pH entre 5,0 e 6,0, com atividade máxima em pH 5,4 (Figura 12 A).

Para a fosfatase ácida do nematóide de vida livre *Panagrellus sp* foi investigado o pH ótimo em valores entre 1,0 – 2,2 em tampão ácido clorídrico/cloreto de potássio, 2,2 – 2,8 em tampão glicina – HCl, 2,6 – 7,0 em tampão citrato/fosfato e 7,0 – 7,9 em tampão fosfato. As atividades máximas foram verificadas em pH 2,2 do tampão ácido clorídrico/cloreto de potássio e pH 5,4 do tampão citrato/fosfato (Figura 12 B).

O pH ótimo da hidrólise do substrato p-NP pela fosfatase ácida das interações fungo-nematóide e fungo-nematóide após prévia interação de 24 h foi investigado como descrito para o nematóide. As atividades máximas foram verificadas em pH 2,2 do tampão ácido clorídrico/cloreto de potássio e pH 5,4 do tampão citrato/fosfato (Figura 12 C e D).

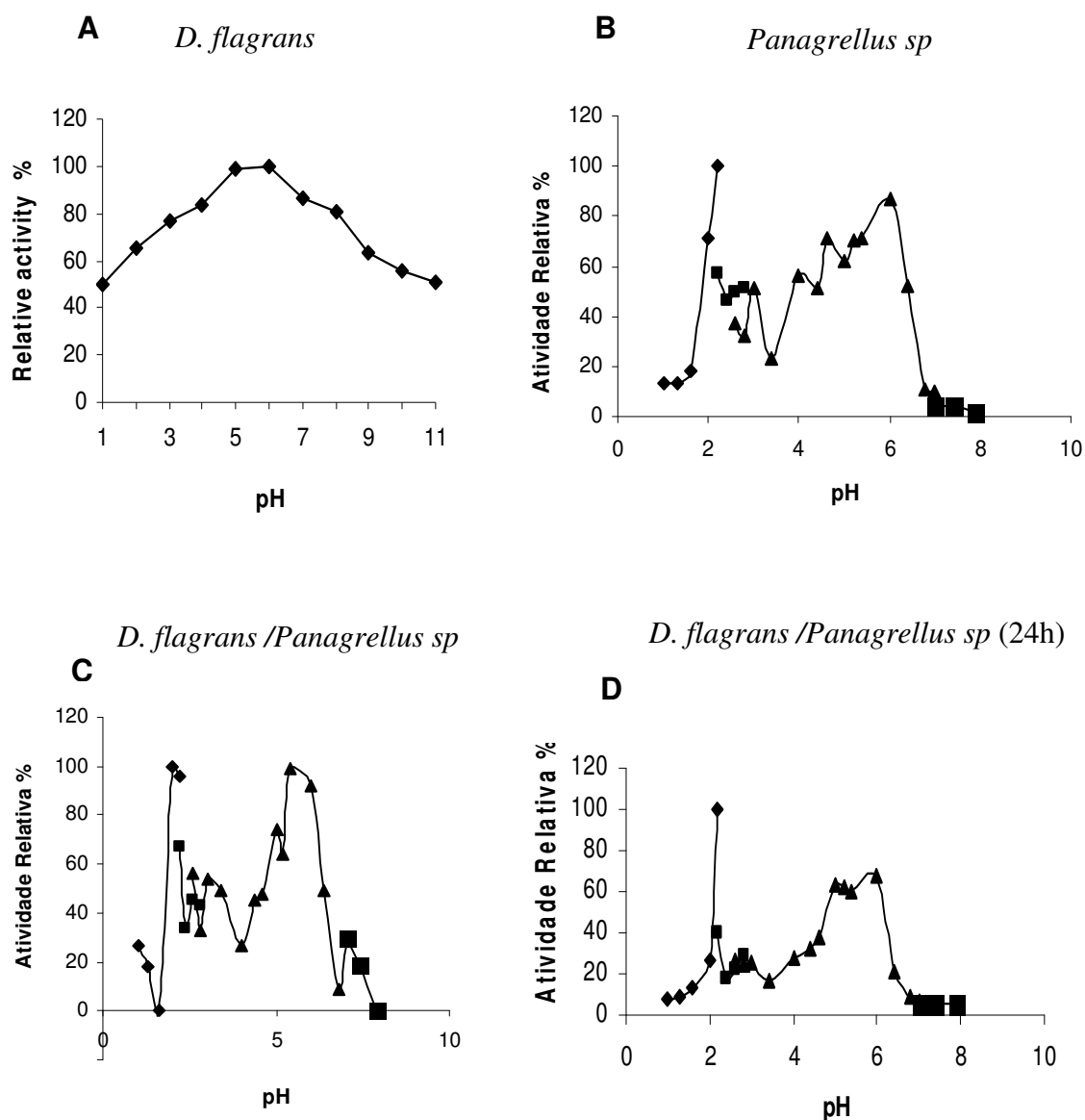


Figura 12 – Determinação de pH ótimo da atividade de fosfatase ácida de (A) *D. flagrans*, (B) *Panagrellus sp*, (C) interação fungo-nematóide e (D) interação fungo-nematóide após prévia interação de 24h a partir da hidrólise do substrato p-NP (10mM) adicionado aos tampões ácido clorídrico/cloreto de potássio (pHs 1,0-2,2) (losango), glicina-HCl (pHs 2,2-2,8) (quadrado), citrato/fosfato (pHs 2,6-7,0) (triângulo) e fosfato (pHs 7,0-7,9) (quadrado grande).

5.3 – Atividade *in gel*

A atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans*, *Panagrellus sp*, interação fungo-nematóide e interação fungo-nematóide com uma prévia interação de 24 h foram visualizadas em gel de poliacrilamida 7,5 % incubado em uma solução contendo substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato.

O perfil das bandas de atividade de fosfatase ácida de *D. flagrans*, *Panagrellus sp*, interações fungo-nematóide e fungo-nematóide com uma prévia interação de 24 h são diferentes (Figura 13).

Foi possível distinguir pelo menos uma banda em *D. flagrans*, com R_f s entre 0,19 e 0,26 no pH 2,2 (Figura 13 A) e no pH 5,4 (Figura 13 B), respectivamente.

As amostras de nematóide apresentaram duas bandas com R_f 0,07 no pH 2,2 (Figura 13 A) e 0,86 no pH 5,4 (Figura 13 B). A principal banda no nematóide apresentou uma baixa mobilidade eletroforética do que a outra.

A banda da interação fungo-nematóide possui R_f 0,04 no pH 2,2 (Figura 13 A) e 0,05 no pH 5,4 (Figura 13 B), ambas as bandas têm uma baixa mobilidade eletroforética.

A interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h apresentou uma banda principal com R_f 0,27 no pH 5,4 (Figura 13 B) que talvez seja uma fosfatase induzida pelo fungo após a interação.

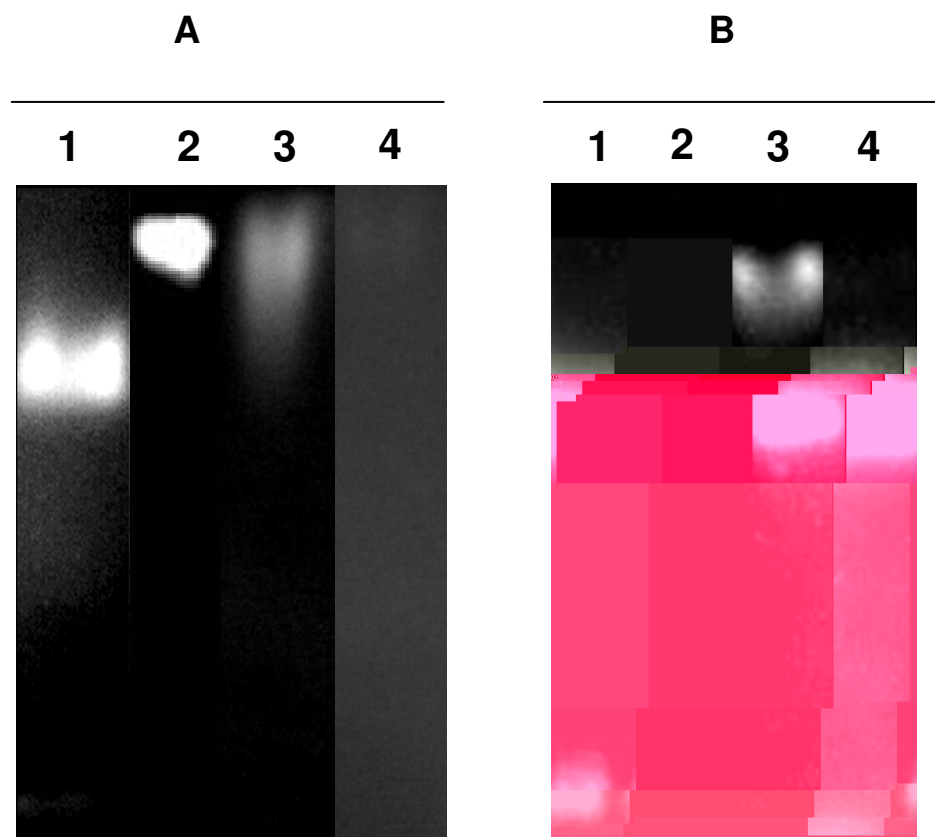


Figura 13 - Determinação da atividade de fosfatase ácida de (1) *D. flagrans*, (2) *Panagrellus sp*, (3) interação fungo-nematóide e (4) interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h por eletroforese em gel de poliacrilamida 7.5 % incubado com uma solução contendo substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil fosfato em tampão (A) ácido clorídrico/cloreto de potássio no pH 2.2 e em tampão (B) citrato/fosfato no pH 5.4.

5.4- Isolamento da atividade enzimática de fosfatase ácida por cromatografia

Uma fosfatase ácida de *D. flagrans* foi detectada por cromatografia de troca iônica (Figura 14 A) seguida de cromatografia de interação hidrofóbica (Figura 15 A).

Duas fosfatases ácidas do nematóide *Panagrellus sp* foram detectadas nas frações da cromatografia de troca iônica (Figura 14 B) no pH 2,2 e pH 5,4, a atividade principal foi observada no pH 2,2.

Com a mesma metodologia, a interação fungo-nematóide apresentou três fosfatases ácidas (Figura 14 C) duas delas com pH ótimo de 2,2 e a outra com pH ótimo de 5,4. Maior atividade foi observada no pH 2,2. Provavelmente, as duas enzimas são produzidas pelo nematóide (com pH de 2,2) e a outra pelo fungo (com pH de 5,4).

A cromatografia de troca iônica (Figura 14 D) e a cromatografia de interação hidrofóbica (Figura 15 B) da interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h demonstraram duas enzimas uma no pH 2,2 e a outra no pH 5,4. A atividade principal foi observada no pH 2,2.

O valor de K_m para a principal fosfatase ácida do fungo nematófago *D. flagrans* utilizando o substrato p-NP foi de 5,59 mM.

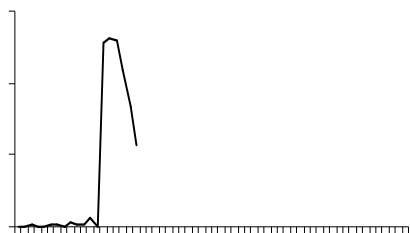


Figura 14 – Determinação da atividade de fosfatase ácida de (A) *D. flagrans*, (B) *Panagrellus sp*, (C) interação fungo-nematóide e (D) interação fungo-nematóide após prévia interação de 24h foram determinadas por cromatografia de troca iônica.

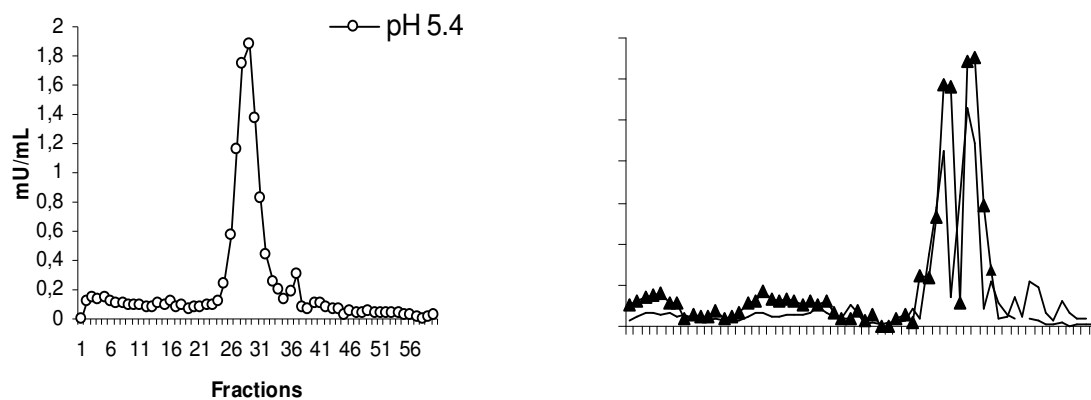


Figura 15 - Determinação da atividade de fosfatase ácida de (A) *D. flagrans* e (B) interação fungo-nematóide após prévia interação de 24h foram determinada por cromatografia de interação hidrofóbica.

VI – DISCUSSÃO

Diversos métodos bioquímicos ou de microscopia têm sido utilizados para estudar os mecanismos de adesão e penetração do fungo nematófago *A. oligospora* aos nematóides. Neste estudo, o uso de metodologias bioquímicas permitiu detectar e caracterizar a atividade da enzima fosfatase ácida no nematóide *Panagrellus*, no fungo *D. flagrans* e durante a interação destes organismos.

No cultivo em meio líquido, foi observada através de SDS-PAGE 7,5 % e cromatografia de troca iônica seguida da cromatografia de interação hidrofóbica a atividade de uma fosfatase ácida em *D. flagrans* com pH ótimo de 5,4 (Figura 14 A e 15 A) e K_m de 5,59 mM. Duas fosfatases ácidas no *Panagrellus sp* com pHs ótimos de 2,2 e 5,4 (Figura 14 B). Três fosfatases ácidas na interação fungo-nematóide com pHs ótimos de 2,2 e 5,4 (Figura 14 C). Provavelmente as duas enzimas encontradas são produzidas pelo nematóide, uma vez que o pH ótimo é 2,2 e a outra produzida pelo fungo, porque apresenta um pH ótimo de 5,4. Utilizando-se mesma metodologia foram observadas duas fosfatases ácidas na interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h com pHs ótimos 2,2 e 5,4 (Figura 14 D e 15 B). A principal fosfatase ácida observada na interação provavelmente foi produzida pelo fungo. Isto foi confirmado quando fungos e nematóides interagiram previamente em placa de Petri contendo meio sólido de cultivo (ágar-água) durante 24 h e em seguida plugs deste meio de cultivo foram transferido para o meio líquido. Como o tempo de interação foi muito longo,

provavelmente, os nematóides já tinham morrido. Sendo assim, prevalecendo à atividade da fosfatase ácida do fungo.

O cultivo em caldo nutritivo realizado por SANTOS, (2000) durante sete dias também permitiu observar a presença da atividade de fosfatase ácida pelo fungo *D. flagrans* com o uso de um kit enzimático. Contudo, MENDOZA-DE-GIVES et al. (2003) usando o mesmo kit enzimático, detectou a produção da fosfatase ácida por *D. flagrans* apenas após 30 dias de cultivo no meio de peptona soja. Não detectando nenhuma atividade no 10º dia de incubação. Quando cultivado em água e água com nematóides durante três dias, o fungo demonstrou a atividade de fosfatase ácida. Os resultados do presente trabalho com o cultivo em meio líquido corroboram com dados existentes sobre a produção desta enzima e complementam na medida em que determinam o pH ótimo, além de gerar informação sobre a existência de duas fosfatases ácidas no nematóide *Panagrellus sp* sendo uma destas extremamente ácida.

No presente trabalho, a atividade de fosfatase ácida foi analisada em diferentes períodos de tempo com a utilização de substrato fluorogênico. Este experimento demonstrou atividade de fosfatase ácida em *D. flagrans*, *Panagrellus sp* e na interação fungo-nematóide (Figura 8 e 9). A atividade máxima ocorre com 70 minutos de incubação (Figura 11). Na interação *D. flagrans* x *Panagrellus sp* a atividade de fosfatase ácida foi 20% maior quando comparada com a atividade de *D. flagrans* e de *Panagrellus sp* isoladamente (Figura 10 e 11). A análise das lâminas apresentou uma atividade máxima a 20 h diferente da atividade máxima da análise nos cortes que foi de 1 h de incubação. Como as lâminas foram incubadas com o substrato fluorogênico em tempos maiores e com uma maior quantidade de ágar-água, quando alcançou a atividade máxima em 20 h, o meio de cultivo já havia ressecado e com isso, concentrou o substrato gerando esta alta atividade. Estes resultados sugerem que a atividade de fosfatase ácida pode estar envolvida com a infecção do nematóide de vida livre *Panagrellus sp* pelo fungo nematófago *D. flagrans*.

Em trabalhos anteriores usando microscopia eletrônica, a atividade de fosfatase ácida foi estudada durante o processo de interação do fungo nematófago *A. olipospora* com o nematóide de vida livre *Panagrellus redivivus* (VEENHUIS et al., 1985) e com o

fungo nematófago *Drechmeria coniospora* sendo detectada no sítio de contato com o nematóide (DIJKSTERHUIS et al., 1991; JANSSON & FRIMAN 1999). O autor que avaliou a atividade em *A. olipospora*, diferente deste trabalho, detectou uma maior atividade da enzima por volta da 6 horas após interação.

A atividade patogênica de fungos nematófagos contra nematóides envolve um complexo processo dependente do reconhecimento de estruturas moleculares da superfície da cutícula dos nematóides e da participação de enzimas que somados contribuem para a realização da imobilização, penetração e subsequente colonização e digestão do nematóide (MENDONZA-DE-GIVES et al., 2003). Com isso, a investigação dos fungos nematófagos que são mais eficazes em predar nematóides no material fecal, assim como, a caracterização dos processos de interação fungo-nematóide são de grande importância, podendo influenciar na seleção de isolados para utilização em programas de controle biológico (MENDONZA-DE-GIVES, 1999).

As observações do presente estudo fortalecem a expectativa de num futuro próximo estar utilizando um produto biológico à base de *D. flagrans* cujo benefício seria reduzir o número de administrações anuais de anti-helmínticos sobre os vermes. O aumento da vida útil desses compostos retardaria o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica e a redução da presença de resíduos químicos nos alimentos de origem animal. Este aspecto é de fundamental importância, em virtude da pressão cada vez maior por parte dos consumidores, por alimentos isentos ou com um mínimo de resíduos químicos. O uso reduzido de compostos químicos, por sua vez, implicará também na redução da contaminação ambiental que vem sendo motivo de grande preocupação mundial.

VII – CONCLUSÕES

- A atividade máxima da fosfatase ácida a partir da hidrólise do substrato fluorogênico foi com 70 minutos de incubação em *D. flagrans* e *Panagrellus sp* isoladamente e na combinação de *D. flagrans* e *Panagrellus sp*. E durante a interação fungo-nematóide a atividade de fosfatase ácida foi 20% maior quando comparada com a atividade de *D. flagrans* e de *Panagrellus sp* isoladamente.
- Os resultados sugerem que no fungo nematófago *D. flagrans* existe atividade de uma fosfatase ácida com pH ótimo de 5,4 e K_m de 5,59 mM.
- Atividade de duas fosfatases ácidas foram encontradas no nematóide de vida livre *Panagrellus sp* com pH ótimos de 2,2 e 5,4.
- A interação fungo-nematóide apresentou atividade de três fosfatases ácidas, duas com pH ótimo de 2,2 e a outra com pH ótimo de 5,4. E a interação fungo-nematóide após prévia interação de 24 h apresentou atividade de duas fosfatases ácidas com pHs ótimos de 2,2 e 5,4.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCOBA. Controle da verminose em caprinos e ovinos dá mais lucro ao produtor. Disponível em <http://www.accoba.com.br>, acesso em 01/06/2005.

AHMAN, E. K. Bo, et al., Sequence analysis and regulation of a gene encoding a cuticle-degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology**, v. 142, p. 1605-1616, 1996.

AHMAN,T.; JOHANSSON. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity, **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68,p. 3408-3415, 2002.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A. & FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v.47, n.1, p.37-42, 1995.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p.165-170, 2004.

BALAN, J. & GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactiloides*. **Nematologica**, v. 18, p. 163-173, 1972.

BARRON, G.L. The Nematode-destroying fungi. **Canadian Biological Publications. Guelph**, p.140, 1977.

BORREBAECK, C.A., MATTIASSON, B., NORDBRING-HERTZ, B. Isolation and partial characterization of a carbohydrate-binding protein from a nematode-trapping fungus. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p. 53-56, 1984.

BONANTS, P.J; FITTERS, P.F; THIJS, H; BELDER, E. D; WAALWIJK, C; HENFLING, JW. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne* hapla eggs. **microbiology**, Vol. 141, p. 775-784, 1995.

BORREBAECK, C.A.K., MATTIASSON, B., NORDBRING-HERTZ, B. A fungal lectin and its apparent receptors on a nematode surface. **FEMS Microbiology Letters**, 27, 35-39. 1985.

BOZZO, S.; RETAMAL, C. Geles unidimensionales un nuevo método densitométrico para computadores personales. **Arch. Biol. Med. Exp.** 24, R 181, 1991.

CASWELL, E. P., Apt, W.J. Pineapple nematode research in Hawaii: past, present, and future. **Journal of Nematology**. v.21, p. 147-157, 1989.

CHARLES, T.P. Verminose dos bovinos de leite. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças Parasitárias dos Bovinos de Leite**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p.55-110, 1992.

CHARLES, T.P.; SANTOS, C.de P.; ALVIM, G.P. Atividade predatória de duas espécies de fungos nematófagos nos estágios de vida livre de nematódeos Trichostrongilídeos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, Suplemento 1, p. 46. 1993a.

CHARLES, T.P.; RODRIGUES, M. de A.; SANTOS, C. de P. Redução do número de larvas de *Cyathostominae* em fezes de eqüinos tratadas com conídios de *Arthrobotrys oligospora*. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA LÍNGUA PORTUGUESA, 6., 1993 Salvador: **Comitê Permanente dos Congressos Internacionais de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa**, p. 333-334, 1993b.

CHARLES, T.P.; ROQUE, M.V.C.; SANTOS, C. De P. Reducing of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. **International Journal for Parasitology**, v.26, n.5, p. 509-510, 1996.

DACKMAN, C., CHET, I., et al., Fungal parasitism of the cyst nematode *Herodera schachili*: Infection and enzymatic activity, **FEMS Microbiology Ecology**, v.62, p.201-208, 1989.

DACKMAN, C., NORDBRING-HERTZ, B. Conidial traps- a new survival struture of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycological Research**, v.96, n.3, p.194-198, 1992.

DESCAZEUX, J. Action des champinhos Hyphomycètes prédateur sur les larves de certains nématodes parasites des ruminants. **Bulletin Society Pathology Exotic**, v. 32, p. 457-459, 1939.

DESCHIENS, R. Capture et destruction de larves de *Strongyloides* du singe et du boeuf par des Hyphomycetes. **Bulletin Society Pathology Exotic**, v. 32, p. 394-398, 1939.

DESCHIENS, R.; LAMY, L. Conditions pratiques de culture, de sporulation et de récolte des spores d'Hyphomycètes prédateurs de nématodes. **C.R. Society Biology Paris**, v. 137, p. 381-383, 1943.

DIJKSTERHUIS, J.; HARDER, W.; WYSS, U. ; VEENHUIS, M. Colonization and digestion of nematodes by the endoparasitic fungus *Drechmeria coniospora*. **Mycological Research**, v. 95, n. 7, p. 873-878, 1991.

DRECHSLER, C. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. **Mycologia**, v.29, p. 447-552. 1937.

EMBRAPA. Agricultura familiar.

Disponível em <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>, acesso em 2003.

EMBRAPA. O controle de verminose na produção orgânica de caprinos e ovinos. Disponível em <http://www.cnpc.embrapa.br/artigo13.htm>, acesso em 2004.

FAO. Biological control of gastro-intestinal nematodes of ruminants using predacious fungi. **FAO animal production and health papers**, Rome, 94p., 1998.

FIELD, J.I. & WEBSTER, J. Traps of predacious fungi attract nematodes. **Trans. Br. Mycol. Societ**, v.68, p. 467-469, 1977.

GRAY, N.F. Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat. **Annals of Applied Biology**, v.102, p. 501-509, 1983

GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Review**, Great Britain, v.62, p. 245-304, 1987.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M. & BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.48, p. 311-325, 1993a.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P. & HENRIKSEN, S.A. Nematode-trapping fungi against parasitic cattle nematodes. **Parasitology Today**, Barking, v.9, p.137-140, 1993b.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, Sv. Aa. & NANSEN, P. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. **Journal of Helminthology**, v.67, p. 31-36, 1993.

GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; NANSEN, P. & WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, v.64, p. 47-64, 1996.

HEINTZ, C.E. Assessing the predacity of nematode-trapping fungi *in vitro*. **Mycologia**, v. 70, p. 1086-1100, 1978.

HUANG, X.; ZHAO, N.; ZHANG. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 811-816, 2004.

JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ. Infection mechanisms in the fungus-nematodes system, In: **G.O.Poinar Jr., H.B.Jansson (Eds), Diseases of Nematodes**, v. 2, CRC Press, BocaRaton, Fl, p. 59-72, 1988.

JANSSON, H. B & FRIMAN, E. Infection-related surface proteins on conidia of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. **Mycological Research**, v.103, n^o 2, p. 249-256, 1999.

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

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. Biological control of gastro-intestinal nematodes - facts, future, or fiction? **Veterinary Parasitology**, v.72, p. 479-492, 1997.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 139-146, 1999.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v. 120, p. 121-131. 2000.

LARSEN, M. Biological control of nematode parasites in sheep. **Journal Animal Science**, v. 84, p. 133-139. 2006.

LÝSEK, H. & KRAJŠÍ, D. Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. **Folia Parasitologica**, Olomouc, v.34, p.57-60, 1987.

LÝSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* egg by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 255- 259, 1991.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; DUNCAN, G. H. A study of fungal endoparasitism of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* by scanning electron microscopy, **Can. Journal Microbiology**, v. 34, p. 613-619. 1988.

LOPEZ-LLORCA, L. V. Purification and properties of extracellular protease produced by the nematophagous fungus *Verticillium subchlorosporium*, **Can. Journal Microbiology**, v. 36, p. 530-537. 1990.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; OLIVARES-BERNABEU, C., SALINAS, J. JANSSEN, J.H.B. ; KOLATTUKUDY, P.E. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. **Mycologi Research**, v. 106, n. 4, p. 499-506. 2002.

MACLENNAN, J. D.; MANDL, I., et al., Bacterial digestion of collagen, **Journal Clin. Invest.** V. 32, p. 1317-1322, 1953.

MACRAE, J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 52, p. 121-130, 1993.

MENDOZA-DE-GIVES, P.M.; BEHNKE, J. M.; DAVIES, K. G. Extracellular enzyme production by nematophagous fungi in the presence and absence of nematodes. **International Journal of Nematology**, V. 13, p. 27-36, 2003.

MENDOZA-DE-GIVES, P. Interaction between nematodes and biocontrol agents with potential for use in biomanagement systems. **Nottingham: University of Nottingham, (Doctor of Philosophy Thesis)**, p. 219, 1999.

MORTON, C. O.; HIRSCH, P. R., et al., Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*, **Mycological Research** . v.107, p. 38-46, 2003.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p. 93-100, 2003.

NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A & WOLSTRUP, J. Predacious activity of the nematode- destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematode. **Proceedings of the Helmintological Society of Washington**, v. 53, n.2, p. 237-243, 1986.

NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J. W.; HENRIKSEN, S.A & JØRGENSEN, R. J. Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. **International Journal Parasitology**, v. 27, p. 325-335, 1988.

NORDBRING-HERTZ, H., MATIASSEN, B. Action of the nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. **Nature**, 281, 477-479, 1979.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiological Sciences**, 5, 108-116, 1988.

PADILHA, T. Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil. In: Padilha, T., (Ed), **Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco, Embrapa-CNPGL., p. 77-93, 1996a.

PADILHA, T. Resíduos de anti-helmínticos na carne de leite. In: Padilha T., (Ed), **Controle dos nematóides em ruminantes**. Coronel Pacheco, Embrapa-CNPGL., p. 77-93, 1996b.

PADILHA, T.; GIVES, P.M. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos trichostrongilídeos: Uma alternativa para higienização das pastagens. In: Padilha T., (Ed), **Controle dos nematóides em ruminantes**. Coronel Pacheco, Embrapa-CNPGL., p. 216-235, 1996.

PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: A possible method of biological control. **Journal of Helminthology**, London, v. 47, n. 1, p. 35-48, 1973.

PARAUD, C.; CABARET, J.; PORS, I.; CHARTIER, C. Impact of the Nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Muellerius capillaris* larvae in goat faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p.71-78, 2005.

PRAMER, D. Nematode trapping fungi. **Science**. V. 144 p. 382-388, 1964.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, Rio de Janeiro: **IBGE**, v.30, p. 33, 2002.

ROSÉN, S., EK, 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, 1991.

ROUBAUD, E.; DESCHIENS, R. Essais relatifs a la prophylaxie de l'anguillilose du mouton por l'usage des hyphomycetes prédateurs du sol. Compedium R. Seanc. **Society Biological**, v. 135, p. 687-90, 1941.

RUBNER, A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. **Studies in Mycology**, v.39, p.1-134, 1996.

SANTOS, C. de P.; SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; LARSEN, M. Nematophagous fungi in decomposing ruminant and equine feces in Brazil. In: **Second International**

Conference Novel Approaches To The Control Of Helminths Parasites of Livestock 2, 1998, Baton Rouge- Lousiana **Abstracts**...p. 59, 1998

SANTOS, C. P. Isolamento, identificação, produção massal de fungos nematófagos e avaliação de características biológicas do fungo *Duddingtonia flagrans*. 2000. 80f. **Tese (Doutorado). Seropédica: UFRRJ**, 2000.

SANYAL, P.K. Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasites of ruminants. **Veterinary Research Communications**, 24, p.55-62, 2000a.

SANYAL, P.K. Biological control of pre-parasitic stage of trichostrongyles of cattle with nematophagous fungi, *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Veterinary Parasitology**, 14, p.119-122, 2000b.

SCHENCK, T.; CHASE, et al.; Collagenase production by nematode-trapping fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 567-570, 1980.

SEGRS, R.; BUTT, T. M., et al., The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ, **Microbiology**, v. 140, p. 2715-2723, 1994.

SEGRS, R.; BUTT, T. M., et al., The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs, **Mycological Research**. v. 100, p. 421-428, 1996.

SILVEIRA, V. D. Micologia. 5^a ed., Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 336, 1995.

TAKAYA, N.; YAMAZAKI, D.; et al., Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: Molecular Cloning and characterization, **Microbiology**, v. 144, p. 2647-2654, 1998.

TIKHONOV, V. E.; LOPEZ-LLORCA, L. V., et al., Purification and characterization of chitinase from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *Verticillium suchlasporium*, **fungal Gen. Biol.** V. 35, p. 67-78, 2002.

TUNLID, A., JANSSON, S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2868-2872, 1991.

TUNLID, A., ROSÉN, S., Nordbring-Hertz, B. Molecular mechanisms of adhesion in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Journal Mycology Medicine**, v.2, p. 36-42, 1992.

TUNLID, A.; ROSÉN, S.; EK, B. & RASK, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology**, v. 140, p. 1687-1695, 1994.

VASCONCELOS, A.L.C.F. Alternativas para o controle das Nematodioses Gastrintestinais de Ovinos e Caprinos. **Segundo simpósio de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza ceará 2007.

VEENHUIS, M., NORDBRING-HERTZ, B. & HARDER, W. Development and fate of electron-dense microbodies in trap cells of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Antonie van Leeuwenhok** .v.51, p.339-407, 1985.

ZHAO, M. Mo, et al.. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*, **Microbiology**, v. 69, p. 16-22, 2004

WANG, R. B.; YANG, J. K.; LIN, C.; ZHANG, Y. & ZHANG, K. Q. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p. 589-594, 2006.

WHARTON, D. A. Nematode egg-shells, **Parasitology**, v. 81, p. 447-463, 1980.

YANG, J.; HUANG, X.; TIAN, B.; WANG, M.; NIU, Q. & ZHANG, K. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. **Biotechnology Letters**, v.27, p. 1123-1128, 2005

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)