

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PROTEÍNAS DE RESPOSTA IMUNE EXPRESSAS NA HEMOLINFA DA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM RESPOSTA A DIFERENTES MICROORGANISMOS**

ANA CLÁUDIA MALAGUTTI CORSATO

CASCAVEL, PARANÁ

2018

ANA CLÁUDIA MALAGUTTI CORSATO

**PROTEÍNAS DE RESPOSTA IMUNE EXPRESSAS NA HEMOLINFA DA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM RESPOSTA A DIFERENTES MICRORGANISMOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa “Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde”.

Orientador (a): PROF. Dr. JOSÉ LUIS DA CONCEIÇÃO SILVA

CASCADEL, PARANÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas - UNIOESTE)

C851p	<p>Corsato, Ana Cláudia Malagutti. Proteínas de resposta imune expressas na hemolinfa da <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) em resposta a diferentes microrganismos / Ana Cláudia Malagutti Corsato.--- Cascavel (PR), 2018. viii, 54 f.:il.</p> <p>Orientador (a): Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Inclui Bibliografia</p> <p>1. Auto-imunidade. 2. Lepidoptera. 3. Agentes anti-infecciosos. I. Silva, José Luis da Conceição. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título</p> <p style="text-align: right;">CDD 615.1</p>
-------	--

Rosângela A. A. Silva – CRB 9ª/1810

ANA CLÁUDIA MALAGUTTI CORSATO

**PROTEÍNAS DE RESPOSTA IMUNE EXPRESSAS NA HEMOLINFA DA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM RESPOSTA A DIFERENTES MICRORGANISMOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Oeste do Paraná, campus de Cascavel, em cumprimento aos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa "Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde".

Orientador: Prof. Dr. José Luis da C. Silva

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná – Campus Cascavel



Prof.ª Dr.ª Marina Kimiko Kadowaki  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná – Campus Cascavel



Prof.ª Dr.ª Adriana Florini Rosado  
Universidade Federal do Paraná –  
Campus Palotina

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Ana Cláudia Malagutti Corsato, natural de Guaíra, Paraná, Brasil, nascida no dia 21 de janeiro de 1992, formou-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em março de 2016. Ingressou no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. O projeto de dissertação foi desenvolvido na linha de pesquisa “Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde”, orientado pelo Dr. José Luis da Conceição Silva.

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a minha família, minha mãe Maria Aparecida, meu pai Carlos Corsato e minha irmã Jaqueline, por serem meus exemplos de pessoas, por me proporcionarem a oportunidade de estudar e de crescer, por me incentivarem a persistir e principalmente por todo amor. Tudo que faço é por vocês.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Luis da Conceição Silva, que foi além, me acompanhou nessa caminhada por um assunto novo com paciência e dedicação, e por todo o respeito com o qual sempre me tratou.

À Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki que compartilhou seus conhecimentos e ajudou a resolver os problemas pelo caminho, acrescentando muito ao nosso trabalho.

Ao Professor Dr. Luciano Fernandez Huergo e a Pós-Doutoranda Edileusa Marques Gerhardt do Centro Politécnico da UFPR (Curitiba), por todo auxílio prestado em uma das etapas do trabalho.

Ao Professor Luiz Francisco Angeli Alves, por nos permitir o acesso ao laboratório e aos insetos da Biotecnologia (UNIOESTE).

A todos do Laboratório de Bioquímica, em especial Débora Jacomini, Larissa Bussler, Juliana Pagnonceli, Indianara Bueno, Letícia Rasbold, Giovane Rocha e Felipe Andre, por sempre estarem disponíveis para ajudar e por tornarem o ambiente de trabalho tão leve.

Ao meu amigo Charles Seuchuco, pela parceria que vem desde a graduação e se estendeu por esses dois anos, pela paciência comigo, por ser tão inteligente e por me ajudar sempre. Que você alcance todo sucesso possível na nova caminhada que inicia e que a vida nos permita continuar próximos.

Aos meus amigos e irmãos da vida Analine Barquez, Lucas Casagrande, Eveline Schmidt, Wilson Coelho, Lenon Marcos, Priscila Schmidt, Alex Junior, Thiago Faino, Rodrigo Nascimento e Gustavo Catarino. Obrigada por sempre estarem presentes e torcerem por mim. Vocês são a família que escolhi e cada um tem um lugar especial no meu coração!

Muito obrigada!

## PROTEÍNAS DE RESPOSTA IMUNE EXPRESSAS NA HEMOLINFA DA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM RESPOSTA A DIFERENTES MICRORGANISMOS

A *Diatraea saccharalis* é a praga responsável por grandes perdas econômicas à cultura da cana-de-açúcar. Assim como outros integrantes da ordem Lepidoptera, a *D. saccharalis* possui resposta imunológica inata rápida e eficiente, constituída por barreira primária de defesa, resposta imune celular e resposta imune humoral. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são parte da resposta imune humoral que apresentam características catiônicas e anfifílicas, além de sua massa molecular baixa, o que os tornam potenciais agentes terapêuticos. Neste estudo foram analisadas proteínas com baixa massa molecular, diferencialmente expressas na hemolinfa da *D. saccharalis*, após os intervalos de 6 e 12 horas de indução da resposta imune humoral com diferentes microrganismos em comparação às lagartas não desafiadas (controle). As lagartas em 5º instar foram divididas em grupos (n= 50) e submetidas a desafios sépticos de 6 e 12 horas: controle (grupo 1), desafiadas por *Bacillus subtilis* ATCC 6623 (grupo 2), desafiadas por *Escherichia coli* ATCC 11229 (grupo 3) e desafiadas por *Beauveria bassiana* cepa 88 (grupo 4). Em cada lagarta foi inoculada uma concentração conhecida do microrganismo e, após o tempo estabelecido, a hemolinfa foi coletada. As proteínas de baixa massa molecular foram obtidas submetendo cada amostra de hemolinfa a uma solução de extração contendo Metanol, Ácido Acético e Água. Posteriormente, os extratos proteicos foram concentrados em colunas e a dosagem proteica realizada em 280 nm. Aproximadamente 500 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese bidimensional (2-DE). Os spots foram retirados dos géis, digeridos com Tripsina, e submetidos à espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF/ToF. A identificação das proteínas ortólogas foi realizada utilizando os dados obtidos contra os dados disponíveis no servidor online MASCOT (Matrixscience), especificando a base de dados (NCBI e Swissprot) para *Drosophila melanogaster* e um banco interno de Lepidoptera. A ferramenta TagIdent foi utilizada para a busca de proteínas por meio de suas massas moleculares e ponto isoelétrico. Foram identificadas dezoito proteínas, das quais doze se mostraram envolvidas com a resposta imune em *D. saccharalis*. O desafio séptico de 6 horas com *B. subtilis* foi responsável pela alteração na expressão da proteína de reconhecimento de peptideoglicano (PGRP), pelo aumento da expressão da proteína ligadora de quitina e pela indução da expressão de proteínas como a Atacina-A e a proteína inibidora de serino-protease. O desafio imunológico de 6 horas com *E. coli* levou ao aumento da expressão de uma provável proteína de defesa. Os desafios de 12 horas utilizando as bactérias *B. subtilis* e *E. coli* se mostraram responsáveis pelo aumento da expressão da Lisozima. O desafio de 6 horas com *B. bassiana* causou indução da expressão de uma Cecropina A2 e uma possível Drosomicina. Por sua vez, após o desafio fúngico de 12 horas, houve a indução da expressão da proteína multifuncional Apolipoforina-3. Concluiu-se que desafios sépticos com diferentes microrganismos foram capazes de alterar a expressão de algumas proteínas envolvidas na resposta imune em *D. saccharalis*, importantes para o entendimento deste processo e também para o apontamento de substâncias com funções antimicrobianas.

Palavras-chave: PAMs; resposta imune inata; Lepidoptera

## IMMUNE RESPONSE PROTEINS EXPRESSED IN THE HEMOLYMPH OF *DIATRAEA SACCHARALIS* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN RESPONSE TO DIFFERENT MICROORGANISMS

The *Diatraea saccharalis* is the pest responsible for a great economic loss to the cultivation of sugar cane. As well as others members of Lepidoptera order, the *D. saccharalis* has a fast and efficient immune innate response, characterized by primary defense barrier, cellular immune response and humoral immune response. The antimicrobial peptides (AMPs) are included in humoral immune response that show cationic and amphiphilic characteristics besides its low molecular weight, what makes them potentially therapeutic agents. In this study were analyzed proteins with low molecular weight differently expressed in the hemolymph of *D. saccharalis*, after the interval of six and twelve hours of humoral immune response induction with different microorganisms compared to non-challenged worms (control). The 5th instar worms were divided in groups (n= 50) and submitted to six and twelve hours of septic challenges: control (group 1), challenged by *Bacillus subtilis* ATCC 6623 (group 2), challenged by *Escherichia coli* ATCC 11229 (group 3), and challenged by *Beauveria bassiana* 88 strain (group 4). In each worm was inoculated a known concentration of microorganism, and after the established time, the hemolymph was collected. The low molecular weight proteins were obtained submitting each hemolymph sample to an extraction solution containing Methanol, Acetic Acid and Water. After that, the protein extracts were concentrated in columns and protein dosage was realized in 280 nm. About 500 µg of proteins were submitted to two-dimensional electrophoresis (2-DE). The spots were excised from gels, digested with Trypsin and submitted to MALDI-ToF/ToF type mass spectrometry. The identification of protein orthologs was realized using the obtained data against the data available on the MASCOT online server (Matrix science), with the database (NCBI and Swiss rot) specified for *Drosophila melanogaster* and an internal database of Lepidoptera. The TagIdent tool was utilized for searching proteins through their molecular weight and isoelectric point. It was possible to identify eighteen proteins, of which twelve demonstrated to be involved with immune response in *D. saccharalis*. The six hours septic challenge with *B. subtilis* was responsible for modification of expression of Peptidoglycan recognition protein (PGRP), for increase of expression of Chitin-binding protein and for induction of expression of proteins like the Attacin-A and the Serine-protease inhibitor-like. The six hours septic challenge with *E. coli* increased the expression of a putative defense protein. The twelve hours septic challenge using *B. subtilis* and *E. coli* were responsible for increase of expression of Lysozyme. The six hours septic challenge with *B. bassiana* induced of expression of a Cecropin A2 and a Drosomycin-like. On the order hand, after twelve hours of fungal challenge, there was the induction of expression of multifunctional protein Apolipoporphin-3. It was concluded that the septic challenge with different microorganisms were capable of change the expression of some proteins involved in the immune response in *D. saccharalis*, significant for understanding this process as well as for pointing the substances with antimicrobial functions.

Keywords: AMPs; innate immune response; Lepidoptera.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>INTRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
Objetivo Geral .....	10
Objetivos Específicos .....	10
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<i>Diatraea saccharalis</i> .....	11
Resposta imunológica dos insetos .....	12
Peptídeos antimicrobianos .....	14
Peptídeos antimicrobianos em insetos.....	16
Resistência aos antibióticos .....	17
Busca por novos antibióticos.....	19
Abordagem proteômica para identificação de novos PAMs .....	21
<b>CAPÍTULO I</b> .....	23
Proteínas de resposta imune expressas na hemolinfa da <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) em resposta a diferentes microrganismos. (Artigo submetido à revista Archives of Insect Biochemistry and Physiology, QUALIS/CAPES B2)	
<b>RESUMO</b> .....	23
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24

<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
Manutenção da cultura de <i>D. saccharalis</i> .....	25
Desafio imunológico das lagartas de 5º instar .....	25
Coleta das amostras de hemolinfa .....	26
Extração das proteínas da hemolinfa .....	26
Dosagem de proteínas no extrato proteico .....	26
Focalização isoeétrica (IEF) das proteínas extraídas .....	27
Eletroforese bidimensional (2-DE), análise das imagens de géis e digestão com Tripsina .....	27
Espectrometria de massas MALDI-ToF/ToF (Matri-Assisted Laser Desorption Ionization).....	28
Identificação de proteínas nas bases de dados .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	29
Dosagem de proteínas nas amostras controle e desafiadas.....	29
Eletroforese bidimensional (2-DE).....	29
Identificação de proteínas nas bases de dados .....	36
<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO</b> .....	45
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
Referências bibliográficas da revisão de literatura .....	46
Referências bibliográficas do Capítulo I .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Extrato proteico das amostras de hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> coletadas 6 e 12 horas após injúria séptica.....	35
Tabela 2 Spots diferencialmente expressos no extrato proteico da hemolinfa das lagartas de <i>D. saccharalis</i> após desafios sépticos de 6 horas com diferentes microrganismos .....	38
Tabela 3 Spots expressos no extrato proteico da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> apenas na condição de desafio séptico de 6 horas .....	39
Tabela 4 Spots diferencialmente expressos no extrato proteico da hemolinfa das lagartas de <i>D. saccharalis</i> após desafios sépticos de 12 horas com diferentes microrganismos .....	41
Tabela 5 Spots expressos no extrato proteico da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> apenas na condição de desafio séptico de 12 horas .....	42
Tabela 6 Proteínas da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> identificadas por espectrometria de massas (MASCOT) ou PM e pl (TagIdent).....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração dos mecanismos de perturbação da membrana exercidos pelos peptídeos antimicrobianos. (A) Modelo barrel-stave. (B) Modelo carpet-like. (C) Modelo toroidal.....	21
Figura 2 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas de baixo peso molecular extraídas da hemolinfa das lagartas de <i>D. saccharalis</i> após 6 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico controle. (b) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com <i>B. subtilis</i> . (c) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com <i>E. coli</i> . (d) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com <i>B. bassiana</i> . Padrão de peso molecular LMW (GE Healthcare) .....	37
Figura 3 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas de baixo peso molecular extraídas da hemolinfa das lagartas de <i>D. saccharalis</i> após 12 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico controle. (b) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com <i>B. subtilis</i> . (c) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com <i>E. coli</i> . (d) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com <i>B. bassiana</i> . Padrão de peso molecular LMW (GE Healthcare).....	40

## INTRODUÇÃO

A espécie *Diatraea saccharalis*, pertencente à ordem Lepidoptera, é uma lagarta encontrada na cana-de-açúcar e em outras gramíneas. Trata-se de uma praga que pode causar danos graves para a cultura, e devido a sua relevância vem sendo utilizada como objeto de estudo para realização do seu controle.

Os insetos encontram-se constantemente em contato com patógenos sendo necessário que desenvolvessem um sistema imunológico muito eficiente. Na primeira linha de defesa são encontrados o tegumento, o sistema respiratório e digestivo, já na hemocele encontram-se as substâncias que agem como antimicrobianos e exercem as mais diferentes funções imunológicas como aglutinação, ativação de enzimas proteolíticas, produção de melanina e síntese de peptídeos antimicrobianos através do tecido gorduroso.

Os peptídeos antimicrobianos, também denominados PAMs, podem ser produzidos por mamíferos, anfíbios, insetos, fungos, vegetais e animais marinhos em resposta a uma injúria. O mecanismo de ação é baseado na carga catiônica e hidrofobicidade, permitindo que estes se liguem às membranas de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, causando perturbação e assim destruindo a seletividade da barreira, tornando-a suscetível à passagem de várias substâncias presentes no ambiente próximo.

Pelo fato de estarem envolvidos em processos inflamatórios, os PAMs tornaram-se importantes objetos de estudo para possíveis adjuvantes de vacinas ou imunoestimulantes. Já o seu mecanismo de ação despertou o interesse para seu uso como fármacos, o que levaria a uma diminuição do uso de antibióticos largamente prescritos e causadores de resistência.

Levando em conta a importância que os PAMs demonstram na resposta imunológica dos insetos, e o fato de que alguns antibióticos já utilizados na clínica seguem o mesmo princípio para atacar microrganismos, a análise e a possível identificação destes se tornam relevante.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Analisar a expressão diferencial de proteínas e peptídeos de baixo peso molecular que estejam presentes na hemolinfa da *D. saccharalis* após indução da resposta imunológica pelo desafio séptico das lagartas com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* e o fungo *Beauveria bassiana*, com o uso de técnicas proteômicas como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF/ToF.

### **Objetivos Específicos**

Verificar a presença de peptídeos com baixa massa molecular nas amostras de hemolinfa obtidas após desafio séptico; separar os peptídeos por meio da eletroforese bidimensional; realizar a identificação das proteínas presentes através da espectrometria de massas por comparação dos espectros de massas obtidos com os depositados no banco de dados MASCOT Database ou através da ferramenta TagIdent; relacionar a expressão de peptídeos com a resposta imunológica do modelo de estudo por meio da comparação entre os experimentos controle e desafiados.

## REVISÃO DE LITERATURA

### ***Diatraea saccharalis***

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (2017), estima-se que na safra de 2017/18 seja produzido um total de 647,6 milhões de toneladas desta cultura.

Outros países também são grandes produtores como a Índia, México, China e Estados Unidos. Por ser uma cultura amplamente distribuída, um dos maiores desafios atualmente é aumentar o rendimento da produção muitas vezes prejudicado pela ação das pragas, em especial a broca-da-cana (SANCHES et al., 2017).

A ordem das lepidópteras apresenta sistemática bem estabelecida e é constituída de uma série de mariposas monófagas e polífagas com grande potencial para se tornarem pragas de alguns cultivos como a cana-de-açúcar, milho, sorgo, arroz e outras espécies. A *D. saccharalis*, popularmente conhecida como broca-da-cana, pode atingir a cana de açúcar em qualquer um dos estágios de cultivo (SILVA-BRANDÃO et al., 2011; CAPELI, 2012).

A *D. saccharalis* é responsável por danos preocupantes na planta da cana de açúcar, os quais podem acontecer de forma direta ou indireta. Como dano direto tem-se a formação de túneis no interior do colmo pela ação da lagarta e a consequência para a planta é a perda de peso e o seu derrubamento pelo vento. Os danos indiretos consistem na penetração de microrganismos como os fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* no interior destes colmos ocasionando podridão (PAULI, 2009; MEDEIROS et al., 2016).

O ciclo da broca-da-cana inicia com a postura dos ovos (entre 2 e 50), que eclodem dentro de um período de quatro a seis dias. Em seguida, as lagartas em desenvolvimento passam a se alimentar e permanecem por duas semanas na região dos entrenós. A partir daí começam a escavar o colmo. O estágio intermediário de pupa ocorre nos espaços criados pela larva no interior da planta e dura de oito a nove dias. Na fase adulta se apresenta na forma de uma mariposa cor de palha de hábitos noturnos, que permanece viva entre três e oito dias. Quando são criadas em dieta artificial, o estágio larval tende a apresentar seis estágios (CAPINERA, 2001; PAULI, 2009).

## Resposta imunológica dos insetos

Segundo Kingsolver et al. (2013), os insetos não possuem resposta imune adaptativa, porém, a resposta imune inata dos insetos é extremamente eficiente e funciona devido à ação das proteínas de reconhecimento de padrões (PRPs) que fazem a detecção de moléculas presentes no patógeno que não existem no hospedeiro, a partir disso se inicia uma cascata de sinalização que termina com a produção de moléculas capazes de impedir a replicação dos patógenos.

As proteínas responsáveis pelo reconhecimento das moléculas são capazes de reconhecer os lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas, o peptidoglicano (PGN) das bactérias Gram-positivas e o  $\beta$ -1,3-glucano dos fungos. Após interação com os patógenos, acontece sinalização para ativação de diferentes cascatas que acabam estimulando a expressão de genes de proteínas participantes da resposta imune inata (GILBERT, 2012).

No geral, bactérias Gram-positivas ativam a produção de moléculas antibacterianas por meio do receptor transmembranar Toll, porém, bacilos Gram-positivos, como é o caso do *B. subtilis* utilizado neste trabalho, devido à presença do ácido diaminopimélico (DAP) em sua parede, utilizam a via do receptor IMD para indução da expressão de genes de PAMs (BISCHOFF et al., 2004).

A resposta imunológica dos insetos consiste da barreira primária de defesa (tegumento, sistema respiratório e digestivo), da resposta imune celular e humoral. A principal porta de entrada para os microrganismos é o sistema digestivo, onde alcançam a mucosa gastrointestinal e a colonizam. Depois disso, podem: passar a fazer parte da flora comensal ou se tornarem patogênicos e levar a indução da resposta imunológica (KOUNATIDIS & LYGOXIGAKIS, 2012).

A resposta imune celular caracteriza-se por fagocitose e formação de cápsula, mediados pelos hemócitos. Por sua vez, a resposta imune humoral inclui melanização e coagulação devido a cascatas proteolíticas acontecendo na hemolinfa, produção de peptídeos antimicrobianos sintetizados pelo tecido gorduroso, produção de polifenolxidase, lisozima, lectina, inibidor de proteinase e fator antivírus (UTTENWEILER-JOSEPH et al., 1998; ZHANG et al., 2017).

Os insetos contam com a presença e a ação de células que circulam na sua hemolinfa, os chamados hemócitos. O processo de hematopoese ocorre quando o inseto está na fase de embrião e se estende ao longo da vida. Quando se torna larva, a segunda fase passa a acontecer no órgão conhecido como gânglio linfático,

onde estão contidos os progenitores para os hemócitos funcionais. Esses componentes conseguem fornecer uma resposta imunológica rápida, sendo estas as primeiras células de defesa, pois são responsáveis por reconhecer e interagir com receptores presentes na superfície dos invasores (HILLYER, 2016).

A fagocitose é realizada pelos hemócitos circulantes e sésseis (resposta imune celular). Neste processo, o patógeno é reconhecido por meio de um receptor da superfície por ser estranho ao organismo do inseto. A partir daí, ocorre a internalização do patógeno em uma vesícula, o fagossoma. Dentro dessa vesícula, ocorre a liberação de enzimas líticas que digerem a partícula (SILVA, 2014).

Os hemócitos granulares podem apresentar grânulos grandes e pequenos. Nos grandes ficam armazenados os fatores responsáveis pela coagulação da hemolinfa, inibidores de proteases e lectinas. Por sua vez, nos grânulos pequenos se encontram substâncias antimicrobianas como taquiplesinas, fator anti-LPS, big-defensina, taquicitina e taquistatinas, sendo as duas últimas conhecidas como proteínas ligadoras de quitina (OSAKI et. al., 1999; SILVA JUNIOR, 2000).

Incluídos na resposta imune humoral temos o processo de coagulação, que consiste na formação de uma malha de proteínas como um artifício para impedir que o patógeno se espalhe na hemolinfa; e a melanização, que ocorre em casos onde a fagocitose não é eficiente e é caracterizada pela formação de uma camada de melanina ao redor do patógeno, causando sua morte por impedimento de acesso aos nutrientes presentes da hemolinfa (KOUNATIDIS & LYGOXIGAKIS, 2012; HILLYER, 2016).

A melanização é um importante passo da resposta imune humoral dos insetos onde ocorre a ativação de uma cascata proteolítica após as PRPs entrarem em contato com carboidratos presentes na superfície de fungos e bactérias (GILBERT, 2012).

A fenoloxidase (PO), presente na hemolinfa como profenoloxidase (PPO), é a enzima responsável por fazer a conversão de extratos monofenólicos e difenólicos para o-quinonas, estas se polimerizam para formar a melanina ao redor dos invasores. A profenoloxidase é produzida pelos hemócitos e, além da hemolinfa, pode estar presente na cutícula do inseto. Sua estrutura consiste em duas cadeias de subunidades polipeptídicas semelhantes, a profenoloxidase-1 e -2 (LI et al., 2009).

Também como parte da resposta imune humoral está incluída a produção de moléculas efetoras conhecidas como peptídeos antimicrobianos ou PAMs, que são proteínas com massa molecular baixa, produzidas pelo tecido gorduroso dos insetos e liberadas na hemolinfa. Causam a morte dos invasores por meio da ação desestabilizadora na membrana celular (KOUNATIDIS & LYGOXIGAKIS, 2012).

### **Peptídeos antimicrobianos**

Os PAMs estão presentes em muitos organismos como, por exemplo, plantas, anfíbios, insetos e mamíferos, e em todos apresenta a finalidade de desenvolvimento de uma resposta imunológica rápida devido a uma injúria por meio de uma baixa concentração (JENSSEN et.al., 2006; ULMSCHNEIDER, 2017).

Constituídos basicamente por 10-50 resíduos de aminoácidos (1100 - 5500 Da), são catiônicos e anfifílicos, codificados por genes e sintetizados nos ribossomos. Podem ser classificados conforme o seu tamanho, conformação estrutural e aminoácidos que os compõem (GANZ, 2003; CHUNG e KAHNUM, 2016).

Os PAMs podem ser agrupados em quatro classes de estruturas secundárias. Como estruturas principais e largamente observadas temos as  $\alpha$ -hélices, que se formam quando o peptídeo entra em contato com a membrana do microrganismo, e as folhas- $\beta$  que são estruturas estabilizadas por ligações dissulfeto 2,4. As estruturas menos comuns, mas também observadas, são as curvadas e as estendidas (VERLY, 2010).

A imunidade inata dos organismos demonstra extrema importância na resposta imunológica, visto que não depende de moléculas especializadas, acontecendo rapidamente. Foi verificado que, quando os organismos são desafiados por patógenos, a produção de PAMs acontece em poucas horas após a invasão, e estes são responsáveis por produzirem ações realmente eficazes contra os invasores (VILCINSKAS, 2015).

Sabe-se que os PAMs podem atuar por meio de alguns mecanismos de ação diferentes: a perturbação da membrana, sendo o mecanismo melhor esclarecido, a inibição da divisão celular e a intercalação nos ribossomos (TIELEMAN, 2017).

A interação com lipídios é crucial no direcionamento dos PAMs, pois é aqui que ocorre a diferenciação das células bacterianas, que são, no geral, carregadas negativamente em sua superfície, das células de mamíferos, que possuem fosfatidilcolina e colesterol em sua composição. As cargas positivas interagem

facilmente com as cargas negativas dos fosfolípidios constituintes da membrana dos invasores, a característica hidrofóbica acaba se somando ao caráter básico, o que facilita a interação com a membrana e permite a sua lise (FUKUZAWA, 2007; LIPKIN e LAZARIDIS, 2017).

Até o momento, três formas de interação dos PAMs com as membranas foram descritas (Figura 1a; Figura 1b; Figura 1c). Primeiramente, o modelo barrel-stave onde as moléculas do peptídeo reorientam-se, formando agregados cilíndricos que criam poros na membrana. O segundo modelo é conhecido como toroidal, onde as cargas negativas da membrana do invasor interagem com as cargas positivas do peptídeo antimicrobiano, estes se agregam e conduzem a reorientação dos fosfolípidios acarretando a formação de poros. Por último, o chamado de carpet-like, onde também atraídas pela diferença de cargas, as moléculas de PAMs se acumulam paralelamente à superfície da membrana e causam desagregação (ação detergente) (IAVICOLI et al., 2016).

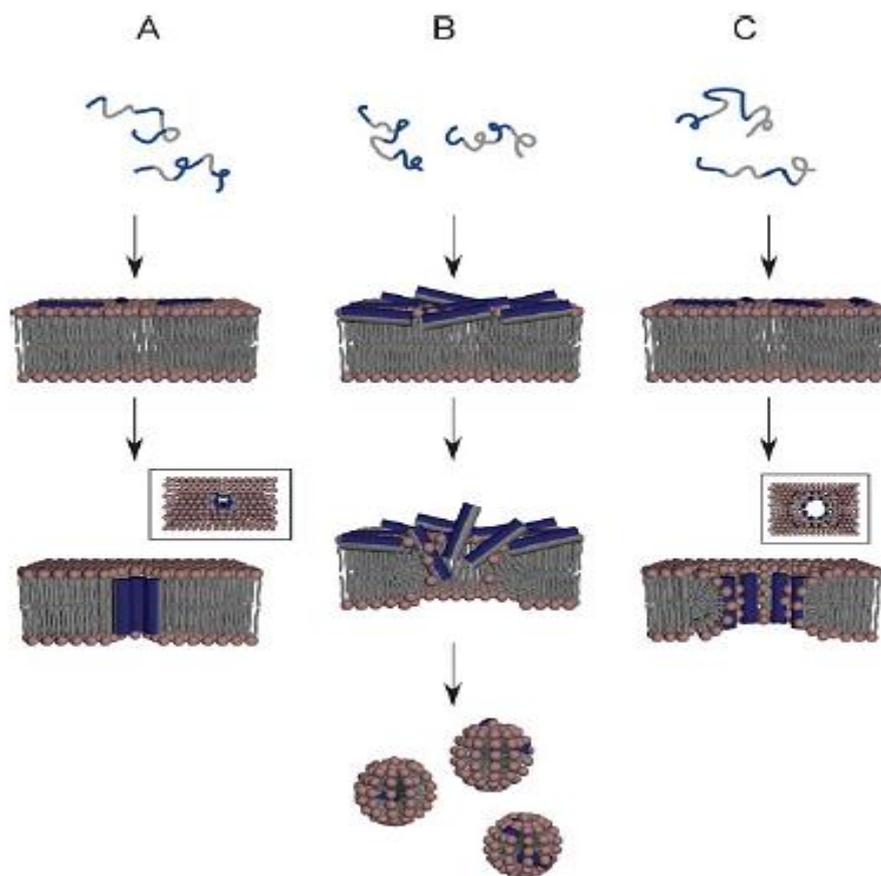


Figura 1 Ilustração dos mecanismos de perturbação da membrana exercidos pelos peptídeos antimicrobianos. (A) Modelo barrel-stave. (B) Modelo carpet-like. (C) Modelo toroidal. Figura modificada de Toke (2005).

O processo de obtenção, purificação e caracterização dos PAMs esbarra em alguns obstáculos, como a baixa quantidade geralmente encontrada nos organismos vivos e as suas características complexas, apesar disso, é de extrema importância o sucesso das etapas para que estudos sobre as suas propriedades e aplicações sejam realizados. Muitos PAMs já foram identificados por meio das mais variadas fontes e também por mecanismos de hidrólise de proteínas (TANG et al., 2015).

### **Peptídeos antimicrobianos em insetos**

A produção de peptídeos antimicrobianos vem sendo descrita nas mais diversas ordens de insetos ao longo dos anos, entre elas: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Trichoptera e Odonata. Os insetos possuem as Proteínas de Reconhecimento de Padrão (PRPs), que são responsáveis por detectar a presença de um invasor e se ligarem ao padrão molecular associado ao patógeno. Posterior a essa ligação, ocorre a ativação das diferentes vias de regulação da resposta imune inata: na hemolinfa, onde ocorre a fagocitose e outras cascatas, e no corpo gorduroso, capaz de produzir e, em seguida, liberar moléculas efetoras na hemolinfa, como os peptídeos antimicrobianos e outras lisozimas. Toda essa ativação já se demonstrou eficiente contra fungos, bactérias e vírus (CYTRYNSKA et.al., 2007; JIANGFAN et.al., 2016).

A *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda, é um modelo muito bem estudado com relação à produção de peptídeos. Durante o seu desenvolvimento, é evidente a produção de proteínas que apresentem até 30 kDa, uma vez que a presença de aproximadamente 380 proteínas foi constatada no tecido gorduroso no estado larval. As proteínas são produzidas no corpo gorduroso principalmente no estágio final de larva, antes de se tornarem pupa (5<sup>o</sup> instar), e então transportadas para a hemolinfa com a finalidade de atingirem o seu tecido alvo (PAKKIANATHAN et.al., 2012).

Depois de constatada a produção dos PAMs pelos insetos (STEINER et al., 1981) e também o seu envolvimento na imunidade inata, estes despertaram a curiosidade da ciência, e assim já existe uma quantidade considerável de peptídeos identificados. Alguns dos insetos muito bem estudados até então incluem *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum* e *Bombyx mori* (TIAN et.al., 2010).

Os PAMs de insetos conhecidos estão agrupados em classes, sendo elas: defensinas, cecropinas, atacinas, lebecinas, moricinas e gloverinas. As defensinas possuem aproximadamente 4 kDa, são catiônicas e demonstraram sua atividade principal contra bactérias Gram-positivas, atividade contra Gram-negativas e alguns fungos. As atacinas possuem peso molecular maior, entre 20 e 23 kDa, e demonstrou atividade principalmente contra *E.coli*. As gloverinas possuem massa molecular de aproximadamente 14 kDa e foram identificadas somente na ordem Lepidoptera, apresentando atividade principal contra *E. coli* e alguns de seus mutantes (YI et.al., 2014; SINGH et.al., 2014).

### **Resistência aos antibióticos**

A problemática dos antibióticos vem sendo relatada há muitos anos e ganhando destaque recentemente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017), 12 famílias de bactérias necessitam urgentemente de novos antibióticos, pois já são ou estão se tornando resistentes a todos os medicamentos conhecidos.

No momento em que foram descobertos, os antibióticos tornaram-se uma arma poderosa contra as infecções bacterianas, mas sua obtenção custava caro e seu uso acabou sendo restrito. Com o passar dos anos, o custo foi reduzido e a comunidade teve acesso a esses medicamentos, iniciando uma utilização desenfreada e de forma errônea que se estende até os dias atuais. Alexander Fleming alertou sobre os excessos que estariam acontecendo e mais tarde constatou o desenvolvimento de resistência aos antibióticos por parte dos microrganismos (ALANIS, 2005; SIDRACH-CARDONA et al., 2014; CHAKRABORTI et al., 2014).

De 1930 a 1960 ocorreu uma explosão na descoberta de produtos naturais com atividade antimicrobiana (conhecida como a “era de ouro”), e foi neste período que apareceram classes conhecidas até hoje como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, peptídeos e alguns outros. Entre os anos de 1960 e 1980 algumas substâncias semissintéticas com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram desenvolvidas. A partir de 1980, as ferramentas para descoberta de novos antibióticos mudaram, porém muito pouca novidade apareceu neste período, e concomitante a isso tivemos um aumento no aparecimento de resistência por parte dos microrganismos (GUIMARÃES et al., 2010).

Os antibióticos são moléculas relativamente pequenas cujo peso varia de 150-5000 Da. A origem dessas substâncias pode variar sendo ela natural, sintética ou semissintética. Também podem ser classificadas quanto ao efeito causado sobre os microrganismos: sendo bactericida, ou seja, causando a morte do microrganismo, ou podendo atuar de forma bacteriostática, impedindo o crescimento das bactérias (FERRI et al., 2015).

Após a explosão de descoberta de drogas antibacterianas estabeleceu-se uma calma preocupante e junto com ela trouxe o aparecimento de cepas resistentes aos tratamentos existentes como, por exemplo, as enterobactérias resistentes ao Carbapenem (CRE), o segmento de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA), os organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e o que se conhece por KPC, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (HUTTNER et al., 2013).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos acontece devido a uma característica natural de evolução e adaptação. Como o tempo de reprodução das bactérias é pequeno, em apenas algumas horas é possível que várias gerações tenham sido produzidas e a possibilidade de passagem dos genes responsáveis pela resistência aumenta, uma vez que as bactérias fazem troca de material genético (SILVEIRA et al., 2006; FERRI et al., 2015).

As bactérias podem se tornar resistentes por meio de mutações espontâneas de genes ou por pressão do ambiente onde se encontram. Também podem adquirir resistência devido ao compartilhamento de material genético, uma vez que os genes responsáveis ficam localizados em uma região chamada de transposon, o que acaba facilitando a passagem destes genes de um plasmídeo para o outro (ALANIS, 2005; FERRI et al., 2015).

Os microrganismos podem apresentar dois tipos de resistência às drogas antibióticas: a natural, que acontece sem que a bactéria tenha sido exposta ao agente antimicrobiano anteriormente, ou a adquirida, que ocorre após as trocas genéticas citadas anteriormente. A resistência natural manifesta-se por meio da ausência de um processo importante para a ação da droga, pela produção de enzimas capazes de inativar o antimicrobiano ou por alguma característica da morfologia da bactéria. Por sua vez, a resistência adquirida pode se manifestar por meio de alterações na permeabilidade da membrana, no local de ação, diminuindo a

afinidade da droga por ele, na bomba de efluxo, e, por fim, nos mecanismos enzimáticos, onde as enzimas produzidas inativam o antimicrobiano (BAPTISTA, 2013; RIBEIRO e CORTINA, 2016).

### **Busca por novos antibióticos**

As drogas antimicrobianas podem apresentar amplo ou estreito espectro de ação. Aquelas que possuem amplo espectro são mais interessantes para a comunidade médica e para a indústria farmacêutica, visto que possuem maiores possibilidades de indicações. Ambas podem ser combinadas para driblar a resistência natural de bactérias, por exemplo, um inibidor de  $\beta$ -lactamase associado a um  $\beta$ -lactâmico. Infelizmente, essas drogas são difíceis de serem desenvolvidas com esta característica de amplo espectro, diminuindo o interesse e os investimentos na pesquisa de novas substâncias antibióticas que não trarão o retorno esperado (ZHENG et al., 2017).

A Vancomicina trata-se de um antibiótico da classe dos glicopeptídeos que há 50 anos vem sendo utilizado na prática clínica como última alternativa no tratamento de infecções por MRSA devido ao seu mecanismo de ação baseado na inibição da síntese da parede celular. As bactérias demonstram dificuldade em adquirir resistência a este mecanismo, porém, nos últimos anos, a concentração inibitória mínima do medicamento vem aumentando e chamando a atenção da comunidade hospitalar (ANVISA, 2007; OBARA et al., 2016).

Uma saída a esta falta de medicamentos antimicrobianos disponíveis e a crescente aparição de microrganismos resistentes é a utilização de drogas que geralmente são utilizadas para outros problemas de saúde, mas que dentro das bactérias se comportam de maneira diferente e podem causar a sua morte. A Auranoquina, por exemplo, é um medicamento utilizado no tratamento de artrite reumatoide, mas que demonstrou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e bactérias resistentes a outros antimicrobianos como *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (HARBUT et al., 2015).

Outro caminho que vem sendo largamente explorado é o dos PAMs, visto que estão presentes em plantas, vertebrados e invertebrados, e nestes últimos se demonstram essenciais na proteção contra patógenos que os acometem, apresentando alta atividade antimicrobiana (MELONI et al., 2015).

Quando os PAMs entram em contato com o organismo humano nem sempre se comportam da forma esperada, e isso é um dos obstáculos na sua implantação no uso clínico. Como exemplos de reações indesejadas tem-se a atividade hemolítica desempenhada por eles, a rápida degradação no corpo, a redução da atividade devido à sensibilidade ao sal e o alto custo de produção. Apesar disso, existem alternativas que podem ser eficazes para contornar esses problemas (AOKI e UEDA, 2013).

A presença desses peptídeos pode ser verificada, por exemplo, na praga do tabaco conhecida como *Manduca sexta*, onde já foi relatada a presença de peptídeos antimicrobianos como atacinas, cecropinas, moricinas, lelocinas e gloverinas, capazes de apresentar tanto atividades antimicrobianas quanto antifúngicas (SOUHAIL et al., 2016).

Silva et al. (2010) detectou a presença de um PAM da classe das gloverinas em lagartas de *D. saccharalis*. Rocha et al. (2016) também descreveram em seu trabalho com *D. saccharalis* a presença de uma proteína com características de massa molecular e ponto isoelétrico sugestivas de uma atacina.

Já foi demonstrada a atividade contra a formação de biofilmes por *S. aureus* com o peptídeo antimicrobiano sintético NA-CATH:ATRA1-ATRA1 e o peptídeo natural LL-37 (CHUNG e KAHNUM, 2016).

Infelizmente, a atividade antimicrobiana *in vitro* não é suficiente para dizer que a substância irá funcionar *in vivo*. Sendo assim, Yagi et al. (2017), verificando a atividade *in vitro*, testaram atividade de lariatinas e calpinactama (sendo os dois peptídeos) contra *Mycobacterium* em bichos da seda, obtendo resultados positivos. O uso de modelos como o bicho-da-seda para testes antifúngicos vem sendo explorado também por outros pesquisadores como alternativa a modelos animais. Ishii et al. (2017) usaram este modelo para testar atividade antifúngica de um novo composto, o ASP2397.

A busca por novas substâncias que venham a servir de protótipos na produção de novos medicamentos não para, e a atual aliada nessa procura é a genômica, já que muitos dos microrganismos produtores dessas substâncias não são cultiváveis em laboratório (GUIMARÃES et.al., 2010).

## **Abordagem proteômica para identificação de novos PAMs**

As proteínas presentes nos organismos vivos são todas codificadas por genes e podemos chamar o mapa de expressão de todas elas de proteoma. O proteoma é dinâmico, visto que as proteínas que aparecem em determinado momento podem não aparecer em outros, uma vez que sofrem ação do estado fisiológico do organismo (BARBOSA et al., 2012).

O processo de identificação de proteínas inclui várias etapas, começando pela extração destas do seu local de origem, seguido da sua separação por meio da eletroforese bidimensional. Depois disso, as proteínas devem ser transformadas em uma solução de peptídeos com o auxílio de enzimas que irão clivá-las. Esta solução é transferida para um analisador de massas, onde se obtém um espectro de massas característico para cada peptídeo analisado, chamado de Peptide Mass Fingerprint (PMF). O passo seguinte consiste em fragmentar os picos obtidos por meio de colisão com um gás inerte para a obtenção de espectros MS/MS. Com essas informações é possível analisar os dados de PMF e MS/MS contra bancos de dados e identificar as proteínas (CANTÚ et al., 2008).

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE) foi descrita pela primeira vez por O'Farrell no ano de 1975 e vem sendo utilizada até hoje. Esta técnica permite a análise de amostras complexas e com elevado número de proteínas. Na primeira dimensão, a amostra é aplicada em tiras com gradiente de pH específico, e submetidas a uma corrente elétrica, onde as proteínas são separadas conforme o seu ponto isoelétrico (pI). Na segunda dimensão, as amostras previamente focalizadas são separadas conforme suas massas moleculares. Assim é possível a visualização de proteínas que tenham a mesma massa molecular, mas apresentem pI diferentes. Para visualização dos spots produzidos no gel de poliacrilamida, é feita a coloração com o corante azul de Coomassie, Nitrato de Prata ou outros corantes disponíveis no mercado (LANÇAS et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2007).

Visto que a técnica 2-DE não fornece uma identificação direta das proteínas, as espectrometrias de massa foram adotadas para suprir essa necessidade. Os aparelhos que realizam essa técnica podem ser do tipo Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) ou liquid chromatography electrospray ionization tandem-MS (LC-ESI-MS) (TEIXEIRA et al., 2007).

No método de MALDI a amostra é sublimada e ionizada a partir de uma matriz seca e cristalina, pela ação de um laser. No método ESI os analitos são ionizados a partir de uma solução, passando por um campo com voltagem. Assim o primeiro método é utilizado para amostras relativamente mais simples, e o segundo para amostras mais complexas. Ambos são utilizados acoplados a detectores de massa, nos dando assim MALDI-MS E LC-MS (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Depois de ionizadas, as amostras deverão ser analisadas, e para isso temos três tipos mais comuns de analisadores: o ToF (Time of Flight), o quadrupolo e o íon trap. Em analisadores ToF, os íons provenientes da primeira etapa passam por dois eletrodos, sofrendo aceleração e posteriormente passam por um tubo de vácuo em determinada velocidade. Essa velocidade é inversamente proporcional à massa. Os analisadores do tipo quadrupolo (Qs) são formados por quatro eletrodos, funcionando como filtros: somente íons de determinada massa passam, os outros são desviados. Os analisadores do tipo íon trap aprisionam os íons de interesse em um campo elétrico e os liberam de forma crescente conforme suas massas (BARBOSA et al., 2012).

Em insetos modelo, essa análise proteômica é aplicada para identificação de novos PAMs. Cytryn´ska et al. (2007) identificaram oito peptídeos da hemolinfa de *Galleria mellonella* por meio da espectrometria de massas. Souhail et al. (2016) utilizaram esta metodologia para caracterizar um peptídeo antifúngico de *Manduca sexta* e, Hou et al. (2016) utilizaram a espectrometria de massas para realizar análise proteômica comparativa da hemolinfa de *Bombyx mori* durante os estágios de metamorfose.

Neste estudo foram aplicadas metodologias de Proteômica com o objetivo de identificar, além de PAMs, outras proteínas envolvidas na resposta imune em *D. saccharalis*, espécie que foi adotada como modelo para estudo de PAMs no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Unioeste.

## Capítulo I

### **Proteínas de resposta imune expressas na hemolinfa da *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em resposta a diferentes microrganismos**

Ana Cláudia Malagutti CORSATO, José Luis da Conceição SILVA.  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, 85819-110

#### **RESUMO**

Os integrantes da ordem Lepidoptera possuem um sistema imune inato muito eficiente composto por respostas celulares e humorais. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão diferencial de proteínas envolvidas na resposta imunológica na hemolinfa da *D. saccharalis*, induzidas por diferentes microrganismos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Beauveria bassiana*) em tempos diferentes de desafio (6 e 12 horas). As amostras de hemolinfa das lagartas desafiadas e não desafiadas (controle) foram submetidas à eletroforese bidimensional (2-DE) e à espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF/ToF para identificação das proteínas. Foram identificadas dezoito proteínas ortólogas, das quais doze se mostraram envolvidas com a resposta imune em *D. saccharalis*. O desafio séptico de 6 horas com a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* foi responsável pela alteração na expressão da proteína de reconhecimento de peptidoglicano (PGRP), pelo aumento da expressão da proteína ligadora de quitina e pela indução da expressão de proteínas como a Atacina-A e a proteína inibidora de serino-protease. O desafio imunológico de 6 horas com *E. coli* levou ao aumento da expressão de uma provável proteína de defesa. Os desafios de 12 horas utilizando as bactérias *B. subtilis* e *E. coli* se mostraram responsáveis pelo aumento da expressão da Lisozima. O desafio de 6 horas com *B. bassiana* causou indução da expressão de uma Cecropina A2 e uma possível Drosomicina. Por sua vez, após o desafio fúngico de 12 horas, houve a indução da expressão da proteína multifuncional Apolipoforina-3. Concluiu-se que as proteínas que sofreram alterações na sua expressão após realização do desafio séptico possivelmente estão envolvidas na resposta imune humoral e são de grande importância para o entendimento do processo imune em *D. saccharalis* e para o apontamento de substâncias com importantes funções antimicrobianas.

Palavras-chave: resposta imune inata, Lepidoptera, microrganismos

## INTRODUÇÃO

A *Diatraea saccharalis* é uma praga que ataca principalmente a cultura de cana-de-açúcar, podendo causar danos diretos (formação de túneis no interior do colmo) e indiretos à planta (penetração de microrganismos no colmo resultando em podridão). Devido a sua relevância, vem sendo utilizada como objeto de estudo para realização do seu controle (Pauli, 2009; Medeiros et al., 2016).

A resposta imune inata dos insetos é rápida e eficiente, podendo ser classificada em humoral ou celular (Kingsolver, Huang & Hardy, 2013). A resposta imune celular é aquela mediada por hemócitos que inclui fagocitose e formação de cápsula. Por sua vez, a resposta imune humoral inclui melanização e coagulação acontecendo na hemolinfa por meio da produção de enzimas pelos hemócitos e sua liberação na circulação, e a produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) pelo tecido gorduroso (Zhang et al., 2017).

Os PAMs apresentam características como baixa massa molecular, são catiônicos e anfifílicos. O seu mecanismo de ação baseado na perturbação da membrana tornaram estas moléculas objeto de estudo para um possível tratamento de microrganismos resistentes aos antibióticos existentes (Chung e Kahnum, 2016; Vilcinskas, 2015; Meloni, Candusso, Galeotti & Volpati, 2015).

Visto que em insetos a produção de PAMs já é descrita há tempos em modelos de estudo como *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, entre outros, estes já são agrupados em classes, sendo elas: defensinas, cecropinas, atacinas, lebecinas, moricinas e gloverinas (Tian, Gao, Fang, Ye & Zhu, 2010; Yi, Chowdhury, Huang & Yu, 2014).

O genoma de insetos já sequenciados e a criação de bancos de dados vêm ajudando muito na caracterização de novos genes da imunidade inata de insetos modelos e não modelos, mostrando a diversidade e a aplicação destas biomoléculas (Viljakainen, 2015). A proteômica é a maior aliada na identificação de PAMs em organismos, contando com técnicas como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas (Cantú, Carrilho, Wulff & Palma, 2008).

Neste estudo, o objetivo foi analisar a expressão diferencial de proteínas de baixo peso molecular que estão presentes na hemolinfa após desafio das lagartas de *D. saccharalis* com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* e o fungo *Beauveria bassiana*, aplicando técnicas proteômicas de eletroforese bidimensional

(2-DE) e espectrometria de massas, uma vez que estas proteínas participam do sistema imune inato da broca-da-cana *Diatraea saccharalis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Manutenção da cultura de *D. saccharalis*

As larvas de *D. saccharalis* foram tratadas com uma dieta específica (Hensley & Hammond, 1968) em ambiente controlado, com temperatura média de  $26 \pm 1$  °C e 70% de umidade até atingirem o 5º instar do seu desenvolvimento. Neste momento, foram retiradas dos tubos de dieta, em fluxo laminar, e higienizadas com álcool 70%.

### Desafio imunológico das lagartas de 5º instar

Os microrganismos escolhidos para o desafio imunológico das lagartas foram: a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) como uma bactéria Gram-positiva e o fungo *Beauveria bassiana* (cepa 88). O desafio foi realizado utilizando-se microaplicador de precisão (Burkard-PAX 100-3).

O inóculo de bactérias foi preparado adicionando 50 µL de bactérias conservadas congeladas na presença de glicerol 100% a 5 mL de meio Luria Bertani (LB). O crescimento foi realizado overnight (37 °C, 14-16 horas, 150 rpm). Depois deste período, 1 mL das bactérias crescidas foi transferido para um microtubo, centrifugado (5 minutos, 12 °C a 1520 x g). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com tampão PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3 mM+  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,4mM+  $\text{NaCl}$ 137 mM).

A densidade óptica do inóculo de bactérias foi determinada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 600 nm para padronizar a diluição  $10^6$  células/µL de microrganismos. Cada lagarta foi infectada com 3 µL do inóculo da bactéria correspondente ao seu grupo.

As lagartas também foram desafiadas com uma suspensão de esporos do fungo *B. bassiana*. Em um tubo de ensaio contendo os fungos foi adicionado 10 mL de Água e Tween, posteriormente se realizou as diluições e a contagem de conídios em câmara de Neubauer. A partir da média de conídios/µL preparou-se uma suspensão a  $2 \times 10^8$  conídios/µL, e cada lagarta deste grupo foi infectada com 3 µL da suspensão.

Realizaram-se dois ensaios onde em um deles as lagartas foram desafiadas pelos microrganismos e a amostra foi coletada após 6 horas, e no outro a coleta foi

feita após 12 horas. Em cada um dos experimentos as lagartas foram divididas em quatro grupos: controle, onde a hemolinfa foi coletada diretamente (grupo 1), lagartas desafiadas por *B. subtilis* (grupo 2), lagartas desafiadas por *E. coli* (grupo 3) e lagartas desafiadas por *B. bassiana* (grupo 4). Cada grupo continha aproximadamente 50 espécimes.

### **Coleta das amostras de hemolinfa**

A hemolinfa foi coletada com a ajuda de uma micropipeta automática, através de um pequeno corte realizado com tesoura oftalmológica na extremidade posterior das lagartas e imediatamente transferida para um microtubo imerso em gelo, contendo cristais de Feniltioureia (Sigma®), para evitar a melanização e a ação das proteases. Posteriormente, o material coletado foi centrifugado em 2580 x g (4 °C por 5 minutos) para separar os constituintes celulares, e o precipitado foi descartado. A hemolinfa foi armazenada a -20 °C até o uso.

### **Extração de proteínas da hemolinfa**

Para extração das proteínas de baixo peso molecular da amostra foi utilizada uma solução de extração composta por Metanol, Ácido Acético e Água na proporção de 90: 1: 9. Em um microtubo de 2 mL foi adicionado 150 µL da amostra de hemolinfa com 1,5 mL da solução de extração e centrifugou-se por 30 minutos, a 4 °C, a 20.000 x g. O sobrenadante obtido foi utilizado como amostra contendo os peptídeos de baixo peso molecular (Zdybicka-Barabas et al., 2017).

Posteriormente, as amostras foram filtradas em uma coluna de 3000 Da (Vivaspin 500, Sartorius), que foi submetida à centrifugação por 45 minutos a (20 °C, a 14000 x g). Nesta etapa, os peptídeos menores que 3000 Da passaram pela membrana e os maiores ficaram retidos. Na alíquota de interesse (>3000 Da) foi adicionado 2 µL de inibidor de proteases (Sigma®) para secagem da amostra em banho seco a 42 °C. Depois de secas, foram solubilizadas em 100 µL de água.

### **Dosagem de proteínas no extrato proteico**

A dosagem de proteínas na hemolinfa foi realizada em espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis ( $\lambda = 280$  nm), utilizando-se uma cubeta de quartzo. As amostras foram diluídas 100 vezes e a leitura da Absorbância ocorreu na seguinte ordem: leitura do branco (água) para zerar o aparelho, leitura da solução padrão de

BSA 1mg/mL e a leitura das amostras (Absorbância multiplicada por 100). Assim, obtivemos a seguinte relação para descobrir a concentração de proteínas:

$$\begin{aligned} BSA\ 1mg/mL &\rightarrow Abs\ x \\ Amostra\ de\ hemolinfa &\rightarrow Abs\ y \end{aligned}$$

### **Focalização isoeétrica (IEF) das proteínas extraídas**

500 µg de proteínas totais extraídas de cada amostra foram aplicadas em tiras de gradientes de pH imobilizados (Immobiline drystrips, pH 3-10, GE Healthcare®) para posterior focalização no sistema IPGphor (Amersham Biosciences®). Os parâmetros fixados para focalização isoeétrica foram temperatura de 20 °C e corrente de 0,05 mA por tira de IPG de acordo com os cinco passos: 200 Vhr; 500 Vhr; 800 Vhr; 11.300 Vhr e 12.000 Vhr, acumulando 24.800 Vhr ao final do processo.

### **Eletroforese bidimensional (2-DE), análise das imagens de géis e digestão com Tripsina**

As tiras de gradientes de pH imobilizados (Immobiline drystrips, pH 3-10, GE Healthcare®) contendo as proteínas separadas por ponto isoeétrico passaram por duas etapas: na primeira, as fitas foram mantidas na solução de equilíbrio (Tris-HCl 7,5 mM pH 8.8, Ureia 6 M, Glicerol 29.3 %, SDS 2% e traços de Azul de Bromofenol) adicionada de 1% de ditioneína (DTI) por 30 minutos para a redução dos grupamentos tiólicos das proteínas. Na segunda etapa, as tiras foram mantidas na solução de equilíbrio adicionada de 2,5% de iodoacetamida (IAA) por 30 minutos para a alquilação e estabilização dos grupos tiol das proteínas e eliminação do DTI residual. Por último, as tiras foram transferidas para o gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5% conforme metodologia descrita por Zhou et al. (2008). Foram utilizados 15 µL do padrão de peso molecular para SDS-PAGE (Padrão LMW, GE Healthcare).

Para cada amostra de hemolinfa coletada foi preparado um gel 2-DE. Após a eletroforese os géis foram fixados e corados por Coomassie Coloidal (G-250) overnight. Após o processo de descoloração dos géis, esses foram digitalizados com o auxílio do Image Scanner Amersham.

Os spots proteicos expressos foram identificados com o software ImageMaster 2-DE Platinum 6.0 e os géis das amostras que sofreram desafio séptico foram comparadas com o controle. Assim como Song, Jung, Eum, Hwang &

Han (2008), para verificar se os spots correspondentes foram diferencialmente expressos após desafio imunológico, considerou-se um valor de corte de 1.5 para o Ratio.

Os spots mais evidentes e delimitados de cada gel foram retirados e submetidos à digestão com Tripsina (Promega-USA) de acordo com protocolo de Shevchenko, Wilm, Vorm & Mann (1996).

### **Espectrometria de massas MALDI-ToF/ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)**

Após a digestão das amostras com Tripsina, essas foram submetidas ao espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics®, Autoflex II), onde os peptídeos foram cristalizados juntamente com a matriz sólida (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), seguida do bombardeio desta por um laser ocasionando a ionização da amostra. Os peptídeos sofreram separação pelo analisador ToF (Time of Flight), de acordo com sua massa e carga (peptídeos com menor massa passam mais rápido pelo tubo do que os maiores até chegarem ao detector), gerando um espectro massa/carga.

### **Identificação de proteínas nas bases de dados**

Os espectros de massa/carga gerados foram tratados pelo programa FlexAnalysis 2.0 e posteriormente comparados com os espectros depositados nos bancos do NCBIprot e Swissprot com o servidor MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) especificado para busca contra *Drosophila melanogaster* e contra um banco interno de proteínas de Lepidoptera. Os parâmetros da busca foram ajustados para: modificação fixa Carbamidometil (C) e Oxidação (M) com janela de erro de 200 ppm. A ferramenta TagIdent disponível no site ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://www.expasy.org>), que realiza a busca em bancos de dados de proteínas do UniProtKB/SwissProt considerando o PM e pI experimental da proteína também foi utilizada.

## RESULTADOS

### Dosagem de proteínas nas amostras controle e desafiadas

A concentração de proteínas presentes na hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* após extração foi obtida por meio da leitura em espectrofotômetro ( $\lambda=280$  nm), visto que a metodologia de Bradford (1976), usualmente utilizada para proteínas, nos trouxe resultados superestimados de concentração proteica.

Por meio desta quantificação foi possível comprovar que o protocolo de extração das proteínas das amostras de hemolinfa foi eficiente (Tabela 1).

Tabela 1 Extrato proteico das amostras de hemolinfa de *D. saccharalis* coletadas 6 e 12 horas após injúria séptica

Amostra	Proteína em 6h (mg/mL)	Proteína em 12h (mg/mL)
HC	12.04	20.45
HBs	14.58	26.40
HEc	23.37	33.33
HBb	11.19	57.58

HC: Hemolinfa controle. HBs: Hemolinfa obtida após desafio séptico com *B. subtilis*. HEc: Hemolinfa obtida após desafio séptico com *E. coli*. HBb: Hemolinfa obtida após desafio séptico com *B. bassiana*.

Com os resultados obtidos foi possível constatar um aumento nos valores de proteínas presentes no extrato proteico após os desafios sépticos em comparação à amostra controle. Verificou-se também que o desafio mais longo, de 12 horas, causou aumento significativo na concentração proteica em relação ao desafio mais curto, visível principalmente na injúria com *B. bassiana*, onde, após 6 horas, o valor era de 11.19 mg/mL e após 12 horas de 57.58 mg/mL.

### Eletroforese bidimensional (2-DE) e análise dos géis

Na Figura 2 encontram-se os géis Tricina SDS-PAGE 12.5% obtidos após a realização da 2-DE dos extratos proteicos da hemolinfa de *D. saccharalis* submetidas ao desafio séptico de 6 horas com diferentes microrganismos.

No extrato proteico controle foi constatada a presença de cinco spots com variação de peso molecular (PM) de 12 a 19 kDa e ponto isoelétrico de 5.21 a 8.44 (Fig. 2a). Como resultado do desafio séptico com *B. subtilis*, foi possível a verificação de nove spots com variação de PM de 12 a 22 kDa e de ponto isoelétrico de 4.50 a 9.87. (Fig. 2b). Do desafio imunológico com *E. coli* foram observados

quatro spots com PM que foram de 11 a 18 kDa e pontos isoelétricos que variaram de 4.96 a 8.48. (Fig. 2c). Por fim, como resultado do desafio séptico utilizando-se o fungo *B. bassiana* foi verificada a presença de sete spots com PM de 12 a 24 kDa e pontos isoelétricos variando de 5.15 a 9.94. (Fig. 2d).

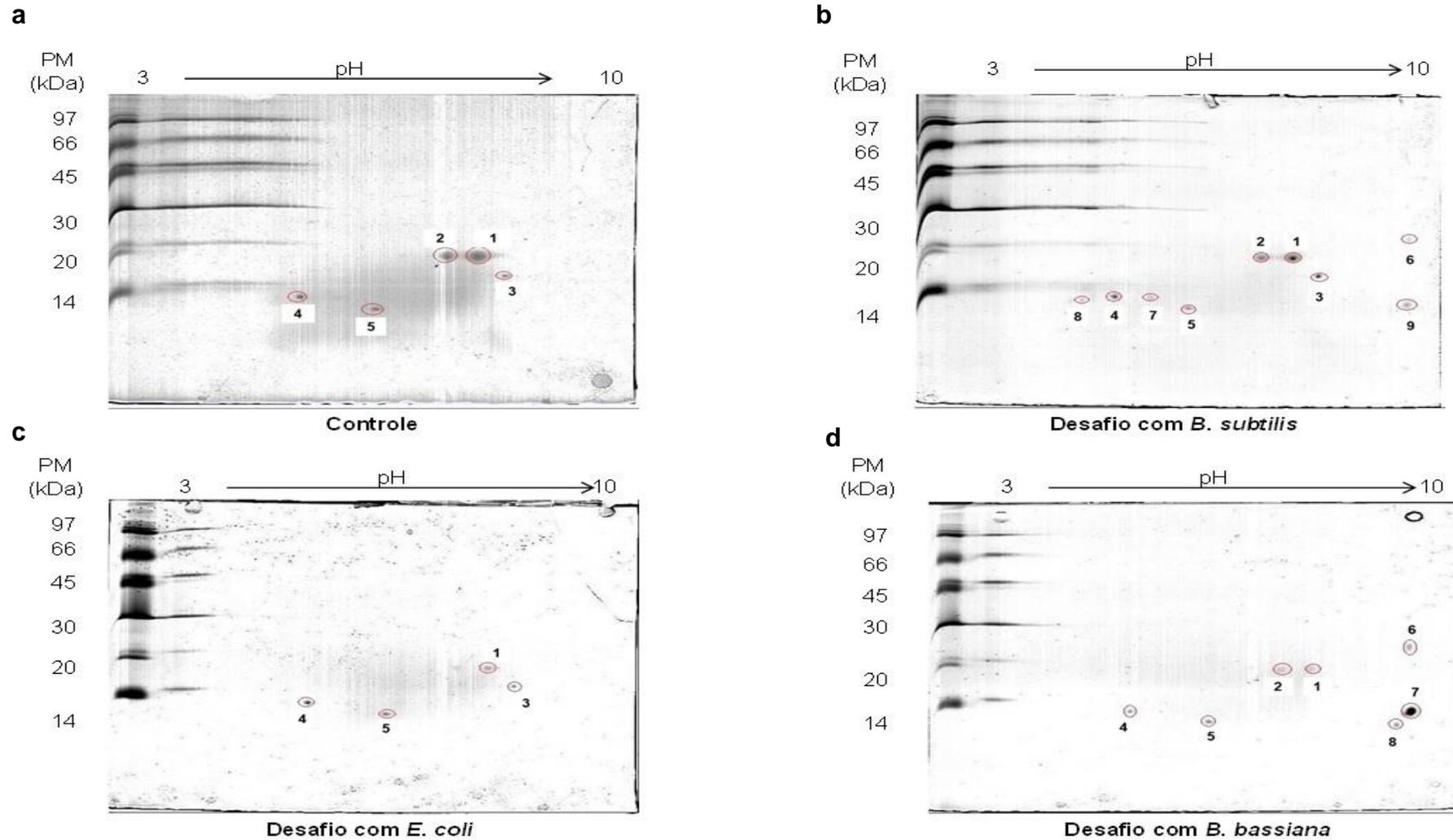


Figura 2 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas de baixo peso molecular extraídas da hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* após 6 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico controle. (b) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com *B. subtilis*. (c) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com *E. coli*. (d) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com *B. bassiana*. Padrão de peso molecular LMW (GE Healthcare).

Foi realizada análise comparativa entre cada gel de amostra desafiada e seu gel controle, onde os spots correspondentes entre si foram comparados e um valor de Ratio foi fornecido pelo programa, demonstrando proteínas diferencialmente expressas. Assim como McCarthy & Smyth (2009) e Song et. al. (2008), o valor de cut-off foi estabelecido em 1.5. A diferença de expressão pode indicar um aumento ou diminuição da presença da proteína na condição de desafio séptico.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos após análise comparativa entre cada amostra desafiada por seis horas e seu respectivo controle.

Tabela 2 Spots diferencialmente expressos no extrato proteico da hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* após desafios sépticos de 6 horas com diferentes microrganismos

Nº do spot	<sup>a</sup> PM (kDa)	<sup>b</sup> pI	<sup>c</sup> Diferença de expressão
<i>Desafio com B. subtilis</i>			
Regulação positiva			
3	16	8.39	2.21
Regulação negativa			
2	18	7.45	1.54
<i>Desafio com E. coli</i>			
Regulação positiva			
3	15	8.48	2.26
4	13	4.96	2.36
5	11	6.29	2.81
<i>Desafio com B. bassiana</i>			
Regulação negativa			
1	19	8.22	4.92
2	19	7.72	3.17
4	13	5.15	3.63
5	12	6.49	2.14

<sup>a</sup> Massa molecular. <sup>b</sup> Ponto isoelétrico. <sup>c</sup> Diferença de pelo menos 1.5 vezes.

Foi possível verificar que o desafio séptico de 6 horas com *B. subtilis* causou regulação positiva de 2.21 vezes em uma proteína (Spot 3) e regulação negativa de 1.54 vezes em outra (Spot 2).

Durante o desafio de 6 horas com *E. coli* os spots 3, 4 e 5 sofreram aumento da sua expressão em 2.26, 2.36 e 2.81 vezes, respectivamente, e nenhuma proteína foi suprimida.

O desafio imunológico com *B. bassiana* demonstrou uma particularidade em relação aos outros, visto que nenhuma proteína sofreu regulação positiva, todas as correspondentes tiveram sua expressão reduzida no desafio séptico de 6 horas onde os spots 1, 2, 4 e 5 foram suprimidos 4.92, 3.17, 3.63 e 2.14 vezes, respectivamente.

Além dos spots que sofreram alterações na sua expressão pelo desafio séptico, alguns foram expressos apenas após a realização destes. A Tabela 3 traz a relação dos spots presentes na hemolinfa da *D. saccharalis* apenas na condição desafiada por seis horas.

Tabela 3 Spots expressos no extrato proteico da hemolinfa de *D. saccharalis* apenas na condição de desafio séptico de 6 horas

Nº spot	<sup>a</sup> PM (kDa)	<sup>b</sup> pI
<i>Desafio com B. subtilis</i>		
6	22	9.87
7	13	5.64
9	12	9.84
<i>Desafio com B. bassiana</i>		
6	24	9,9
7	13	9.94
8	12	9.68

<sup>a</sup> Peso molecular. <sup>b</sup> Ponto isoelétrico.

A injúria séptica com *B. subtilis* demonstrou a expressão de três proteínas ausentes no controle (Spots 6, 7 e 9). Por sua vez, no desafio imunológico com *E. coli* não foi visualizada a expressão de nenhuma proteína adicional ao controle. No desafio séptico com *B. bassiana* foi visualizada a presença de três spots apenas nesta condição (Spots 6, 7 e 8).

A Figura 3 traz os resultados obtidos por meio da 2-DE das amostras de extrato proteico da hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* submetidas ao desafio séptico de 12 horas.

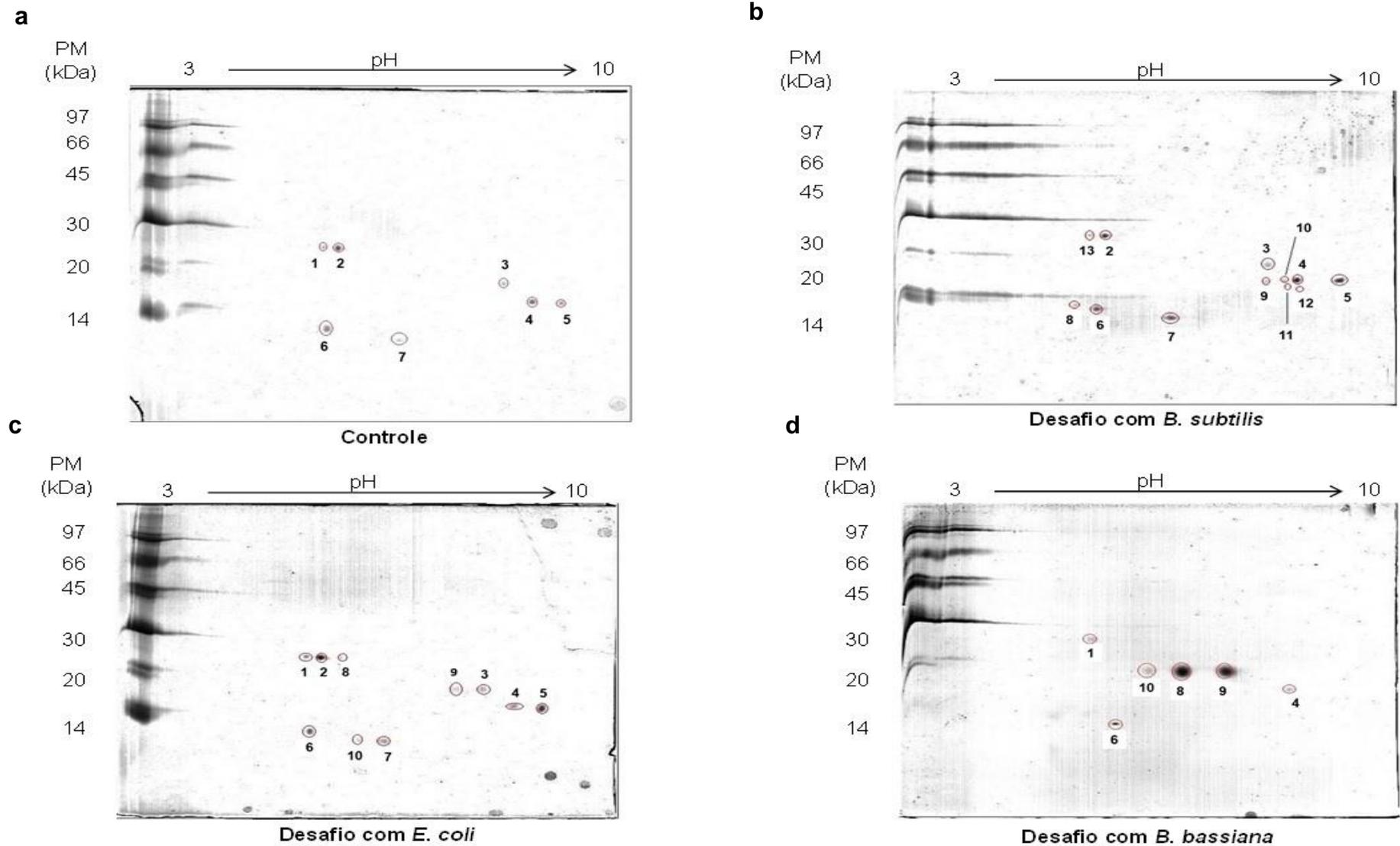


Figura 2 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas de baixo peso molecular extraídas da hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* após 12 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico controle. (b) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com *B. subtilis*. (c) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com *E. coli*. (d) 2-DE do extrato proteico obtido da hemolinfa das lagartas submetidas a desafio imunológico com *B. bassiana*. Padrão de peso molecular LMW (GE Healthcare).

Referente ao extrato proteico controle, é possível observar a presença de sete spots com PM entre 11 e 25 kDa e pontos isoelétricos entre 5.25 e 9.36 (Fig. 3a). Após desafio imunológico com *B. subtilis* foi obtido um total de doze spots com PM variando entre 11 e 24 kDa e pontos isoelétricos entre 5.07 e 9.65. (Fig. 3b). O desafio imunológico com *E. coli* trouxe como resultado a visualização de dez spots com PM entre 11 e 23 kDa e pontos isoelétricos a partir de 5.16 até 9.37. (Fig. 3c). Na 2-DE do extrato proteico submetido ao desafio séptico com *B. bassiana* obteve-se seis spots com PM entre 11 e 25 kDa e pontos isoelétricos entre 5.02 e 8.53 (Fig. 3d).

Nos desafios sépticos de 12 horas com *B. subtilis* e *E. coli* foi possível verificar um aumento do número de proteínas expressas nos géis 2-DE, indicando que depois de um tempo maior de desafio há mais proteínas possivelmente envolvidas com a resposta imunológica na hemolinfa da *D. saccharalis*.

A análise comparativa entre as amostras desafiadas por doze horas e seu respectivo controle mostrou que onze spots sofreram alguma alteração na sua expressão (Tabela 4).

Tabela 4 Spots diferencialmente expressos no extrato proteico da hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* após desafios sépticos de 12 horas com diferentes microrganismos

Nº do spot	<sup>a</sup> PM (kDa)	<sup>b</sup> pI	<sup>c</sup> Diferença de expressão
<i>Desafio com B. subtilis</i>			
Regulação positiva			
5	16	9.65	2.81
7	11	6.72	5.23
Regulação negativa			
2	24	5.57	2.07
6	12	5.43	1.96
<i>Desafio com E. coli</i>			
Regulação positiva			
5	14	9.37	2.31
7	11	6.56	1.74
Regulação negativa			
4	15	8.87	4.39
6	12	5.22	2.34
3	17	8.32	1.63
<i>Desafio com B. bassiana</i>			
Regulação negativa			
4	15	8.53	7.07
6	11	5.43	4.59

<sup>a</sup> Massa molecular. <sup>b</sup> Ponto isoelétrico. <sup>c</sup> Diferença de pelo menos 1.5 vezes.

O desafio séptico maior, de 12 horas com *B. subtilis*, mostrou duas proteínas reguladas positivamente: spot 5 (2.81 vezes) e o spot 7 (5.23 vezes), e duas negativamente sendo o spot 2 (2.07 vezes) e o spot 6 (1.96 vezes).

Já no desafio de 12 horas com *E. coli* os spots 5 e 7 tiveram sua expressão aumentada em 2.31 e 1.74 vezes. Outras três proteínas tiveram sua expressão reduzida após a injúria séptica: spots 4 (4.39 vezes), 6 (2.34 vezes) e 3 (1.63 vezes).

Enquanto isso, no desafio séptico de 12 horas com *B. bassiana*, os spots 4 e 6 tiveram sua expressão diminuída em 7.07 e 4.59 vezes.

Após os desafios sépticos de doze horas alguns spots também tiveram sua expressão induzida. A Tabela 5 mostra quais são os spots presentes apenas na condição desafiada e ausentes no controle.

Tabela 5 Spots expressos no extrato proteico da hemolinfa de *D. saccharalis* apenas na condição de desafio séptico de 12 horas

Nº spot	<sup>a</sup> PM (kDa)	<sup>b</sup> pI
Desafio com <i>B. subtilis</i>		
8	13	5.07
9	15	8.36
10	16	8.69
11	15	8.72
12	15	8.92
13	24	5.33
Desafio com <i>E. coli</i>		
8	23	5.79
9	17	7.84
10	11	6.09
Desafio com <i>B. bassiana</i>		
8	18	6.63
9	18	7.40
10	18	6.04

<sup>a</sup> Peso molecular. <sup>b</sup> Ponto isoelétrico.

Após 12 horas de desafio séptico com *B. subtilis*, seis proteínas estavam presentes apenas da condição desafiada (Spots 8, 9, 10, 11, 12 e 13). A bactéria *E. coli* foi capaz de induzir a expressão de três proteínas (Spots 8, 9 e 10), assim como o fungo *B. bassiana* (8, 9 e 10).

### Identificação de proteínas nas bases de dados

Os spots mais evidentes e delimitados de cada gel foram retirados e submetidos à digestão com Tripsina. A retirada de todos os spots dos géis não foi

possível devido ao tamanho de alguns. A identificação de proteínas foi realizada por meio de bancos de dados (MASCOT e ExPASy) e os resultados se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 Proteínas da hemolinfa de *D. saccharalis* identificadas por espectrometria de massas (MASCOT) ou PM e pI (TagIdent)

Nº spot	Desafio	<sup>a</sup> PM (kDa)	<sup>b</sup> pI	Proteína (TagIdent/MASCOT)	<sup>c</sup> PM (kDa)	<sup>d</sup> pI
Controle						
1	6 horas	18	8.01	CU22_BOMMO (O02388) Proteína da cutícula larval LCP-22	17	8.07
2	6 horas	19	7.54	PGRP_BOMMO (Q9XTN0) Proteína de reconhecimento do peptideoglicano	19	6.71
3	6 horas	16	8.44	DFP_BOMMO (Q008X1) Provável proteína de defesa	16	8.65
2	12 horas	24	5.50	HGLY_MANSE (Q25513) Glicoproteína da hemolinfa de 27 kDa	24	5.64
5	12 horas	15	9.36	LYS_GALME (P82174) Lisozima	14	9.27
6	12 horas	12	5.31	CU66_HYACE (P45590) Proteína 66 da cutícula rígida larval/pupal	12	4.80
Desafio com <i>B. subtilis</i>						
6	6 horas	22	9.87	ATTA_TRINI (P50725) Atacina-A	20	9.16
2	6 horas	18	7.45	PGRP_TRINI (O76537) Proteína de reconhecimento do peptídeooglicano	18	6.82
3	6 horas	16	8.39	Proteína de ligação à quitina	64	8.41
4	6 horas	13	5.04	ABP2_MANSE (P31417) Proteína 2 de ligação a ácidos graxos	14	5.09
8	6 horas	13	4.50	PBURS_(Q566B2) Associada de Bursicon	13	4.68
9	6 horas	12	9.83	Proteína inibidora de serino-proteases	9.8	8.61
5	12 horas	15	9.36	LYS_GALME (P82174) Lisozima	14	9.27
Desafio com <i>E. coli</i>						
3	6 horas	16	8.44	DFP_BOMMO (Q008X1) Provável proteína de defesa	16	8.65
5	12 horas	14	9.36	LYS_GALME (P82174) Lisozima	14	9.27
Desafio com <i>B. bassiana</i>						
7	6 horas	13	9.94	Cecropina A2	5.8	10.43
8	6 horas	12	9.68	Drosomicina	8.8	8.11
10	12 horas	18	6.04	APL3_SPOLT (O77248) Apolipoforina-3	18	6.00

<sup>a</sup> Peso molecular experimental. <sup>b</sup> Ponto isoelétrico experimental. <sup>c</sup> Peso molecular da proteína. <sup>d</sup> Ponto isoelétrico da proteína.

Ao todo, 18 proteínas foram identificadas utilizando as ferramentas MASCOT ou TagIdent. Cinco delas não estão relacionadas diretamente com a resposta imunológica da *D. saccharalis*, porém, são normalmente encontradas na hemolinfa. São elas: Proteína da cutícula larval LCP-22, Glicoproteína da hemolinfa de 27 kDa, Proteína 66 da cutícula rígida larval/pupal, a Proteína 2 de ligação a ácidos graxos e a proteína Associada de Bursicon.

A Atacina-A é correspondente ao Spot 6 presente após o desafio séptico de 6 horas com *B. subtilis* e foi identificada por meio da ferramenta TagIdent, tratando-se de uma proteína de defesa do sistema imune que apresenta massa molecular e pI de 20.6 kDa e 9.16, valores próximos àqueles encontrados no nosso experimento (22 kDa e 9.87).

A Proteína de reconhecimento do peptidoglicano (PGRP), identificada com o auxílio da ferramenta TagIdent, é referente ao Spot 2 da amostra controle e no desafio imunológico de 6 horas com *B. subtilis*, que sofreu uma leve regulação negativa após a injúria (1.54 vezes). Esta proteína é caracterizada com 18 kDa e ponto isoelétrico de 6.82, semelhante aos valores encontrados experimentalmente de 18 kDa e pI de 7.45.

O Spot 3 esteve presente tanto na amostra controle quanto após os desafios sépticos de 6 horas com *B. subtilis* e *E. coli*. A injúria por *B. subtilis* alterou a expressão desta proteína positivamente em 2.21 vezes, e nesta condição apresentou homologia e identidade de 64% a uma Proteína de ligação à quitina de *Danius plexipus plexipus* (Lepidoptera: Nymphalidae). Utilizando a ferramenta TagIdent, tanto na amostra controle quanto na amostra desafiada por *E. coli*, esta proteína apresentou massa molecular e ponto isoelétrico semelhante a uma Provável proteína de defesa de *Bombyx mori*, sofrendo regulação positiva após injúria por *E. coli* em 2.26 vezes.

A proteína inibidora de serino-proteases teve sua expressão induzida pelo desafio séptico de 6 horas com *B. subtilis* (Spot 9) e, por meio da ferramenta MASCOT, apresentou 12% de identidade com essa proteína de *Drosophila serrata*.

O Spot 5 esteve presente tanto na amostra controle quanto nos desafios sépticos de 12 horas com *B. subtilis* e *E. coli*. Por meio da ferramenta TagIdent foi identificado como uma Lisozima, que apresenta massa molecular de 14 e pI de 9.27, valores próximos daqueles encontrados após realização dos experimentos. O desafio com *B. subtilis* foi responsável pelo aumento da expressão da Lisozima em

2.81 vezes, enquanto o desafio com *E. coli* aumentou 2.31 vezes sua expressão, mostrando possível envolvimento com a resposta imune.

O desafio séptico de 6 horas com o fungo *B. bassiana* induziu a produção de duas proteínas identificadas por meio do MASCOT. A Cecropina A2 (Spot 7), que apresentou homologia e identidade de 37% no Swissprot, foi considerada apesar da diferença na massa molecular real (3 – 5 kDa) para a experimental. A Drosomicina (Spot 8) apresentou 15% de identidade com o peptídeo de *D. melanogaster*, sugerindo envolvimento com a resposta antifúngica.

A Apolipoforina-3 teve expressão induzida após 12 horas do desafio séptico com *B. bassiana* (Spot 10) e por meio da ferramenta TagIdent foram encontrados valores experimentais de massa molecular e ponto isoelétrico (18 kDa e 6.04) realmente próximos àqueles característicos da proteína (18 kDa e 6.00).

## DISCUSSÃO

A proteína ortóloga ao padrão de reconhecimento de peptídeo glicano (PGRP) foi identificada tanto na amostra controle quanto na amostra injuriada pela bactéria Gram-positiva *B. subtilis* (Spot 2), porém demonstrou uma leve diminuição na sua expressão durante a condição de desafio.

As PGRPs, que fazem o reconhecimento das bactérias Gram-positivas e foram isoladas pela primeira vez em *B. mori* (Li et al., 2015), estão intimamente relacionadas com diversas funções da resposta imune inata como ativação do receptor Toll e o IMD e da cascata da PPO, podem causar hidrólise dos PGN na parede das bactérias exibindo atividade antimicrobiana e, por fim, podem induzir fagocitose (Li et al., 2014). Chen, Liu, He & Jiang (2014) constataram a informação de que uma infecção leva a indução da produção de PGRP por meio do desafio séptico de *B. mori* com *P. aeruginosa* e *S. aureus*, que foi capaz de aumentar a expressão do PGRP-S5. Também foi constatada a participação deste na ativação da PPO e da inibição do crescimento bacteriano.

Neste trabalho, o desafio séptico de 6 horas com a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* induziu a expressão de uma ortóloga da Atacina-A (Spot 6). As Atacinas apresentam massa molecular entre 20 e 23 kDa e podem ser divididas em básicas (A-D) e ácidas (E e F) (Li et al., 2015). Em outros trabalhos foi constatado o seu espectro de ação principalmente contra bactérias Gram-negativas como descrito por Wang, Yu, Han & Chen (2009) e Hu & Aksoy (2005) que constataram uma alta

atividade antibacteriana contra *E. coli*. Gupta et al. (2017) verificaram um aumento da expressão precoce de Atacina-A em *D. melanogaster* associada à *Wolbachia* e desafiada por *P. aeruginosa*, outra bactéria Gram-negativa.

A proteína ortóloga a proteína de ligação à quitina (Spot 3) identificada em nosso trabalho sofreu regulação positiva pelo desafio séptico de 6 horas com *B. subtilis*. Suas características de massa molecular e ponto isoelétrico também condizem com uma provável proteína de defesa, indicando envolvimento com a resposta imunológica. Esta proteína apresentou homologia com a proteína de ligação à quitina, contudo, a massa molecular encontrada em *D. saccharalis* é de 16 kDa, bem inferior a 64 kDa da proteína depositada nos bancos de dados.

Em invertebrados, proteínas deste tipo são conhecidas como Lectinas do tipo-C (CTLs). Sua expressão pode ser induzida por fungos e também por bactérias Gram-positivas devido à alta quantidade de N-acetilglicosamina presente na sua parede (Souza, 2012). Zhan et al. (2016) relataram o papel regulador das lectinas na resposta imune. O desafio bacteriano possui a capacidade de causar aumento significativo na expressão de Lectinas na ordem como constatado por Shahzad, Zhan, Yang, Yu & Rao (2017) em *B. mori*, assim como a atividade destas contra bactérias Gram-positivas, condizendo com os resultados deste trabalho.

A proteína ortóloga do tipo inibidora de serino-proteases (Spot 9) teve expressão induzida após a realização do desafio séptico de 6 horas com *B. subtilis*. Estas proteínas também são conhecidas como Serpinas, e estão envolvidas em processos fisiológicos e reações de defesa em mamíferos e invertebrados, atuando no controle da atividade das serino-proteases evitando processos inadequados da resposta imune (Gilbert, 2012; Yang et al., 2017). A expressão de um inibidor de serino-proteases após realização de um desafio bacteriano neste trabalho faz todo sentido, visto que em *Drosophila* as Serpinas estão relacionadas com a regulação da resposta imune mediada pelo receptor Toll, e em *B. mori* a Serpina-15 foi encontrada em altas quantidades na hemolinfa e foi capaz de inibir a ativação de PPO e produção de PAMs (Liu et al., 2015).

A proteína ortóloga a Lisozima (Spot 5) esteve presente tanto na amostra controle quanto após os desafios bacterianos por 12 horas, confirmando a presença constante no organismo dos insetos. O aumento da expressão da Lisozima após injúria por microrganismos também foi confirmado. Essas proteínas possuem importante papel na resposta imune podendo agir sinergicamente com PAMs (Sowa-

Jasilek et al., 2014), realizar hidrólise nas ligações entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina da parede das bactérias Gram-positivas (Hillyer, 2016), assim como *B. subtilis* utilizado neste trabalho, e também agir contra bactérias Gram-negativas, como é o caso da *E. coli*, atividade esta constatada por meio de Lisozimas isoladas de membros da ordem Lepidoptera (Elmoghy et al., 2015).

O fungo *B. bassiana* induziu a expressão de uma proteína com homologia à Cecropina A2 (Spot 7) após 6 horas de desafio séptico. As Cecropinas possuem baixo peso molecular (3 - 5 kDa) e foram os primeiros PAMs relatados em insetos, isoladas da hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia* em 1980. Estes PAMs apresentam amplo espectro de ação, sendo ativas contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, parasitas e HIV-1 (Yi et al., 2014; Wei et al., 2017), e levando isto em conta, a Cecropina A2 encontrada aqui não necessariamente apresenta atividade antifúngica. A Cecropina A2 do mosquito *Aedes aegypti*, por exemplo, apresentou alto MIC contra isolados clínicos de *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa de grande importância clínica (Zheng et al., 2017).

O peptídeo semelhante à Drosomicina (Spot 8) teve expressão induzida pelo desafio séptico de 6 horas com *B. bassiana*. A Drosomicina trata-se de um PAM incluído na classe das Defensinas, isolado pela primeira vez da hemolinfa da *D. melanogaster* após desafio séptico bacteriano, porém, apresenta um espectro de ação pequeno sendo ativo apenas contra alguns fungos filamentosos (Zhang & Zhu, 2009; Rao, Xu & Yu, 2011), indicando que a indução deste PAM pelo fungo *B. bassiana* é possível. Tian et al. (2008) verificaram que tanto a Drosomicina quanto o mutante Drosomicina-A2 foram inativos contra 13 bactérias, entretanto, foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *Neurospora crassa*, *Geotrichum candidum* e leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*.

No presente trabalho foi verificada a presença de uma proteína homóloga da Apolipoforina-3 (Spot 10) induzida pelo desafio séptico de 12 horas com *B. bassiana*. Esta proteína é caracterizada em outras espécies como proteína multifuncional atuante na resposta imune, desempenhando funções como reconhecimento e ligação aos padrões dos patógenos, ativação da cascata de PPO, estimulação da liberação de PAMs, efeito sinérgico com a Lisozima, transporte de lipídeos, entre outros (Butt, Coates, Dubovskiy & Ratcliffe, 2016; Wen et al., 2016). Assim como encontrado neste estudo, Zdybicka-Barabas, Sowa-Jasilek, Stępczek, Jakubowicz & Cytryńska

(2015) observaram que o desafio imunológico com fungos foi capaz de induzir a produção de Apolipoforinas-3 em larvas de *G. mellonella*.

## CONCLUSÃO

A expressão de proteínas relacionadas com o sistema imunológico inato da *D. saccharalis* foi confirmada por meio das técnicas proteômicas e bioquímicas, e o auxílio das ferramentas MASCOT e TagIdent permitiu a identificação das mesmas.

Todas as proteínas relatadas neste trabalho foram anteriormente descritas na literatura e demonstraram ser moléculas envolvidas com a resposta imunológica na ordem Lepidoptera, apresentando inclusive atividade contra vários microrganismos.

Foram identificadas proteínas com homologia à proteína de reconhecimento do peptideoglicano, a Atacina-A, a proteína de ligação à quitina, a proteína inibidora de serino-proteases, a Lisozima, a Cecropina A2, a Drosomicina e a Apolipoforina-3.

Em *D. saccharalis* a identificação e caracterização dessas proteínas servirão para um melhor entendimento do sistema imune deste lepidóptero, considerada uma importante praga agrícola e também servirá como objeto de estudo para possível utilização no combate à resistência bacteriana.

## CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

Por meio da abordagem proteômica foram obtidos resultados positivos para identificação de proteínas com envolvimento na resposta imunológica na lagarta de *D. saccharalis*, entretanto, os resultados ainda necessitam de comprovação, principalmente por meio da técnica de espectrometria de massas. A espectrometria de massas foi realizada na UFPR (Centro Politécnico) com a cooperação do Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo e da Pós-Doutoranda Edileusa Marques Gerhardt, que nos auxiliaram em todo o processo no aparelho MALDI-ToF/ToF e na busca nos bancos de dados.

Apesar da dificuldade com a espectrometria de massas, salientamos que o desafio imune provocou mudanças na expressão das proteínas ortólogas a PGRPs, Atacina-A, proteína ligadora de quitina, proteína inibidora de serino-proteases, Lisozimas, Cecropina-A, Drosomicina e a Apolipoforina-3.

Este estudo é pioneiro na investigação da resposta imune da praga da cana-de-açúcar, lançando os primeiros resultados nesta importante área de pesquisa, que, no futuro, poderá gerar PAMs candidatos a novos antibióticos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal representante da ordem Lepidoptera, a lagarta *Bombyx mori*, é considerada um importante modelo biológico para estudo da imunidade inata por apresentar genoma completamente decifrado. Contudo, os lepidópteros pragas agrícolas, ainda são pouco estudados, alguns já emergindo como modelos de estudo como *Manduca sexta*. Em contrapartida, a broca-da-cana *Diatraea saccharalis*, ainda é carente de estudos genômicos e proteômicos.

Este trabalho abordou a imunidade inata na fase larval da mariposa, submetendo-a ao desafio séptico e caracterizando as proteínas de baixo peso molecular expressas na hemolinfa após o desafio. Foram obtidas proteínas possivelmente envolvidas na imunidade inata, contudo, para obtenção do mapa proteômico completo, análises adicionais serão necessárias, bem como o sequenciamento do genoma da *Diatraea saccharalis*, para que as bases de dados forneçam mais informações e, assim, existam subsídios para comparar e discutir os resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Referências bibliográficas da revisão de literatura

AEBERSOLD, R.; MANN, M. **Mass spectrometry-based proteomics**. Nature. v.422. p.198-207. Março 2003.

ALANIS, A. J.; **Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?** Archives of Medical Research. v. 6, n. 36, p. 697-705, novembro/dezembro 2005.

ANVISA. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico**. 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_w eb/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_w eb/modulo1/conceitos.htm)> Acessado em: 21/08/2017.

AOKI, W.; UEDA, M. **Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics**. Pharmaceuticals. v.6, p.1055-1081. Agosto, 2013.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. p.51. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa, 2013.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B. T.; TAJARA, E. H. **Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 58, n. 3, p. 366-375, Junho 2012.

BISCHOFF, V., VIGNAL, C., BONECA, I.G., MICHEL, T., HOFFMANN, J.A.; ROYET, J. **Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria**. Nature Immunology. v.5, n.11, p.1175-1180. Novembro, 2004.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M.S. **Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático**. Química Nova. v.31, n.3, p.669-675. 2008.

CAPELI, M. J. **Manejo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1974) (Lepidoptera: Crambidae), na cultura de cana-de-açúcar**. 2012. 28 p. Dissertação. Faculdade de Tecnologia de Pompeia, Pompeia – São Paulo, 2012.

CAPINERA, J. L. **Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)**, 2001. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, A. K.; SARWAR, S.; SINGH, P.; CHAKRABORTY, R.; **Bactericidal effect of polyethyleneimine capped ZnO nanoparticles on multiple antibiotic resistant 42mune42ra harboring genes of high-pathogenicity 42mune42r**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 121, n. 1, p. 44-53, Setembro, 2014.

CHUNG, P. Y.; KHANUM, R. **Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agentes against multidrug resistant bactéria**. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. v.20 p.1-6. Dezembro 2016.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** v.4 - Safra 2017/18, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, p.1-57, Abril 2017.

CYTRYNSKA, M.; MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, SUDER, P.; JAKUBOWICZ, T.; A. **Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* mune hemolymph.** Peptides. v.28, n.3, p.533-546, December, 2007.

FERRI, M.; RANUCCI, E.; ROMAGNOLI, P.; GIACCONE, V. **Antimicrobial Resistance: A global emerging threat to Public Health Systems.** Food Science and Nutrition. 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>

FUKUZAWA, A. H. **Envolvimento dos hemócitos na resposta imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria ishiiana*.** 2007. 87 p. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GANZ, T. **The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity.** Integrative e Comparative Biology. v.43, n.2, p. 300–304, Abril, 2003.

GILBERT, L. I. **Insect Molecular Biology and Biochemistry.** 1<sup>a</sup> edição. Elsevier B.V. 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Química Nova, v.33, n.3, p. 667-679, Fevereiro, 2010.

HARBUT, M. B.; VILCHÈZE, C.; LUO, X.; HENSLER, M. E.; GUO, H.; YANG, B.; CHATTERJEE, A. K.; NIZET, V.; JACOBS Jr, W. R.; SCHULTZ, P. G.; WANG, F. **Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v.112, n.14, p.4453-4458. Abril, 2015.

HILLYER, J. F. **Insect immunology and hematopoiesis.** Developmental and comparative immunology. v.58, p.102-118. Maio, 2016.

HOU, Y.; ZHANG, Y.; GONG, J.; TIAN, S.; LI, J.; DONG, Z.; GUO, C.; PENG, L.; ZHAO, P.; XIA, Q. **Comparative proteomics analysis of silkworm hemolymph during the stages of metamorphosis via liquid chromatography and mass spectrometry.** Proteomics. v.16, p.1421-1431. 2016.

HUTTNER, A.; HARBARTH, S.; CARLET, J.; COSGROVE, S.; GOSENS, H.; HOLMES, A.; JARLIER, V.; VOSS, A.; PITTET, D. **Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Health-Associated Infections Forum.** Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2013.

Iavicoli, P.; ROSSI, F.; LAMARRE, B.; BELLA, A.; RYADNOV, M.G.; CALZOLAI, L. **Modulating charge-dependent and folding-mediated antimicrobial interactions at peptide-lipid interfaces.** European biophysics Journal. v.46. p.375-382. Novembro 2016.

ISHII, M.; MATSUMOTO, Y.; NAKAMURA, I.; SEKIMIZU, K. **Silkworm fungal infection model for identification of virulence genes in pathogenic fungus and screening of novel antifungal drugs.** Drug Discoveries & Therapeutics. v.11, p.1-5. 2017.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W.; **Peptide Antimicrobial Agents.** Clinical Microbiology reviews. v.19, n.3, p.491-511, Julho, 2006.

JIANGFAN, X.; TAO, W.; YU, W.; JIANWEI, W.; GUO, G.; YINGCHUN, Z.; XIAOLI, S. **Histological Observation and Expression Patterns of antimicrobial peptides during Fungal Infection in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Larvae.** Brazilian Archives of Biology and Technology. v.59. Jan/Dez 2016.

KINGSOLVER, M. B.; HUANG, Z.; HARDY, R. W. **Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors and connections.** Journal of Molecular Biology. v.425, p.4921-4936. Dezembro, 2013.

KOUNATIDIS, I.; LIGOXYGAKIS, P. ***Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection.** Open Biology. n.2. April, 2012. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.12007>

LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, M. B. **A química analítica do proteoma.** Revista Analytica. n.06, 2003.

LI, Y.; WANG, Y.; JIANG, H.; DENG, J. **Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes.** PNAS. v.106, n.40, p.17002-17006. Outubro, 2009.

LIPKIN, R.; LAZARIDIS, T. **Computational studies of peptide-induced membrane pore formation.** The Royal Society Publishing. Novembro 2016. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0219>

MEDEIROS, A. H.; MINGOSSO, F. B.; DIAS, R. O.; FRANCO, F. P.; VICENTINI, R.; MELLO M. O.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. **Sugarcane Serine Peptidase Inhibitors, Serine Peptidases, and Clp Protease System Subunits Associated with Sugarcane Borer (*Diatraea saccharalis*) Herbivory and Wounding.** International Journal of Molecular Sciences. v.17. Setembro, 2016.

MELONI, M.; CANDUSSO, S.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D. **Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following in vivo infection with *Vibrio anguillarum*. A time course experimente.** Fish & Shellfish Immunology. v. 43, n.1, p. 82-90. Março, 2015.

OBARA, V. Y.; ZACAS, C. P.; CARRILHO, C. M. D. M.; DAHER, V.; DELFINO, A. **Esquema posológico atualmente utilizado para Vancomicina falha em obter níveis terapêuticos em 40% dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva.** Revista Brasileira de Terapia Intensiva. v.28, p.380-386. 2016.

O'FARREL, P. H. **High resolution two-dimensional electrophoresis of Proteins.** The Journal of Biological Chemistry. v.250, n.10, p.4007-4021. Maio, 1975.

OSAKI, T.; OMOTEZAKO, M.; NAGAYAMA, R.; HIRATA, M.; IWANAGA, S.; KASAHARA, J.; HATTORI, J.; ITO, I.; SUGIYAMA, H.; KAWABATA, S. **Horseshoe Crab Hemocyte-derived Antimicrobial Polypeptides, Tachystatins, with Sequence Similarity to Spider Neurotoxins.** The Journal of Biological Chemistry. v.274, n.37, p.26172-26178. 1999.

PAKKIANATHAN, B. C.; SINGH, N. K.; KRISHNAM, M.; KÖNIG, S. **A proteomic view on the developmental transfer of homologous 30 kDa lipoproteins from**

**peripheral fat body to perivisceral fat body via hemolymph in silkworm, *Bombyx mori*.** Journal Biomed Central Biochemistry. v. 13, n.5, Fevereiro, 2012.

PAULI, G. **Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae).** 2009. p. 88 Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009.

RIBEIRO, M.; CORTINA, M. A. **As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS).** Revista Científica UMC. v.1, n.1. Agosto, 2016.

ROCHA, I. F.; MALLER, A.; SIMÃO, R. C. G.; KADOWAKI, M. K.; ALVES, L. F. A.; HUERGO, L. F.; SILVA, J. L. C. **Proteomic profile of hemolymph and detection of induced antimicrobial peptides in response to microbial challenge in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Biochemical and Biophysical Research Communications. p.511-516. Março 2016.

SANCHES, P. A.; SANTOS, F.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BENTO, J. M. S. **Direct and indirect resistance of sugarcane to *Diatraea saccharalis* induced by jasmonic acid.** Bulletin of Entomological Research. Abril, 2017.

SIDRACH-CARDONA, R.; HIJOSA-VALSERO, M.; MARTI, E.; BALCÁZAR, J. L.; BECARES, E. **Prevalence of antibiotic-resistant fecal 45mune45ra in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges.** Science of the Total Environment. v.488–489, n.1, p.220–227. Agosto, 2014.

SILVA JÚNIOR, P. I. **Sistema Imune em Aracnídeos: Estrutura Química e Atividade Biológica de Peptídeos Antimicrobianos da Hemolinfa da Aranha *Acanthoscurria gomesiana*.** 2000. 169p. Tese. Doutorado em Ciências. São Paulo, 2000.

SILVA, J. C. **Identificação e caracterização morfológica de hemócitos em *Ectemnaspis rorotaense* (Floch & Abonnenc) e *Ectemnaspis trombetense* (Hamada, Py-Daniel & Adler) (Diptera: Simuliidae).** 2014. p. 66. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Entomologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, 2014.

SILVA, J. L. C.; BARBOSA, J. F.; BRAVO, J. P.; DE SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; ESTEVES, E.; DAFFRE, S.; FERNANDEZ, M. A. **Induction of a gloverin-like antimicrobial polypeptide in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* challenged by septic injury.** Braziliam Journal of Medical and Biological Research. v.43, n.5, p.431-436. Maio, 2010.

SILVA-BRANDÃO, LYRA, M. L.; SANTOS, T. V.; SERAPHIM, N.; ALBERNAZI, K. C.; PAVINATO, V. A. C.; MARTINELLI, S.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. **Exploitation of mitochondrial nad6 as a complementary marker for studying population variability in Lepidoptera.** Genetics and Molecular Biology. v.34, n.4, p.719-725. Outubro, 2011.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M, TERENCE, H.; **Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana.** Química Nova. v.29 n.4. Julho/Agosto, 2006.

SINGH, C. P.; VAISHNA, R. L.; KAKKAR, A.; ARUNJUMAR, K. P.; NEGARAJU, J. **Characterization of antiviral and antibacterial activity of *Bombyx mori* seroin proteins.** Cellular Microbiology. v.16 p.1354-1365. Abril, 2014.

SOUHAIL, Q. A.; HIROMASA, Y.; RAHNAMAEIAN, M.; GIRALDO, M. C.; TAKAHASHI, D.; VALENT, B.; VILCINSKAS, A.; KANOST, M. R. **Characterization and regulation of expression of an antifungal peptide from hemolymph of an insect, *Manduca sexta*.** Developmental and Comparative Immunology, v.61, p.258-268. 2016.

TANG, W.; YUAN, H.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X.; **Na antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method.** Food Control. v. 50, p. 413–422. Abril, 2015.

TEIXEIRA, R. R. 1; CALÁBRIA, L. K. L.; ESPINDOLA, F. S. **Estudos proteômicos da abelha *Apis mellifera* e dos produtos da colmeia.** Bioscience Journal. v.23, Supplement 1, p.125-133. Novembro, 2007.

TIAN, C.; GAO, B.; FANG, Q.; YE, G.; ZHU, S.; **Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective.** Biomed Central Genomics. v.11, n. 187. Março, 2010.

TIELEMAN, D. P. **Antimicrobial peptides in the cross hairs of computer simulations.** Biophysical Journal. v.113. p.1-3. Julho 2017.

ULMSCHNEIDER, J. P. **Charged Antimicrobial Peptides Can Translocate across Membranes without Forming Channel-like pores.** Biophysical Journal. v.113. p.73-81. Julho 2017.

UTTENWEILER-JOSEPH, S.; MONIATTE, M.; LAGUEUX, M.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J. A.; BULET, P. **Differential display of peptides induced during the 47mune response of *Drosophila*: A matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.95, p.11342–11347. September, 1998.

VERLY, R. M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos.** 2010. 182p. Tese. Doutorado em Ciências – Química, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

VILCINSKAS, A.; **Pathogens as Biological Weapons of Invasive Species.** PLoS Pathogens. v.11, n. 4. Abril, 2015.

WHO. World Health Organization. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>> Acessado em: 21/08/2017.

YAGI, A.; UCHIDA, R.; HAMAMOTO, H.; SEKIMIZU, K.; KIMURA, K.; TOMODA, H. **Anti-Myco bacterium activity of microbial peptides in a silkworm infection model with *Mycobacterium smegmatis*.** The Journal of Antibiotics. v.70, p.685-690. 2017.

YI, H. Y.; CHOWDHURY, M.; HUANG, Y. D.; YU, X. Q. **Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications**. Appl Microbiol Biotechnol. n.98, v.13, p.5807–5822. Julho 2014.

ZHANG, K.; PAN, G.; ZHAO, Y.; HAO, X.; LI, C.; SHEN, L.; ZHANG, R.; SU, J.; CUI, H. **A novel immune-related gene HDD1 of silkworm Bombyx mori is involved in bacterial response**. Molecular Immunology. v.88. p.106-115. Junho, 2017.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOW, A. **Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases**. British Journal of Pharmacology. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13895>

### Referências bibliográficas do Capítulo I

Bradford, M. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

Butt, T. M., Coates, C.J., Dubovskiy, I. M. & Ratcliffe, N. A. (2016). Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Advances in Genetics*. 94. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>

Cantú, M. D., Carrilho, E., Wulff, N.A. & Palma, M.S. (2008). Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*. 31, 669-675.

Chen, K., Liu, C., He, Y., Jiang, H. & Lu, Z. (2014). A short-type peptidoglycan recognition protein from silkworm: Expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway. *Developmental and Comparative Immunology*. 45, 1-9.

Chung, P.Y. & Khanum, R. (2016). Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agentes against multidrug resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 20, 1-6.

Elmogy, M., Bassal, T. T., Yousef, H. A., Dorrah, M. A., Mohamed, A. A. & Duvic, B. (2015). Isolation, Characterization, Kinetics, and Enzymatic and Nonenzymatic Microbicidal Activities of a Novel c-type Lysozyme from Plasma of *Schitocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Science*. <http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/iev038>

Gilbert, L. I. (2012). *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. 1ª edição. Elsevier B.V. pp. 480-512.

Gupta, V., Vasanthkrishnan, R. B., Siva-Jothy, J., Monteith, K. M., Brown, S. P. & Vale, P. F. (2017). The route of infection determines *Wolbachia* antibacterial protection in *Drosophila*. *The Royal Society Publishing*. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.0809>.

Hensley, S. D. & Hammond, A. M. (1968). Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*. 61, 1742-1743.

- Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and comparative immunology*. 58, 102-118.
- Hu, Y. & Askoy, S. (2005). An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35, 105-115.
- Kingsolver, M. B., Huang, Z. & Hardy, R.W. (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors and connections. *Journal of Molecular Biology*. 425, 4921-4936.
- Li, L., Li, Y. P., Song, C. X., Xiao, M., Wang, J. L. & Liu, X. S. (2014). Identification and functional characterization of a peptidoglycan recognition protein from the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 86, 240-258.
- Li, Y. P., Xiao, M., Li, L., Song, C. X., Wang, J. L. & Liu, S. (2015). Molecular characterization of a peptidoglycan recognition protein from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and its role in the prophenoloxidase activation pathway. *Molecular Immunology*. 65, 123-132.
- Liu, W., Liu, J., Lu, Y., Gong, Y., Zhu, M., Chen, F., Liang, Z., Zhu, L., Kuang, S., Hu, X., Cao, G., Xue, R. & Gong, C. (2015). Immune signaling pathways activated in response to different pathogenic micro-organisms in *Bombyx mori*. *Molecular Immunology*. 65, 391-397.
- McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*. 25, 765-771.
- Medeiros, A. H., Mingossi, F. B., Dias, R. O., Franco, F. P., Vicentini, R., Mello M. O., Moura, D. S. & Silva-Filho, M. C. (2016). Sugarcane Serine Peptidase Inhibitors, Serine Peptidases, and Clp Protease System Subunits Associated with Sugarcane Borer (*Diatraea saccharalis*) Herbivory and Wounding. *International Journal of Molecular Sciences*. 17.
- Meloni, M., Candusso, S., Galeotti, M. & Volpatti, D. (2015). Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following *in vivo* infection with *Vibrio anguillarum*. A time course experimente. *Fish & Shellfish Immunology*. 43, 82-90.
- Pauli, G. (2009). Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Beauveria bassiana* (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. pp.88.
- Rao, X-J., Xu, X-X. & Yu, X-Q. (2011). *Manduca sexta* Moricin Promoter Elements can Increase Promoter Activities of *Drosophila melanogaster* Antimicrobial Peptide Genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41, 982-992.
- Shahzad, T., Zhan, M-Y., Yang, P-J., Yu, X-Q. & Rao, X-J. (2017). Molecular cloning and analysis of a C-type lectin from silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Physiology*. <https://doi.org/10.1002/arch.21391>

- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 68, 850-858.
- Song, K. H., Jung, M. K., Eum, J. H., Hwang, I. C. & Han, S. S. (2008). Proteomic analysis of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma. *Journal of Insect Physiology*. 54, 1271–1280.
- Souza, I. F. A. C. (2012). Avaliação da atividade de lectinas de *Opuntia ficus indica*, OfiL, e de *Moringa oleifera*, cMoL e WSMoL, na sobrevivência de cupins *Nasutitermes corniger*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. pp.86.
- Sowa-Jasilek, A., Zdybicka-Barabas, A., Stępczek, S., Wydrych, J., Mak, P., Jakubowicz, T. & Cytryńska, M. (2014). Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides*. 53, 194-201.
- Tian, C., Gao, B., Fang, Q., Ye, G. & Zhu, S. (2010). Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. *Biomed Central Genomics*. 11.
- Tian, C., Gao, B., Rodriguez, M. C., Lanz-Mendoza, H., Ma, B. & Zhu, S. (2008). Gene expression. Antiparasitic activity, and functional evolution of the drosomycin Family. *Molecular Immunology*. 45, 3909-3916.
- Vilcinskis, A. (2015). Pathogens as Biological Weapons of Invasive Species. *PLoS Pathogens*. 11.
- Viljakainen, L. (2015). Evolutionary genetics of insect innate immunity. *Briefings on Functional Genomics*. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1093/bfpg/elv002>
- Wang, L. N., Yu, B., Han, G. Q. & Chen, D. W. (2009). Molecular cloning, expression in *Escherichia coli* of Attacin A gene from *Drosophila* and detection of biological activity. *Molecular Biology Reports*. 37, 2463-2469.
- Wei, R-Y., Bai, J., Zhao, M-F., Xu, B., Li, W-J., Xi, Y-Y. & Li, S-Y. (2017). Anti-inflammatory activity of cecropin A2 from *Musca domestica*. *Microbial Pathogenesis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.032>
- Wen, D., Wang, X., Shang, L., Huang, Y., Li, T., Wu, C., Zhang, R. & Zhang, J. (2016). Involvement of a versatile pattern recognition receptor, apolipoprotein III in prophenoloxidase activation and antibacterial defense of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Developmental and Comparative Immunology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.001>
- Yang, J., Lee, K. S., Kim, B. Y., Choi, Y. S., Yoon, H. J., Jia, J. & Jin, B. R. (2017). Anti-fibrinolytic and anti-microbial activities of a serine protease inhibitor from honeybee (*Apis cerana*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 201, 11-18.
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D. & Yu, X.Q. (2014). Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 13, 5807–5822.

- Zdybicka-Barabas, A., Bulak, P., Polakowski, C., Bieganowski, A., Wasko, A. & Cytryńska, M. (2017). Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Invertebrate Survival Journal*. 14, 9-17.
- Zdybicka-Barabas, A., Sowa-jasiłek, A., Stączek, S., Jakubowicz, T. & Cytryńska, M. (2015). Different forms of apolipoprotein III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides*. 68, 105-112.
- Zhan, M. Y., Shahzad, T., Yang, P. J., Liu, S., Yu, X. Q. & Rao, X. J. (2016). A single-CDR C-type Lectin is Important for Bacterial Clearance in the Silkworm. *Developmental and Comparative Immunology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.08.004>
- Zhang, K., Pan, G., Zhao, Y., Hao, X., Li, C., Shen, L., Zhang, R., Su, J. & Cui, H. (2017). A novel immune-related gene HDD1 of silkworm *Bombyx mori* is involved in bacterial response. *Molecular Immunology*. 88, 106-115.
- Zhang, Z-T. & Zhu, S-Y. (2009). Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology*. 18, 549-556.
- Zheng, Z., Tharmalingam, N., Liu, Q., Jayamani, E., Kim, W., Fuchs, B. B., Zhang, R., Vilcinskas, A. & Mylonakis, E. (2017). Synergistic Efficacy of *Aedes aegypti* Antimicrobial Peptide Cecropin A2 and Tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61.
- Zhou, Z-h., Yang, H-j., Chen, M., Lou, C-f., Zhang, Y-z., Chen, K-p., Wang, Y., Yu, M-l., YU, F., LI J-y. & ZHONG, B-x. (2008). Comparative Proteomic Analysis between the Domesticated Silkworm (*Bombyx mori*) Reared on Fresh Mulberry Leaves and on Artificial Diet. *Journal of Proteome Research*. 7, 5103–5111.