

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

PERFIL PROTEÔMICO DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) SOB CONDIÇÃO DE INJÚRIA SÉPTICA CAUSADA POR MICROORGANISMOS

CHARLES SEUCHUCO

CASCAVEL – PR
2018

CHARLES SEUCHUCO

PERFIL PROTEÔMICO DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) SOB CONDIÇÃO DE INJÚRIA SÉPTICA CAUSADA POR MICROORGANISMOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre 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 CONCEIÇÃO SILVA

CASCADEL – PR
2018

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

S523p	<p>Seuchuco, Charles. Perfil proteômico do corpo gorduroso de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) sob condição de injúria séptica causada por microorganismos / Charles Seuchuco.--- Cascavel (PR), 2018. 51 f.: il.</p> <p>Orientador: 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. Peptídeos antimicrobianos. 2. <i>Diatraea saccharalis</i>. 3. MALDI-ToF. 4. Eletroforese. 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 99/1810

CHARLES SEUCHUCO

PERFIL PROTEÔMICO DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) SOB CONDIÇÃO DE INJÚRIA SÉPTICA CAUSADA POR MICROORGANISMOS

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. Dr. Fabio Rogério Rosado
Universidade Federal do Paraná –
Campus Palotina

CASCADEL, 2018

BIOGRAFIA RESUMIDA

Charles Seuchuco, nascido no dia 24 de setembro de 1992, natural da cidade de Realeza – PR, formou-se em Farmácia Generalista na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Cascavel, em março de 2016. Ingressou no programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientado pelo prof. Dr. José Luis da Conceição Silva.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha mãe por todo o amor, por nunca ter medidos esforços para que eu tivesse a melhor educação possível e por sempre apoiar todas as minhas escolhas. Agradeço a minha irmã, Sheila Mara, e a meu cunhado, Valmir José, por todo apoio e dicas preciosas que recebi e agradeço a meu afilhado Théo Joaquim por descontrair os meus finais de semana, amo vocês.

Agradeço a minha namorada, Bárbara Alana, por sempre estar ao meu lado, por todo apoio no dia a dia, por todo carinho, amor e dedicação, por sempre me ouvir, me dar dicas e suporte, te amo.

Agradeço ao meu orientador, Dr. José Luis da Conceição Silva, por todos os ensinamentos passados, por toda a paciência e dedicação comigo e com o projeto, sempre sendo um excelente profissional.

Agradeço a minha amiga, Ana Cláudia, por todo apoio neste trabalho, por toda contribuição, por toda ajuda tanto na parte prática quanto teórica e por toda paciência, meu muito obrigado.

Agradeço ao Professor Luiz Francisco Angeli Alves, por nos permitir utilizar os equipamentos do laboratório de Biotecnologia da UNIOESTE e ao aluno de iniciação científica Felipe Andre pela manutenção das culturas de insetos.

Agradeço ao Dr. Luciano Fernandez Huergo e à Pós-Doutoranda Edileusa Marques Gerhardt do Centro Politécnico da UFPR (Curitiba) por nos permitir usar os equipamentos de seu laboratório e pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço a todos os professores do Laboratório de Bioquímica da UNIOESTE que, de forma direta ou indireta, contribuíram para este trabalho, assim como agradeço a todos os alunos do laboratório que me ajudaram de alguma forma no dia a dia deste mestrado.

Agradeço ao CNPq, a CAPES, à Fundação Araucária e à UNIOESTE pelo apoio a este projeto.

Muito Obrigado.

PERFIL PROTEÔMICO DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) SOB CONDIÇÃO DE INJÚRIA SÉPTICA CAUSADA POR MICROORGANISMOS

Resumo

A *Diatraea saccharalis*, conhecida como broca-da-cana, é uma mariposa da ordem Lepidoptera, tratando-se de uma das principais pragas da cana-de-açúcar, responsável por prejuízos à indústria de açúcar e de álcool. O corpo gorduroso é o órgão responsável por várias funções durante a fase larval dos insetos, principalmente encarregado de sintetizar moléculas com ações metabólicas. O sucesso na adaptação dos insetos se deve ao seu eficiente sistema de defesa, no qual o tecido gorduroso é capaz de sintetizar peptídeos antimicrobianos (PAM's) e secretá-los na hemolinfa, onde atuam como mecanismo de defesa contra patógenos. Os PAM's têm caráter catiônico e apresentam capacidade de interagir com as moléculas de carga negativas das bactérias, levando a desintegração de suas membranas. Considerando as preocupações em relação à resistência bacteriana a antibióticos e às propriedades antimicrobianas dos PAM's como ação rápida, mecanismos de ação variados e amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, têm se tornado atrativo para a realização de estudos para utilização de PAM's como antibiótico alternativo ou complementar. Em *D. saccharalis* já foram relatados PAM's com ação antimicrobiana em artigos recentemente publicados empregando metodologia proteômica. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar a análise diferencial das proteínas e peptídeos do corpo gorduroso no 5º instar de larvas controles e desafiadas com *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Beauveria bassiana*, utilizando eletroforese bidimensional (2-DE) com géis tricina SDS-PAGE 12,5%, espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF e a pesquisa em bancos de dados de proteínas (Mascot e TagIdent). Após análise, foram encontradas seis proteínas de defesa do sistema imune inato utilizando a ferramenta de identificação TagIdent, sendo elas Apolipoporphin-3, Atacina, Atacina-F, Proteína de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs), Provável proteína de defesa 1 e Provável proteína de defesa 3. O PAM Atacina apresentou regulação positiva em relação ao gel controle, indicando que o desafio séptico por *B. bassiana* estimulou o sistema imune da *D. saccharalis*. Este trabalho fornece os primeiros relatos de proteínas do sistema imune produzidas pelo corpo gorduroso de *D. saccharalis*.

Palavras chaves: peptídeos antimicrobianos; *Diatraea saccharalis*; MALDI-ToF; Eletroforese.

PROTEOMIC PROFILE OF ADIPOSE TISSUE OF *DIATRAEA SACCHARALIS* LARVAE (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) UNDER SEPTIC INJURY CAUSED BY MICROORGANISMS

Abstract: *Diatraea saccharalis*, known as a sugarcane borer, is a moth of the Lepidoptera order, being one of the main pests on sugarcane, responsible for damage to the sugar and alcohol industries. The fat body is the organ responsible for several functions during the larval phase of insects, mainly in charge of synthesizing molecules with metabolic actions. The success in insects' adaptation is due to its efficient defense system, in which the fat body is able to synthesize antimicrobial peptides (AMP's) and secrete them in the hemolymph, where they act as a defense mechanism against pathogens. AMP's has a cationic character and present the capacity to interact with negative charge molecules of the bacteria, leading to the disintegration of their membranes. Considering the concerns regarding bacterial resistance to antibiotics and antimicrobial properties of AMP's, such as fast-acting, varied mechanisms of action and wide range against Gram-positive and Gram-negative bacteria; it has become appropriate to carry out studies to use AMP's as alternative or complementary antibiotic. In *D. saccharalis*, AMP's with antimicrobial action have been reported in recently published papers using proteomic methodology. Thereby, this study aimed to perform the differential analysis of the proteins and peptides of the fat body in the 5th instar of larvae challenged with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Beauveria bassiana*; using the two-dimensional electrophoresis technique (2-DE), with 12.5% SDS-PAGE tricine gels, MALDI-TOF type mass spectrometry and the research in protein databases (Mascot and TagIdent). After analysis, six defense proteins of the innate immune system were found using the TagIdent identification tool: apolipoprotein-3, attacin, attacin-F, Peptidoglycan recognition protein (PGRPs), putative defense protein 1 and putative defense protein 3. The AMP attacin presented a positive regulation in relation to the control gel indicating that the *B. bassiana* septic challenge stimulated the immune system of *D. saccharalis*. This study provides the first reports of proteins of the immune system produced by the adipose tissue of *D. saccharalis*.

Keywords: antimicrobial peptides; *Diatraea saccharalis*; MALDI-TOF; Electrophoresis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
Objetivos gerais.....	11
Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
<i>Diatraea saccharalis</i>	12
Sistema imunológico dos insetos	13
Peptídeos antimicrobianos (PAM's).....	14
Resistência aos antimicrobianos	18
Ferramentas proteômicas na busca de novos PAM's.....	19
4. CAPÍTULO I.....	21
Artigo submetido à revista Cells, Tissues and Organs, QUALIS/CAPES B2	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
Manutenção da cultura de <i>D. saccharalis</i>	23
Desafio imunológico das larvas por microrganismos e coleta do material biológico.....	23
Extração e dosagem de proteínas.....	24
Focalização isoeétrica (IEF) das proteínas extraídas	25
Eletroforese bidimensional (2-DE), análise das imagens de géis e digestão com tripsina.....	25
Espectrometria de massa MALDI-ToF.....	26
Identificação das Proteínas em bancos de dados	26
RESULTADOS	27
Dosagem de proteínas do extrato proteico do corpo gorduroso das larvas	27
Análise dos géis de eletroforese bidimensional (2-DE) do extrato proteico do corpo gorduroso de <i>Diatraea saccharalis</i> após desafio por injúria séptica de 6 horas.....	27
Análise dos géis de eletroforese bidimensional (2-DE) do extrato proteico do corpo gorduroso de <i>Diatraea saccharalis</i> após desafio por injúria séptica de 12 horas.....	32
Espectros de massa (MALDI-ToF) e identificação de proteínas do extrato proteico do corpo gorduroso.....	35

Identificação das proteínas presentes no extrato proteico do corpo gorduroso por características bioquímicas.	36
DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
Referências bibliográficas da revisão bibliográfica	44
Referências bibliográficas do Capítulo I	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidade de proteínas obtidas nas amostras de corpo gorduroso de <i>D. saccharalis</i> após desafio imunológico de 6h e 12 horas.	27
Tabela 2 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com <i>B. subtilis</i> após 6 horas.	28
Tabela 3 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com <i>E. coli</i> após 6 horas.	28
Tabela 4 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com <i>B.bassiana</i> após 6 horas.	29
Tabela 5 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com <i>B.subtilis</i> após 12 horas	32
Tabela 6 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com <i>E. coli</i> após 12 horas.	32
Tabela 7 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com <i>B. bassiana</i> após 12 horas.	33
Tabela 8 Spots dos géis de extrato proteico de corpo gorduroso de <i>D. saccharalis</i> que apresentaram identificação positiva pelo servidor Mascot (Matrixscience).	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida da <i>Diatraea saccharalis</i>	13
Figura 2 Interação de um peptídeo antimicrobiano com seu alvo através de interações eletrostáticas. Figura modificada de Carvalho & Machini, 2013b.	15
Figura 3 Mecanismos de desestabilização da membrana celular bacteriana pela ação dos peptídeos antimicrobianos. Figura modificada de Carvalho & Machini, 2013b.	16
Figura 4 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas extraídas do corpo gorduroso das larvas 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 do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com <i>B. subtilis</i> . (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com <i>E. coli</i> . (d) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com <i>B. bassiana</i>	30
Figura 5 Análise dos géis 2-DE em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas com peso molecular de até 30 kDa extraídas do corpo gorduroso das larvas de <i>D. saccharalis</i> após 6 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com <i>B. subtilis</i> . (b) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com <i>E. coli</i> . (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com <i>B. bassiana</i>	31
Figura 6 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas extraídas do corpo gorduroso das larvas 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 do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com <i>B. subtilis</i> . (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com <i>E. coli</i> . (d) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com <i>B. bassiana</i>	34
Figura 7 Análise dos géis 2-DE em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas com peso moleculares de até 30 kDa extraídas do corpo gorduroso das larvas de <i>D. saccharalis</i> após 12 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com <i>B. subtilis</i> . (b) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com <i>E. coli</i> . (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com <i>B. bassiana</i>	35
Figura 8 Espectros carga/massa referente aos spotsCGBs 12 141 (A), CGEc 12 132 (B), CGEc 12 133 (C).	36
Figura 9 Perfil de proteínas obtidas do corpo gorduroso de acordo com a função biológica.	39

1. INTRODUÇÃO

Na agricultura brasileira, a produção de cana-de-açúcar está entre as principais fontes da economia. Uma de suas principais pragas trata-se da *Diatraea saccharalis*, conhecida como broca-da-cana, que pode trazer grandes prejuízos para a indústria de álcool e de açúcar.

A *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), assim como os demais insetos da ordem Lepidoptera, possui um sistema imune inato eficiente contra patógenos. Seus primeiros mecanismos de defesa estão no tegumento, no sistema respiratório e no digestivo. Patógenos como as bactérias não apresentam capacidade para invadir a hemocele (cavidade interna) através do tegumento, apenas quando essa barreira sofre injúrias por outros meios, então encontram outros mecanismos de defesa, como lipídios e proteínas, que são componentes antimicrobianos para evitar o crescimento na hemocele.

O corpo gorduroso de insetos é um órgão metabólico responsável pela homeostase do sistema principalmente durante a fase larval, estoca e produz nutrientes e é onde ocorre a síntese de peptídeos antimicrobianos (PAM's) e outras moléculas efetoras para a defesa do sistema contra patógenos.

Os peptídeos antimicrobianos (PAM's) são efetores do sistema imune inato na proteção da maioria dos organismos vivos, entre eles estão os insetos. A grande maioria dos PAM's têm caráter catiônico. As características das membranas celulares microbianas e as propriedades físico-químicas do peptídeo são os fatores que determinam a interação do PAM com a célula do patógeno. Um exemplo disso está na capacidade de um peptídeo catiônico interagir com as cargas negativas da membrana externa de bactérias Gram-negativas, formando um canal que leva a desestabilização da membrana.

São características como ação rápida, amplo espectro contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas e diferentes mecanismos de ação, que diminuem as chances da ocorrência de resistência de microrganismos estão atraindo atenção para a utilização de PAM's como antibiótico alternativo ou complementar.

Sabendo que os PAM's são sintetizados no tecido gorduroso e têm potencial terapêutico contra patógenos, torna-se relevante a investigação e a identificação dos peptídeos presentes no tecido gorduroso da larva de *D. saccharalis*, popularmente conhecida como broca-da-cana.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

O objetivo desse estudo foi realizar a análise diferencial de proteínas e peptídeos expressos no corpo gorduroso da broca-da-cana, *D. saccharalis*, utilizando eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF. Determinar o perfil proteômico do tecido gorduroso da larva *D. saccharalis* em 5º instar, em grupos de larvas nativas e infectadas com *E. coli*, com *B. subtilis* e com o fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Objetivos específicos

Investigar a presença de proteínas e/ou peptídeos que estejam envolvidos na resposta imune do inseto que apresentem atividade antimicrobiana e que sejam reguladas positiva ou negativamente na situação de infecção por microrganismos utilizados para o desafio séptico. Posteriormente, identificar os peptídeos empregando ferramentas de bioinformática para comparação dos espectros de massas experimentais e características bioquímicas (ponto isoelétrico e massa molecular) com dados depositados nos bancos de dados NCBI e Swissprot usando o servidor Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Diatraea saccharalis

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma monocotiledônea perene da família Gramineae, produzida em climas tropicais e subtropicais, o que favorece ao Brasil ser o seu principal produtor mundial. A cana é utilizada como matéria prima na produção de alimentos, álcool, açúcar, ração animal e seus resíduos são utilizados na geração de energia elétrica. Entre suas principais pragas destacam-se a cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata*), a cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata*), a broca gigante (*Telchin licus*) e as brocas do gênero *Diatraea* spp. (CARVALHO et al., 2013a).

A *D. saccharalis*, (Lepidoptera: Crambidae), é uma mariposa nativa do hemisfério ocidental, distribuída em todo território da América do Sul, Central e Sul dos Estados Unidos, conhecida como broca-da-cana (JOYCE et al., 2014).

As larvas da broca-da-cana podem ser responsáveis por danos diretos e indiretos na planta, desenvolvem-se no interior do colmo da cana-de-açúcar, reduzem sua biomassa e seus açúcares e criam galerias que deixam a planta suscetível à entrada de patógenos e a quebra pelo vento (BERNARDI et al., 2015; JOYCE et al., 2014). Os fungos que causam a podridão do caule, *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*, são comumente encontrados em túneis causados pela *D. saccharalis* (MEDEIROS et al., 2016).

A *D. saccharalis* apresenta quatro estágios morfológicos (Figura 1): Ovo, larva, pupa e mariposas, que reiniciam o ciclo com a oviposição (HOU et al., 2016). Seu ciclo de vida inicia a após o acasalamento, quando a fêmea põe os ovos nas folhas da planta, 5 a 50 em cada postura e sua eclosão ocorre em até nove dias, iniciando o estágio larval, ou de lagarta. Nesta fase perfuram o colmo da planta e passam para o interior da planta, em cerca de 40 dias completam seu desenvolvimento, passando ao estágio de pupa que pode levar em média 10 dias e então emergem para o exterior através dos orifícios criados em sua fase larval, tomam sua forma adulta de mariposa e reiniciam o ciclo (CAPELI, 2012).

A *D. saccharalis* desenvolveu resistência a diversos inseticidas, incluindo carbamatos, organofosforados e piretróides e, por consequência, sendo responsável por perdas econômicas significantes na produção da cana-de-açúcar (KANG et al., 2014). Uma forma de controle biológico é por meio do parasitoide *Cotesia flavipes*,

uma vespa que parasita a broca-da-cana, podendo retardar seu ciclo de vida ou levá-la a morte, afetando significativamente o crescimento populacional (SIMÕES et al., 2012).

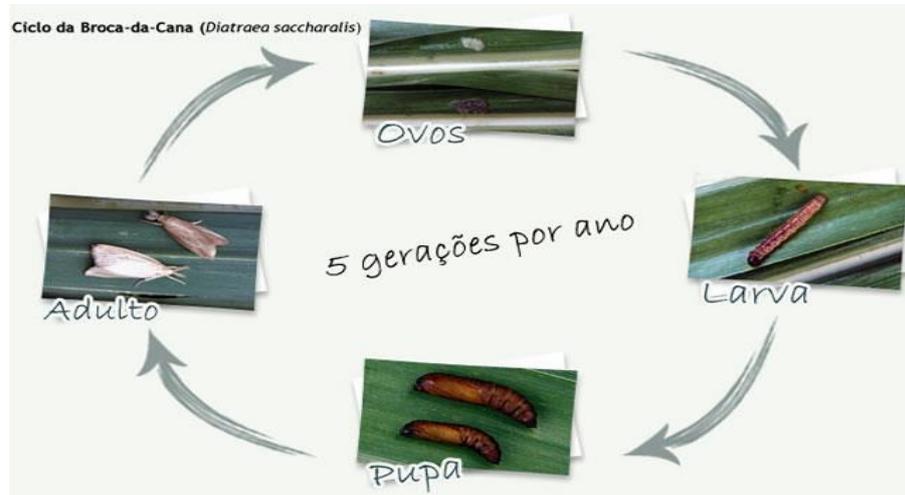


Figura 1 Ciclo de vida da *Diatraea saccharalis* (Fonte: <http://www.biocontrol.com.br/produtos-cotesia>)

Sistema imunológico dos insetos

Os insetos não possuem um sistema imune adaptativo, semelhante aos vertebrados, então, todo seu sistema imunológico de defesa depende do sistema inato para proteção contra patógenos que conseguem ultrapassar sua primeira linha de defesa, as barreiras físicas (CRAVA et al., 2015). O sistema imune inato possui as proteínas de reconhecimento de padrão (PRPs) capazes de reconhecer moléculas estranhas ao hospedeiro. O reconhecimento do patógeno desencadeia a ativação de vias de sinalização para produção de moléculas efetoras para impedir a replicação do microrganismo invasor, amplificando a resposta imune inata e induzindo a produção de fatores com atividade antimicrobiana (KINGSOLVER et al., 2013).

Em insetos, o sistema imune inato pode ser dividido em duas vias. A primeira via é a imunidade celular, composta por hemócitos, que são células responsáveis por interagir e reconhecer as células invasoras. A via celular é responsável pela fagocitose, nodulação e encapsulação. A segunda via é a imunidade humoral, composta por proteínas antimicrobianas, lisozima, enzima fenol-oxidase e outras moléculas efetoras com atividade lítica. Esta via é responsável por realizar a coagulação e a melanização. A hemolinfa atua como centro da resposta imune, nela está presente os hemócitos e é onde ocorrem as cascatas proteolíticas e secreções de peptídeos antimicrobianos (ARDIA et al., 2012; JIANGFAN et al., 2016).

A fagocitose é um processo rápido, mediado por hemócitos, ocorre quando uma partícula estranha é reconhecida, é englobada em um fagossoma e digerida por enzimas hidrolíticas. A encapsulação ocorre quando a partícula invasora é grande demais para ser fagocitada, ocorre por meio da agregação de plasmócitos e granulócitos que envolvem o patógeno. A nodulação ocorre para grandes agregados de bactérias, também ocorre a agregação de granulócitos e plasmócitos que liberam seu conteúdo e envolvem as bactérias, posterior a isso toda a estrutura é melanizada. A melanização corresponde a reações de conversão da tirosina em melanina mediada pela enzima fenol-oxidase, ocorre a formação de uma camada de melanina que envolve o microrganismo invasor, levando-o à morte por falta de nutrientes ou por danos oxidativos (HILLYER, 2016).

A entrada de patógenos estimula a secreção de proteínas antimicrobianas, lisozima e outras moléculas efetoras a partir do tecido gorduroso. O tecido gorduroso é o órgão responsável pela síntese dos PAM's que são secretados na hemolinfa. O corpo gorduroso também apresenta funções metabólicas, síntese e estocagem de nutrientes, é responsável pela homeostase do sistema e pela formação dos outros tecidos, além de participar no metabolismo das diferentes fases da metamorfose dos insetos (PINHEIRO et al., 2010).

Peptídeos antimicrobianos (PAM's)

Peptídeos antimicrobianos estão vastamente distribuídos na natureza. Na base de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) estão depositados 2817 peptídeos distribuídos em diversos reinos, sendo mais abrangente em animais, com 2152 peptídeos registrados com diversas atividades descritas. Por exemplo, atividade antibacteriana, antibiofilme, anti-HIV, antifúngicos, antiparasitários, anticâncer e antioxidante. Para um peptídeo ser adicionado ao banco de dados é necessário que sua sequência de aminoácidos seja determinada e que apresente atividade antimicrobiana (WANG et al., 2014).

Insetos são uma das principais fontes de peptídeos antimicrobianos (PAM's), geralmente apresentam atividades contra bactérias e fungos e outros também contra parasitas e vírus. Em 1974, foi observada pela primeira vez atividade antimicrobiana na hemolinfa da pupa de *Hyalophora cecropia* e, posteriormente, em 1980, foi purificado o primeiro PAM derivado de insetos, a cecropina (STEINER et al., 1981).

Até então, mais de 150 PAM's foram purificados ou identificados (YI et al., 2014). Em insetos, os PAM's são sintetizados no corpo gorduroso da fase larval, geralmente no instar final, quando estão quase passando para o estágio de pupa (PAKKIANATHAN et al., 2012).

Em muitos organismos, os PAM's podem atuar como moduladores da resposta imune inata, mas sua principal função é a eliminação de patógenos (JENSSEN et al., 2006). Uma vasta produção de peptídeos ocorre poucas horas após serem desafiados por patógenos e induzem uma resposta antimicrobiana efetiva (VILCINSKAS, 2015).

Uma característica especial dos PAM's é a menor probabilidade para que bactérias desenvolvam resistência contra eles, pois esses não utilizam um mecanismo específico como receptor ou proteínas do alvo para realizar sua atividade antimicrobiana, atuando diretamente nas membranas celulares bacterianas (OÑATE-GARZÓN et al., 2016). O mecanismo de ação dos PAM's é baseado em suas propriedades estruturais, como sequência de aminoácidos, tamanho molecular, natureza catiônica e anfipaticidade (CHUNG & KHANUM, 2016). O princípio básico da interação entre o PAM com seu alvo é por meio de interações eletrostáticas (Figura 2), em que o PAM com natureza catiônica interage com estruturas de natureza aniônicas presentes nas membranas celulares (MYLONAKIS et al., 2016). Por exemplo, com os grupos fosfatos dentro dos lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas ou com os ácidos lipoteicóicos presentes na superfície de membrana das bactérias Gram-positivas (JENSSEN et al., 2006).

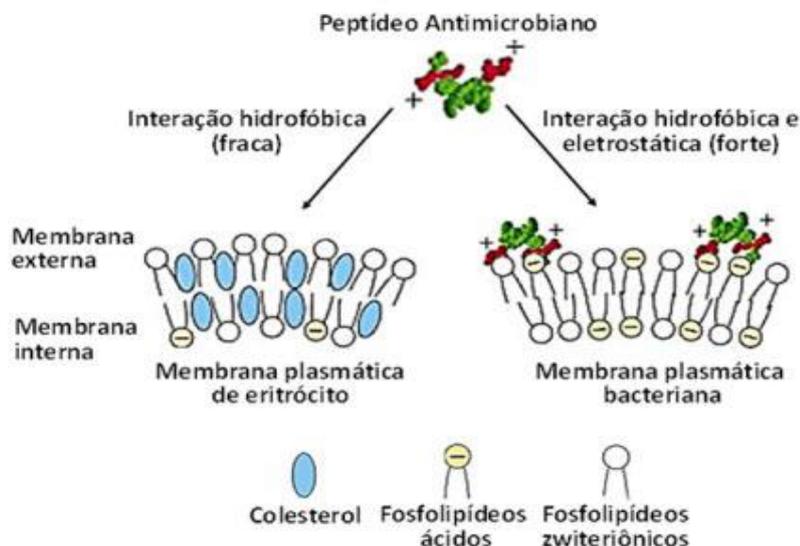


Figura 2 Interação de um peptídeo antimicrobiano com seu alvo através de interações eletrostáticas. Figura modificada de Carvalho & Machini, 2013b.

Existem mais de um modelo para tentar explicar o mecanismo de ação utilizado pelos PAM's para desestabilizar a membrana celular bacteriana (Figura 3). O primeiro é o modelo de poros é o *Barrel stave*, em que os peptídeos interagem lateralmente entre si e criam um canal específico semelhante a um canal de íons, o outro modelo de poros é o *Toroidal*, nesse caso não ocorre interação específica peptídeo-peptídeo, o que acontece é uma interação dos peptídeos com a curvatura da membrana até a formação de uma interação do peptídeo com o lipídio da membrana da bactéria. Mecanismos de ação que não formam poros também são utilizados para explicar como ocorre a desestabilização da membrana, o modelo *Carpet* é o mais citado, neste caso os peptídeos se acumulam na superfície da membrana e quando atingem uma concentração crítica ocorre a permeabilização, pois ocorreu uma desestabilização global da bicamada (WIMLEY & HRISTOVA, 2011).

Outros mecanismos de ação utilizados pelos PAM's podem ser a inibição da síntese de proteínas e bactérias, a repressão de processos celulares e inibição da síntese da parede celular. Por exemplo, drosomicina e apidaecina, peptídeos isolados de insetos, causam choques térmicos em células e reprimem suas respostas de estresse, outro exemplo é o buforina II, isolado do sapo asiático *Bufo gargarzins* que atravessa a membrana celular e inibe funções de DNA e RNA (AOKI & UEDA, 2013).

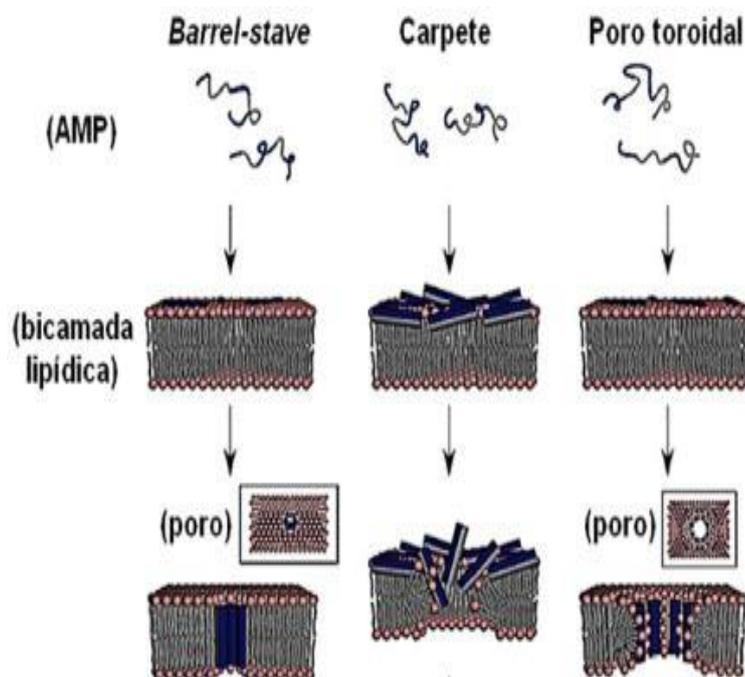


Figura 3 Mecanismos de desestabilização da membrana celular bacteriana pela ação dos peptídeos antimicrobianos. Figura modificada de Carvalho & Machini, 2013b.

O tamanho dos peptídeos varia de 10-50 resíduos de aminoácidos e são classificados de acordo com o tipo de aminoácidos e sua conformação estrutural (CHUNG & KHANUM, 2016). Os PAM's de insetos podem ser classificados de acordo com sua estrutura conformacional em três grandes classes: peptídeos alfa-hélice linear, peptídeos folha-beta globular e peptídeos que contêm grande número de aminoácidos específicos (Ricos em glicina, ricos em prolina e ricos em cisteína) (MYLONAKIS et al., 2016).

Cecropinas são uma das principais classes de PAM's nos insetos, têm estrutura alfa-hélice, são catiônicos e apresentam um espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. As defensinas são outra classe importante de PAM's derivados de insetos, apresentam estrutura folha-beta globular. Apresentam atividade antimicrobiana principalmente para bactérias Gram-positivas como *B. subtilis* ou *Staphylococcus aureus*, algumas defensinas apresentam atividade para Gram-negativas como *E. coli* e alguns fungos. Outra classe que se destaca é a das atacinas, apresentam uma estrutura conformacional de peptídeos ricos em glicina, a maioria das atacinas apresenta atividade contra Gram-negativas, principalmente para *E. coli*, mas também apresentam atividade para algumas bactérias Gram-positivas, ex. *B. subtilis* e *Listeria monocytogenes* e fungos, ex. *Candida albicans*. Outras classes que já foram identificadas em insetos são lebecinas, gloverinas e moricinas (YI et al., 2014).

Devido a sua diversidade de mecanismos de ação, rara aquisição de resistência, alta estabilidade a variações de pH e temperatura, baixa toxicidade a células eucarióticas e sua efetividade contra organismos patogênicos que são resistentes as drogas convencionais os PAM's são considerados como potenciais futuros antibióticos. Também existem grandes dificuldades que impedem o desenvolvimento de PAM's como novas drogas: Atividade hemolítica, alguns peptídeos podem interagir diretamente com as células do hospedeiro e promover lise celular. Rápida eliminação do corpo humano, alguns PAM's podem ser degradados rapidamente por proteases. Redução de atividade por sensibilidade a sais; para que ocorra a interação eletrostática com as células-alvo os peptídeos precisam formar suas estruturas secundárias, que são sensíveis a altas concentrações de sais presentes nos fluidos do corpo humano. A alta quantidade de peptídeos necessária para testes clínicos tem um custo muito elevado em comparação a antibióticos tradicionais e a produção de heterologos em sistemas

procariontes é dificultada devido à toxicidade dos PAM's para as células procariontes (AOKI & UEDA, 2013; CHUNG & KHANUM, 2016).

A maioria dos PAM's para aplicação clínica que estão em fase de testes foram desenvolvidos em forma farmacêutica tópica. Pexiganan é o PAM mais investigado em relação ao desenvolvimento de drogas e mostrou eficácia em ensaios clínicos de fase III para tratamento de infecções de úlceras de pé diabético e *Omiganan* está em desenvolvimento para prevenção de infecções associadas ao cateter (SEO et al., 2012; CHUNG & KHANUM, 2016).

Resistência aos antimicrobianos

O primeiro antibiótico a ser descoberto foi a penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, e atualmente toneladas de antibióticos são produzidos anualmente, e, enquanto isso, bactérias têm habilidades para utilizar várias estratégias para desenvolver resistência contra antibióticos (CHAKRABORTI et al., 2014).

O uso excessivo e abusivo de antibióticos na medicina humana e veterinária, na agricultura e em alimentos levou a criação de mecanismos de resistência a drogas por parte das bactérias. Além de ser um problema de saúde pública, a resistência a antibióticos representa um alto custo financeiro para os sistemas de saúde (SIDRACH-CARDONA et al., 2014).

O problema de resistência a antibióticos toma uma proporção ainda maior com as bactérias resistentes a múltiplas drogas e a formação de biofilmes, agregados de bactérias que são encapsulados e dificultam ainda mais a penetração do antibiótico (DEMAIN & SANCHEZ, 2009).

São vários mecanismos de resistência aos antibióticos que impactam o tratamento clínico de doenças. O primeiro consiste em evitar o acesso do antibiótico ao seu alvo por meio da redução da expressão de poros ou aumento da bomba de efluxo. O segundo mecanismo é baseado na alteração do sítio alvo evitando o reconhecimento pela droga. Por fim, as bactérias são capazes de exercer alterações na molécula da droga inativando-as (BLAIR et al., 2014).

A resistência a antibióticos pode ser natural ou adquirida. Dois elementos são importantes para o desenvolvimento da resistência a antibióticos: Um antibiótico capaz de eliminar quase todas as bactérias de uma colônia heterogênea e uma

bactéria transportando um gene capaz de expressar resistência a esse antibiótico (resistência natural), quando este gene é propagado para outras bactérias por meio de mecanismos genéticos como transdução, transformação, transposição e conjugação ocorre a resistência adquirida (ALANIS, 2005; RIBEIRO & CORTINA, 2016).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade no mundo, as taxas de resistência aos antimicrobianos estão elevadas, principalmente em ambientes hospitalares e existem poucos fármacos novos disponíveis no mercado. Esses dados alarmantes reforçam a necessidade para a busca de novas moléculas com propriedades antimicrobianas, com novos mecanismos de ação. Os produtos naturais são o ponto de partida para a descoberta de muitas classes de antibióticos, desde o ano 2000 apenas cinco classes de drogas foram descobertas para tratamento de infecções humanas, sendo três delas provenientes de produtos naturais (GUIMARÃES et al., 2010; HARVEY et al., 2015).

Ferramentas proteômicas na busca de novos PAM's

O termo proteoma significa o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma. São todas as proteínas que intervêm nos processos biológicos de uma espécie. As proteínas têm diversas funções e exercem papéis essenciais em todos os processos biológicos. Após conhecer o genoma humano, o novo objetivo dos cientistas foi determinar a composição, a estrutura e as funções de todas as proteínas para entender como elas interagem entre si (LANÇAS et al., 2003).

Diferente do genoma que é estático, o proteoma é dinâmico. O status fisiológico e a fase de diferenciação celular alteram o seu perfil. O proteoma é amplo, apresenta os produtos traduzidos das sequências genômicas e proteínas resultantes dos processos pós-transcricionais e pós-traducionais (BARBOSA et al., 2012).

As indústrias farmacêuticas apresentam enorme interesse pelo proteoma, pois procuram novos alvos e proteínas específicas para que possam trabalhar para o desenvolvimento de um novo medicamento (LANÇAS et al., 2003).

Uma das técnicas mais comuns para avaliar a expressão de proteínas é por meio da eletroforese bidimensional (2-DE). Para obtenção de bons resultados utilizando a eletroforese é necessário que a extração de proteínas tenha sido

adequada. Por se tratar de amostras de origem biológica distintas, cada uma necessita de uma otimização individual. Em muitos casos, as proteínas precisam ser desagregadas, solubilizadas, desnaturadas e submetidas a tratamento com agentes redutores de pontes dissulfeto (BARBOSA et al., 2012).

A metodologia da eletroforese 2-DE é dividida em duas etapas. A primeira etapa é a focalização isoelétrica (IEF), onde as moléculas migram em um gradiente de pH imobilizado até atingirem seu ponto isoelétrico (pI). Na segunda etapa, as proteínas são separadas por peso molecular, a eletroforese ocorre em direção perpendicular à IEF, em um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As bandas ou *spots* são corados com azul de Coomassie, nitrato de prata ou outro corante comercial para que fiquem visíveis. Os géis são digitalizados e analisados por softwares para quantificação de volumes proteicos e intensidades (BARBOSA et al., 2012).

Com o advento de métodos de ionização e de dessorção a laser auxiliado por matriz, a espectrometria de massa (MALDI-MS) se tornou o método principal para análise de proteínas, levando a pesquisas de proteoma acontecerem com maior abrangência, qualidade, profundidade e velocidade (RICHARDS et al., 2015).

Por meio da técnica de MALDI-ToF (time of flight) é possível determinar a massa da proteína analisada, em que os peptídeos são cristalizados em uma matriz sólida, a qual é bombardeada com um laser para ionizar os peptídeos com uma carga positiva. Nesta técnica, as partículas menores passam através de um tubo de voo mais rápido que as partículas maiores e com mais carga, assim é gerado um espectro de picos de massa e carga (DAVIS & HANASH, 2006). Os peptídeos detectados por MS podem ser comparados com um banco de dados de proteínas e peptídeos de organismos com genes já sequenciados (RICHARDS et al., 2015).

O estudo proteômico já resultou na identificação de diversos PAM's, exemplos são: gloverinas, cecropinas e defensinas (CELORIO-MANCERA et al., 2011). Por meio da técnica utilizando MALDI-ToF, o peptídeo antifúngico diapausina foi isolado da hemolinfa da Lepidoptera *Manduca sexta*, por Souhail et al. (2016) e o peptídeo gloverina foi identificado na hemolinfa de *D. sachharalis* por Silva et al. (2010). Rocha et al. (2016) também descreveram peptídeos presentes na hemolinfa da *D. saccharalis* que podem estar envolvidos na resposta imune de insetos, como defensin-like e attacin-like.

4. CAPÍTULO I

Artigo submetido à revista Cells, Tissues and Organs, QUALIS/CAPES B2

ALTERAÇÕES DO PERFIL PROTEÔMICO DO CORPO GORDUROSO DE LAGRATAS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) SOB CONDIÇÃO DE INJÚRIA SÉPTICA

Charles SEUCHUCO¹, José Luis da Conceição SILVA¹.

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, 85819-110

RESUMO

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga da cana-de-açúcar responsável por grandes prejuízos à indústria de açúcar e de álcool. Os insetos são adaptados aos mais variados ambientes, sendo amplamente distribuídos na natureza, isso se deve ao seu sistema imune inato extremamente eficiente em reconhecimento de patógenos e na produção de moléculas efetoras para impedir o invasor. Os peptídeos antimicrobianos (PAM's) são produzidos no corpo gorduroso, órgão metabólico dos insetos responsável pela produção de moléculas de defesa do sistema imune. Uma análise diferencial das proteínas expressas no corpo gorduroso da larva de *D. saccharalis* após desafio séptico com microrganismos foi realizada utilizando eletroforese 2-DE em gel tricina SDS-PAGE 12,5%, espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF e comparação com bancos de dados (Mascot e TagIdent) para avaliar a resposta do sistema imune inato. Neste trabalho foram encontradas seis proteínas ortólogas de defesa do sistema imune inato utilizando a ferramenta de identificação TagIdent, sendo elas Apolipophorin-3, Atacina, Atacina-F, Proteína de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs), Proteína de defesa pupativa 1 e Proteína de defesa pupativa 3. O PAM Atacina apresentou regulação positiva em relação ao gel controle, indicando que o desafio séptico por *B. bassiana* estimulou o sistema imune da *D. saccharalis*. Este trabalho fornece os primeiros relatos de proteínas do sistema imune e proteínas com funções estruturais e bioquímicas produzidas pelo corpo gorduroso de *D. saccharalis*.

Palavras chave: Imunidade inata, Peptídeos antimicrobianos, Espectrometria de massas, Eletroforese bidimensional, *Diatraea saccharalis*.

Título reduzido: Alterações do perfil proteômico do corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis*.

INTRODUÇÃO

A lagarta *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga da cana-de-açúcar presente em todo o território da América do Sul, seu estudo torna-se relevante tendo em vista que o Brasil é um dos principais produtores mundiais de cana-de-açúcar (JOYCE, 2014). A broca-da-cana, como é conhecida, é responsável por grandes prejuízos econômicos à indústria de açúcar e de álcool (CARVALHO et al, 2013a). A safra de cana-de-açúcar em 2016/2017 obteve uma produção de 30,3 bilhões de litros de álcool e 37,5 milhões de toneladas de açúcar em nove milhões de hectares plantados no Brasil segundo Almeida (2016), tendo um prejuízo de R\$ 4,88 bilhões em perdas de produção devido a danos causados pela broca-da-cana e em gastos em seu controle biológico.

A disseminação da praga é mantida em baixos níveis por meio do controle biológico realizado com a liberação massiva da vespa *Cotesia flavipes* nas plantações, contudo, a broca-da-cana ainda é encontrada em plantações de cana-de-açúcar, porém, em quantidades aceitáveis (SANDOVAL & SENÔ, 2010).

Os insetos são adaptados aos mais variados ambientes, sendo amplamente distribuídos na natureza, isso se deve ao seu sistema imune inato extremamente eficiente em reconhecimento de patógenos e produção de moléculas efetoras para impedir o invasor (KINGSOLVER et al., 2013). Este sistema é dividido em via celular, com a atuação dos hemócitos e via humoral, que é representada por proteínas antimicrobianas (ARDIA et al., 2012).

O corpo gorduroso (CG) de insetos é um órgão metabólico responsável pela homeostase do sistema e nele são produzidas moléculas efetoras de defesa do organismo frente a uma invasão por patógenos. Os peptídeos antimicrobianos (PAM's) são produzidos no CG e secretados na hemolinfa onde irão atuar para a eliminação dos patógenos (bactérias, fungos, vírus) (PINHEIRO et al., 2010).

Os PAM's apresentam um mecanismo de ação baseado em suas propriedades estruturais de natureza catiônica e de anfipacidade, interagindo e desestabilizando as membranas celulares dos microrganismos, essas características levam a uma menor probabilidade de os patógenos desenvolverem resistência à efetividade desses peptídeos (OÑATE-GARZÓN et al., 2016; CHUNG & KHANUM, 2016).

O sistema imune de espécies de Lepidópteros modelos como *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Galleria melonella*, por exemplo, vem sendo estudado e diversas famílias de PAM's, como atacinas, defensinas e cecropinas já foram isoladas em suas hemolinhas. Gloverinas e moricinas são famílias de PAM's encontrados exclusivamente nos Lepidópteros. A família de lelocinas foi isolada pela primeira vez na hemolinha do bicho-da-seda, *B. mori*, os quais apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e contra alguns fungos (YI et al., 2014). Nos últimos anos, Silva et al. (2010) identificaram o peptídeo gloverina induzido por desafio séptico na hemolinha de *D. saccharalis* e, recentemente, Rocha et al. (2016) também reportaram na hemolinha uma *Attacin-like protein* que está envolvida na resposta imune de *D. saccharalis*.

Nesse estudo, utilizamos a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) e analisamos as alterações no perfil da expressão de proteínas do corpo gorduroso de larvas de *D. saccharalis* após o desafio por injúria séptica com microrganismos, buscando investigar a regulação de proteínas que possam estar envolvidas com o sistema imune inato. Este é o primeiro relato na literatura de proteínas e peptídeos expressos no corpo gorduroso de *D. saccharalis* sob desafio de injúria séptica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção da cultura de *D. saccharalis*

As larvas de *D. saccharalis* foram tratadas com uma dieta específica (HENSLEY e HAMOND, 1968) e em condições controladas, com temperatura média de 26 ± 1 °C e 70% de umidade. Ao atingirem o 5º ínstar, as larvas foram retiradas dos tubos de dieta, em fluxo laminar, e higienizadas com álcool 70%.

Desafio imunológico das larvas por microrganismos e coleta do material biológico

As larvas foram desafiadas pelas bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) conforme a metodologia descrita por Rocha et al. (2016) e pelo fungo *Beauveria bassiana* de acordo com Liu et al. (2014), utilizando microaplicador de precisão (Burkard-PAX 100-3) para injetar 3 µL da suspensão de microrganismos.

O inóculo de bactérias foi preparado em meio Luria Bertani (LB), e, após crescimento overnight (14-16 horas a 37 °C), o meio foi centrifugado (800x g/10 min) e o precipitado foi lavado com tampão PBS (fosfato de sódio dibásico 4,3 mM, monobásico 1,4 mM e cloreto de sódio 137 mM). A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm para padronizar a concentração 10^6 células/ μ L de microrganismos.

O inóculo de *Beauveria bassiana* foi preparado em um tubo de ensaio contendo as células do fungo, água e Tween, posteriormente foram feitas as diluições e a contagem de conídios em câmara de Neubauer. A partir da média de conídios/ μ L, preparou-se uma suspensão a 2×10^8 conídios/ μ L.

O experimento foi conduzido utilizando 50 larvas para cada grupo, sendo um grupo controle (sem desafio) e um grupo para cada microrganismo utilizado no desafio, totalizando quatro grupos de amostra. Foram realizados dois experimentos separados, sendo um experimento com tempo de coleta do corpo gorduroso após 6 horas e outro experimento com tempo de 12 horas após o desafio imunológico das larvas.

O corpo gorduroso de larvas de 5º ínstar foi coletado e transferido para um microtubo imerso em gelo, contendo cristais de Feniltiourea (Sigma) e PMSF (1mM), para evitar, respectivamente, a melanização e a ação das proteases. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até a extração de proteínas.

Extração e dosagem de proteínas

A extração de proteínas seguiu o protocolo de Masova et al. (2010), no qual o corpo gorduroso foi homogeneizado em tampão de lise e sonicado em um aparelho Ultronique QR500 por 10 segundos, três vezes na potência 60%, posteriormente centrifugado (16000x g/10 min), o extrato de proteínas foi obtido no sobrenadante.

Posteriormente, foi utilizado o protocolo de Pakkianathan et al. (2012) para extrair as proteínas utilizando metanol, em seguida, o metanol foi desprezado e o pellet de proteínas foi desidratado em banho seco a 37°C para evaporação total do solvente e re-solubilizado em água. As proteínas totais foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

Focalização isoeétrica (IEF) das proteínas extraídas

A focalização isoeétrica em um sistema da IPGphor (Amersham Biosciences). Cerca de 500 µg de proteínas totais extraídas foram aplicadas em tiras de gradientes de pH imobilizados (Immobiline drystrips, pH 3-10, GE Healthcare) para a focalização. Os parâmetros para focalização isoeétrica foram fixados em 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 (pI) passaram por etapas de redução e alquilação das proteínas, acondicionamento em 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). Na primeira etapa, as tiras foram mantidas na solução de equilíbrio adicionada de 1% de ditioneína (DTT) por 30 minutos para a redução dos grupamentos tiólicos das proteínas. Em seguida, as tiras foram mantidas na solução de equilíbrio adicionadas de 2,5 % de iodoacetamida (IAA) por 30 minutos para a alquilação e a estabilização dos grupos tiol das proteínas e eliminação do DTT residual. As tiras foram transferidas para o sistema de eletroforese (Ruby-Amersham) para a realização da 2-DE em Tricina SDS-PAGE 12,5%. Essas análises seguiram a metodologia descrita por Zhou et al. (2008).

Foi realizado um gel 2-DE para cada amostra de tecido gorduroso coletado. A eletroforese foi realizada na programação de 600 volts para entrada no gel, com corrente de 8 mA/gel durante 30 minutos, e fase 2 de 600 volts, 30 mA/gel até o final da corrida. O sistema foi refrigerado à 12 °C com bomba de circulação de água (Marconi MA-186). Posteriormente, os géis foram fixados e corados por Coomassie Coloidal (G-250) overnight. Após o processo de descoloração do gel, esses foram escaneados no Image Scanner Amersham e os spots proteicos expressos foram analisados com o software ImageMaster 2-DE Platinum 6.0.

A análise incluiu a detecção automática de spots, seguida por designação manual dos spots como pontos de referência para o alinhamento do gel. Os spots

diferencialmente expressos em condição de infecção de, pelo menos, 1,5 vezes, foram determinados ao serem comparados com o gel da amostra controle (SONG et al., 2008). Os spots mais evidentes e delimitados de cada gel foram excisados e digeridos com Tripsina (Promega-USA) de acordo com protocolo de Shevchenko et al. (1996).

Espectrometria de massa MALDI-ToF

As amostras digeridas com Tripsina Gold (Promega) foram analisadas utilizando o equipamento híbrido MALDI-ToF-MS/MS (Brucker Daltonics) modelo autoflex II. O programa de computador utilizado foi o FlexControl 2.0. A análise dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0.

Identificação das Proteínas em bancos de dados

Os espectros de massa ou Peptides Mass Fingerprint (PMF) das amostras foram analisados com a interface MASCOT (Matrix Science) - <http://www.matrixscience.com> - associado ao uso de banco de dados para *Drosophila melanogaster* depositados no Swiss-Prot e NCBI. Os parâmetros de busca utilizados foram: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável e janela de erro de 200 ppm.

De acordo com as características bioquímicas das proteínas (peso molecular e o ponto isoelétrico) foi realizada uma busca nos bancos de dados de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot especificado para Lepidópteros, utilizando a ferramenta TagIdent na plataforma online ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal).

RESULTADOS

Dosagem de proteínas do extrato proteico do corpo gorduroso das larvas

As concentrações de proteínas nas amostras de corpo gorduroso encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 Quantidade de proteínas obtidas nas amostras de corpo gorduroso de *D. saccharalis* após desafio imunológico de 6h e 12 horas.

Amostra	Proteína (mg/ml)
Corpo gorduroso controle 6h	11,78
Corpo gorduroso desafiado <i>E. coli</i> 6h	87,21
Corpo gorduroso desafiado <i>B. subtilis</i> 6h	89,23
Corpo gorduroso desafiado <i>B. bassiana</i> 6h	8,04
Corpo gorduroso controle 12h	124,13
Corpo gorduroso desafiado <i>E. coli</i> 12h	106,87
Corpo gorduroso desafiado <i>B. subtilis</i> 12h	102,25
Corpo gorduroso desafiado <i>B. bassiana</i> 12h	94,04

Podem-se observar altos valores de dosagem, contudo, essa concentração elevada deve-se aos interferentes no tampão de lise, que algumas vezes proporciona superestimativa da concentração de proteínas nas amostras.

Análise dos géis de eletroforese bidimensional (2-DE) do extrato proteico do corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis* após desafio por injúria séptica de 6 horas

O gel 2-DE de proteínas do corpo gorduroso de *D. saccharalis*, após desafio por injúria séptica de 6 horas com *B. subtilis*, apresentou 66 spots com peso molecular (PM) de 16 a 91 kDa sendo 19 spots menores que 30 kDa. O ponto isoelétrico (pI) dos spots apresentou uma variação de 3,5 a 9,6. Sete spots apresentaram match significativo com o gel controle, ou seja, obtiveram um ratio > 1,5, sendo que três spots apresentaram upregulation, pois estão mais concentrados no gel desafiado em comparação ao gel controle e quatro spots sofreram downregulation, apresentando uma concentração maior no gel controle em comparação ao gel desafiado. Os spots que apresentaram match significativo encontram-se na Tabela 2 com seus respectivos pesos moleculares, pI e concentração.

Tabela 2 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com *B. subtilis* após 6 horas.

Gel	Spot ID	PM (kDa)	pI	Ratio	[Controle]	[Desafiado]
CGBs	87	49	7,2	1,6	2,099	1,333
CGBs	107	37	6,2	1,5	0,834	0,545
CGBs	117	31	6,0	1,5	0,816	1,195
CGBs	123	30	7,2	1,5	0,477	0,706
CGBs	134	23	7,6	1,9	0,219	0,410
CGBs	144	20	9,6	1,6	2,575	1,646
CGBs	147	18	6,1	1,5	0,457	0,702

CGBs: Corpo gorduroso desafiado por *B. subtilis*. Spot ID: Número de identificação do spot no gel. PM: Peso molecular. pI: Ponto isoelétrico.

O gel 2-DE de proteínas do corpo gorduroso de *D. saccharalis*, após 6h de desafio séptico com *E. coli*, apresentou 77 spots com peso molecular de 14 a 81 kDa, sendo 32 spots com peso molecular até 30 kDa. O pI variou de 3,3 a 9,6. Neste gel, 16 spots apresentaram match significativo com o gel controle, 4 apresentaram upregulation e 12 sofreram downregulation. Os spots que apresentaram match significativo encontram-se na Tabela 3 com seus respectivos pesos moleculares, pI e concentração.

Tabela 3 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com *E. coli* após 6 horas.

Gel	Spot ID	PM (kDa)	pI	Ratio	[controle]	[Desafiado]
CGEc	48	74	7,1	1,5	2,157	1,472
CGEc	82	53	9,5	1,8	1,847	1,038
CGEc	65	62	5,8	1,9	1,194	0,636
CGEc	70	60	6,0	1,6	5,020	3,177
CGEc	68	60	5,0	2,5	1,134	0,455
CGEc	90	51	6,9	1,5	1,023	0,680
CGEc	94	49	6,2	1,6	2,575	1,586
CGEc	97	48	7,0	2,6	2,254	0,858
CGEc	114	42	9,1	1,9	1,576	0,818
CGEc	133	37	8,3	1,8	0,821	1,438
CGEc	140	35	6,6	2,0	7,982	3,970
CGEc	143	35	6,9	1,7	4,501	2,574
CGEc	175	25	6,4	1,7	1,501	0,894
CGEc	188	23	3,9	1,6	0,355	0,564
CGEc	184	24	7,9	1,5	0,154	0,228
CGEc	204	18	5,8	3,3	0,178	0,595

CGEc: Corpo gorduroso desafiado por *E. coli*. Spot ID: Número de identificação do spot no gel. PM: Peso molecular. pI: Ponto isoelétrico

O gel 2-DE de proteínas do corpo gorduroso de *D. saccharalis*, desafiado por injúria séptica com *B. bassiana*, após 6h apresentou 69 spots com peso molecular de 16 a 89 kDa, sendo 25 spots com peso molecular de até 30 kDa. O pI variou de 4,1 a 9,8. Neste gel, 20 spots obtiveram match significativo com o gel controle, sendo que 4 apresentaram upregulation e 16 sofreram downregulation. Os spots que

apresentaram match significativo encontram-se na Tabela 4 com seus respectivos pesos moleculares, pI e concentração.

Tabela 4 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com *B. bassiana* após 6 horas.

Gel	Spot ID	PM (kDa)	pI	Ratio	[Controle]	[Desafiado]
CGBb	64	62	5,2	4,0	6,049	1,498
CGBb	78	58	4,1	2,1	9,196	4,453
CGBb	79	58	7,0	4,8	12,472	2,579
CGBb	85	55	8,0	2,4	3,139	1,322
CGBb	76	57	4,8	1,7	2,865	4,961
CGBb	97	48	7,2	2,3	3,644	1,551
CGBb	96	48	7,0	1,8	4,645	2,559
CGBb	99	48	7,8	2,5	2,916	1,150
CGBb	104	46	5,0	1,6	3,469	2,160
CGBb	122	36	8,3	5,9	0,726	4,278
CGBb	119	36	7,6	2,4	1,664	0,706
CGBb	127	33	7,8	2,9	3,469	1,199
CGBb	140	29	9,8	5,2	0,753	3,940
CGBb	153	25	6,0	1,5	0,618	0,907
CGBb	141	28	7,9	4,1	1,959	0,482
CGBb	147	26	6,9	5,1	1,902	0,374
CGBb	152	25	8,3	1,7	1,170	0,703
CGBb	157	23	5,8	2,0	0,886	0,452
CGBb	168	18	6,7	2,3	2,175	0,930
CGBb	217	16	5,6	7,5	0,976	0,130

CGBb: Corpo gorduroso desafiado por *B. bassiana*. Spot ID: Número de identificação do spot no gel. PM: Peso molecular. pI: Ponto isoelétrico

A Figura 4 apresenta o gel 2-DE do extrato proteico controle de corpo gorduroso de *D. saccharalis* e os géis 2-DE dos extratos proteicos de corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis* desafiados por injúria séptica com microrganismos em um tempo de 6 horas.

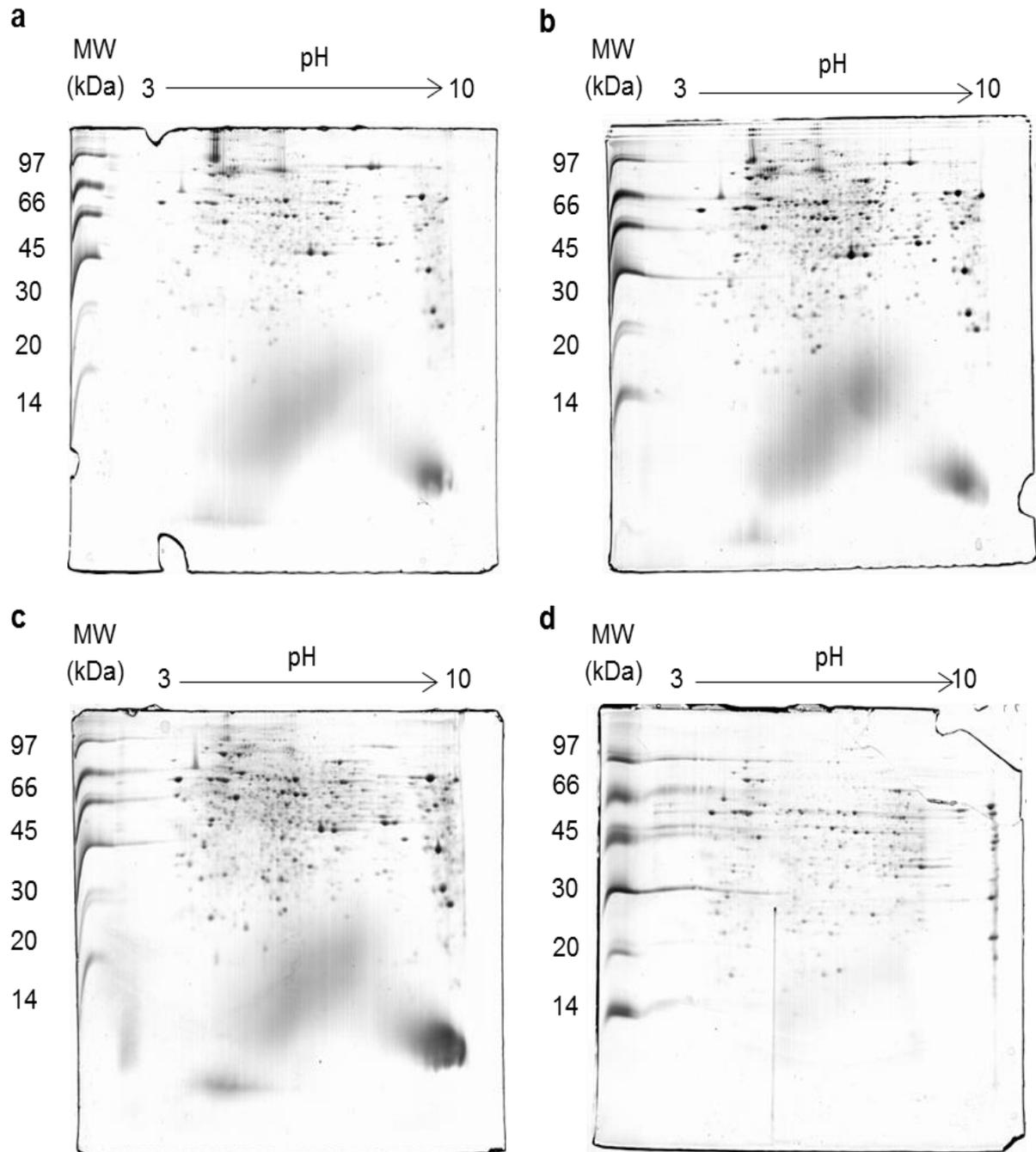


Figura 4 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas extraídas do corpo gorduroso das larvas de *D. saccharalis* após 6 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico controle. (b) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com *B. subtilis*. (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com *E. coli*. (d) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com *B. bassiana*

A Figura 5 destaca os spots com peso molecular menor do que 30 kDa e que apresentaram diferença significativa (ratio > 1,5) quando comparados no gel controle e no gel desafiado por injúria séptica com microrganismos no tempo de 6 horas.

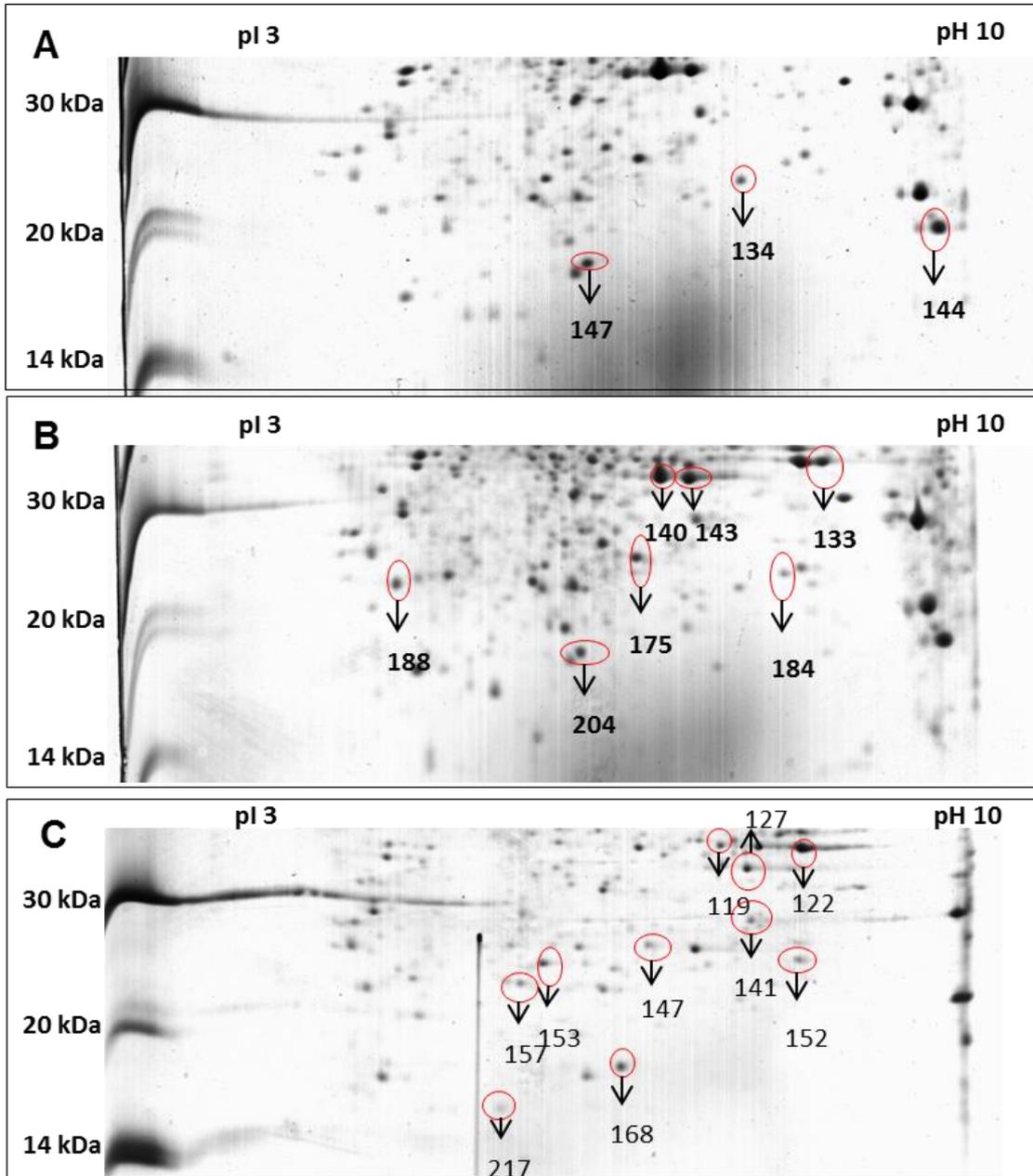


Figura 5 Análise dos géis 2-DE em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas com peso molecular de até 30 kDa extraídas do corpo gorduroso das larvas de *D. saccharalis* após 6 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com *B. subtilis*. (b) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com *E. coli*. (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 6 horas com *B. bassiana*

Análise dos géis de eletroforese bidimensional (2-DE) do extrato proteico do corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis* após desafio por injúria séptica de 12 horas

O gel 2-DE de proteínas do corpo gorduroso desafiado por injúria séptica com *B. subtilis* por 12 horas apresentou 34 spots com peso molecular de 16 a 78 kDa, sendo 17 spots menores de 30 kDa. O pI variou de 3,9 a 9,2. O gel apresentou sete spots com match significativo com o gel controle, sendo 5 com upregulation e 2 que sofreram downregulation. Os spots que apresentaram match significativo encontram-se na Tabela 5 com seus respectivos pesos moleculares, pI e concentração.

Tabela 5 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com *B.subtilis* após 12 horas

Gel	Spot ID	PM (kDa)	pI	Ratio	[Controle]	[Desafiado]
CGBs	212	61	9,1	5,6	1,196	6,639
CGBs	80	46	5,6	1,5	3,237	4,951
CGBs	117	35	6,9	3,5	1,745	6,063
CGBs	120	34	7,2	1,8	3,921	7,035
CGBs	154	22	4,2	3,1	1,284	0,408
CGBs	147	25	5,7	1,5	0,922	1,396
CGBs	167	18	6,0	1,5	1,275	0,925

CGBs: Corpo gorduroso desafiado por *B. subtilis*. Spot ID: Número de identificação do spot no gel. PM: Peso molecular. pI: Ponto isoelétrico

O gel 2-DE desafiado por injúria séptica com *E. coli* 12h apresentou 41 spots com peso molecular de 15 a 92 kDa, sendo 15 spots menores de 30 kDa. O pI variou de 4,3 a 9,1. O gel apresentou 11 spots com match significativo com o gel controle, sendo 6 com upregulation e 5 que sofreram downregulation. Os spots que apresentaram match significativo encontram-se na Tabela 6 com seus respectivos pesos moleculares, pI e concentração.

Tabela 6 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com *E. coli* após 12 horas

Gel	Spot ID	PM (kDa)	pI	Ratio	[Controle]	[Desafiado]
CGEc	39	74	5,3	1,5	1,984	3,051
CGEc	51	62	5,1	1,5	0,889	1,365
CGEc	187	57	9,0	4,5	1,196	5,402
CGEc	57	55	6,2	2,0	5,267	2,647
CGEc	92	41	6,2	1,6	1,281	2,080
CGEc	111	33	6,9	2,5	1,745	4,408
CGEc	188	29	9,1	2,0	1,627	3,297
CGEc	126	28	7,3	2,6	2,363	0,919
CGEc	138	22	7,6	2,7	1,248	0,455
CGEc	140	22	6,1	1,9	2,332	1,244
CGEc	150	15	5,3	1,8	1,397	0,794

CGEc: Corpo gorduroso desafiado por *E. coli*. Spot ID: Número de identificação do spot no gel. PM: Peso molecular. pI: Ponto isoelétrico

O gel 2-DE desafiado por injúria séptica com *B. bassiana* 12 horas apresentou 54 spots com peso molecular de 14 a 79 kDa, sendo 16 spots menores que 30 kDa.

O *pI* variou de 3,9 a 9,2. O gel apresentou 9 spots que tiveram *match* significativo com o gel controle, sendo que 5 tiveram *upregulation* e 4 *downregulation*. Os spots que apresentaram *match* significativo encontram-se na Tabela 7 com seus respectivos pesos moleculares, *pI* e concentração.

Tabela 7 Resultado da comparação entre o gel controle e o gel desafiado por injúria séptica com *B. bassiana* após 12 horas

Gel	Spot ID	PM (kDa)	<i>pI</i>	Ratio	[Controle]	[Desafiado]
CGBb	58	56	9,1	17,5	0,549	9,584
CGBb	65	52	6,3	1,8	11,436	6,249
CGBb	64	53	6,1	1,9	5,311	2,801
CGBb	81	44	6,5	1,8	3,341	1,813
CGBb	83	44	6,4	1,6	4,259	2,593
CGBb	124	28	9,2	9,8	0,690	6,794
CGBb	125	28	7,2	1,6	1,796	2,818
CGBb	138	19	9,3	2,8	1,053	2,933
CGBb	141	15	5,7	2,0	0,325	0,643

CGBb: Corpo gorduroso desafiado por *B. bassiana*. Spot ID: Número de identificação do spot no gel. PM: Peso molecular. *pI*: Ponto isoelétrico

A Figura 6 apresenta o gel 2-DE do extrato proteico controle de corpo gorduroso de *D. saccharalis* e os géis 2-DE dos extratos proteicos do corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis* desafiados por injúria séptica com microrganismos em um tempo de 12 horas.

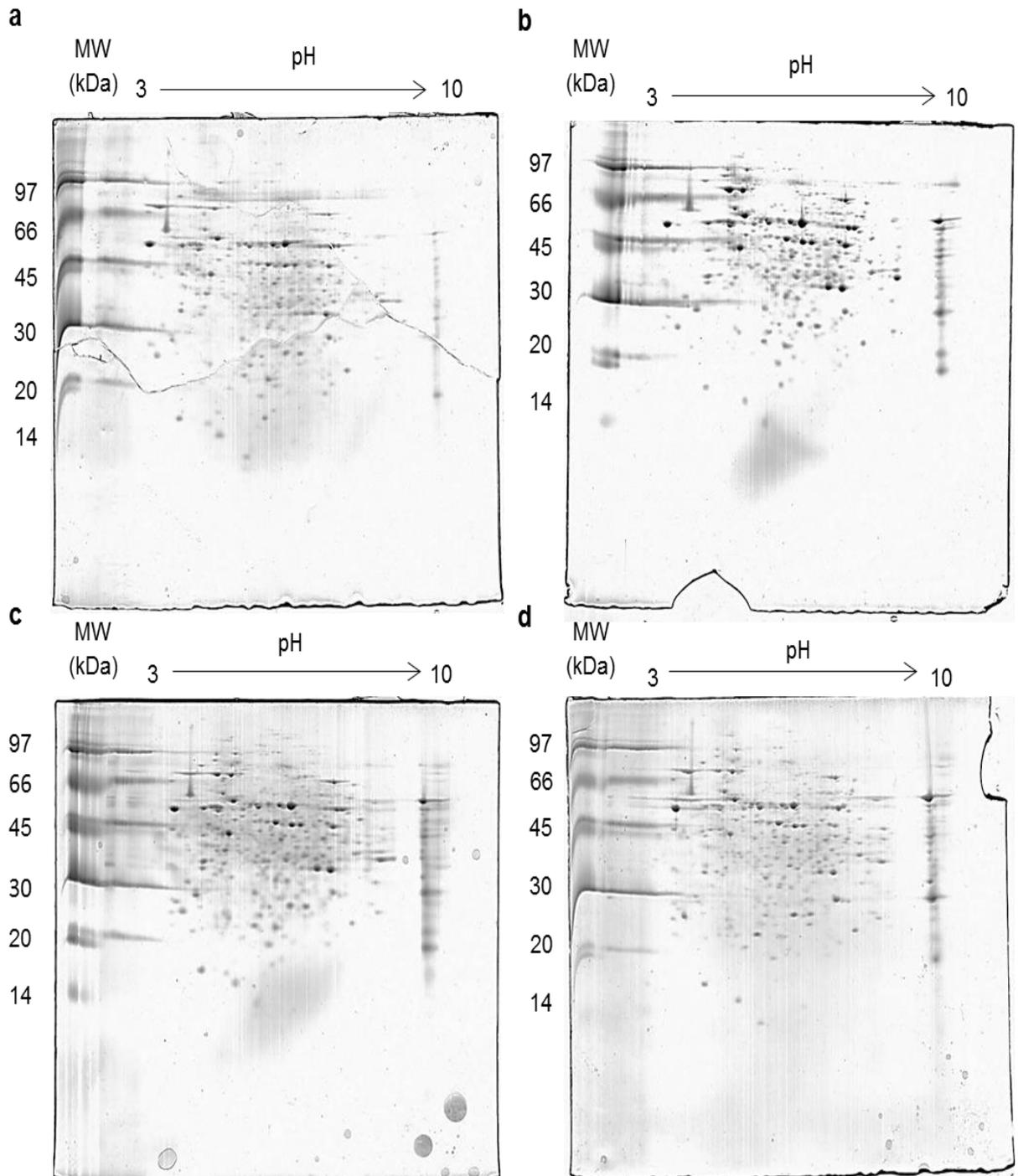


Figura 6 Eletroforese bidimensional em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas extraídas do corpo gorduroso das larvas de *D. saccharalis* após 12 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico controle. (b) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com *B. subtilis*. (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com *E. coli*. (d) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com *B. bassiana*

A Figura 7 destaca os spots com peso molecular menor do que 30 kDa e que apresentaram diferença significativa (ratio > 1,5) quando comparados no gel controle e no gel desafiado por injúria séptica com microrganismos no tempo de 12 horas.

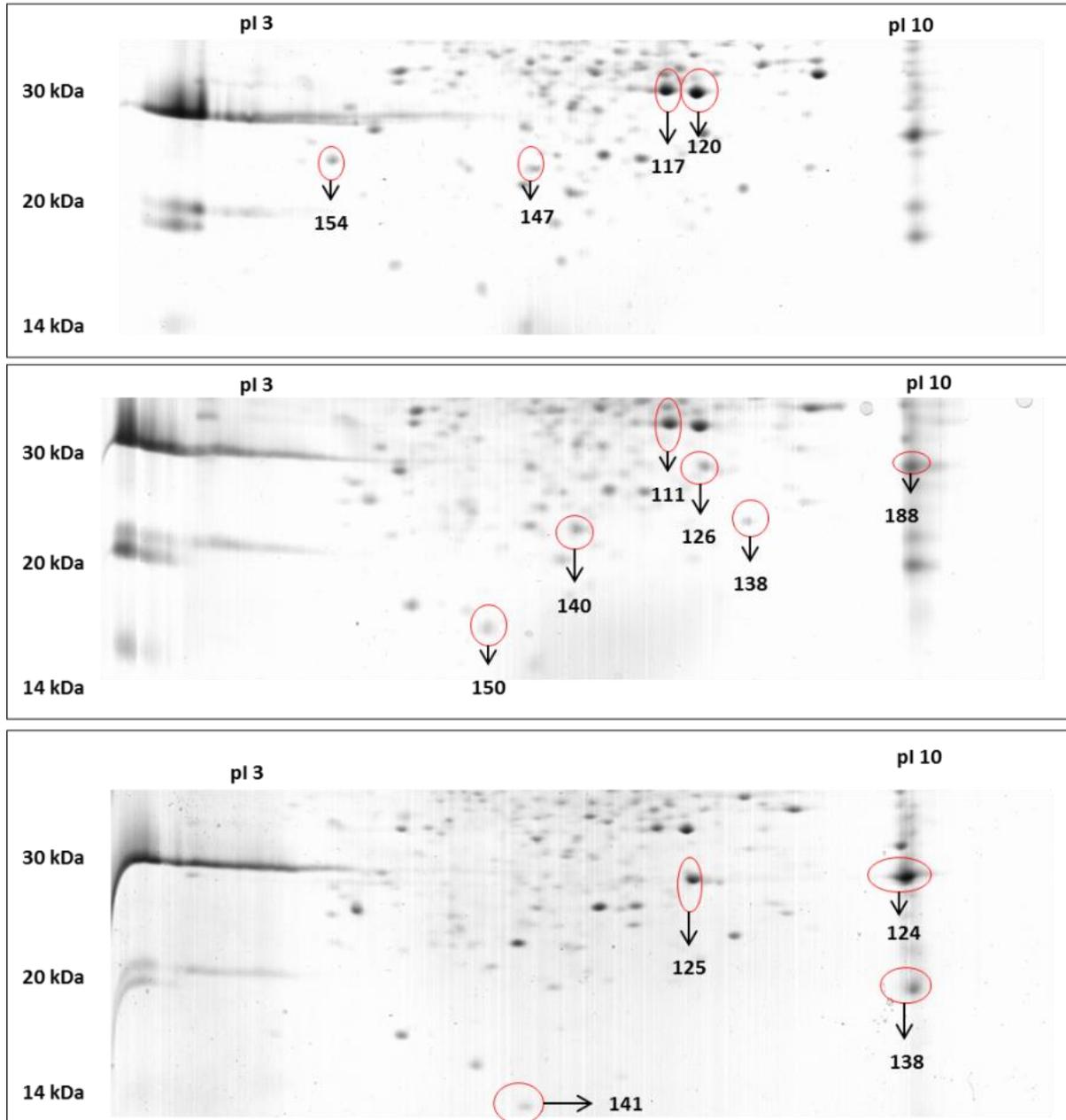


Figura 7 Análise dos géis 2-DE em gel Tricina SDS-PAGE 12,5% das proteínas com peso moleculares de até 30 kDa extraídas do corpo gorduroso das larvas de *D. saccharalis* após 12 horas de desafio imunológico. (a) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com *B. subtilis*. (b) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com *E. coli*. (c) 2-DE do extrato proteico obtido do corpo gorduroso de larvas submetidas a desafio imunológico de 12 horas com *B. bassiana*

Espectros de massa (MALDI-ToF) e identificação de proteínas do extrato proteico do corpo gorduroso

De 63 spots digeridos e analisados por MALDI-Tof, somente dois spots geraram identificação positiva pelo servidor Mascot (Matrixscience), foi considerado como fator limitante a qualidade dos espectros obtidos, que devido a outros fatores como concentração ou digestão não produziram espectros com uma resolução ideal.

Os spots identificados correspondem a Succinato-CoA Ligase, proteína envolvida com a síntese de ATP no ciclo do ácido cítrico.

A tabela 8 apresenta os spots que apresentaram identificação positiva em análise na interface do MASCOT.

Tabela 8 Spots dos géis de extrato proteico de corpo gorduroso de *D. saccharalis* que apresentaram identificação positiva pelo servidor Mascot (Matrixscience).

Spot ID	Banco de dados	pI	PM (kDa)	Proteína	Score	%cobertura
CGBS 12 141	SwissProt	9,1	34	Succinate-CoA ligase	52	11
CGEC 12 133	SwissProt	9,1	34	Succinate-CoA ligase	51	11

Os espectros de massa/carga dos spots da tabela 8 encontram-se na figura 8.

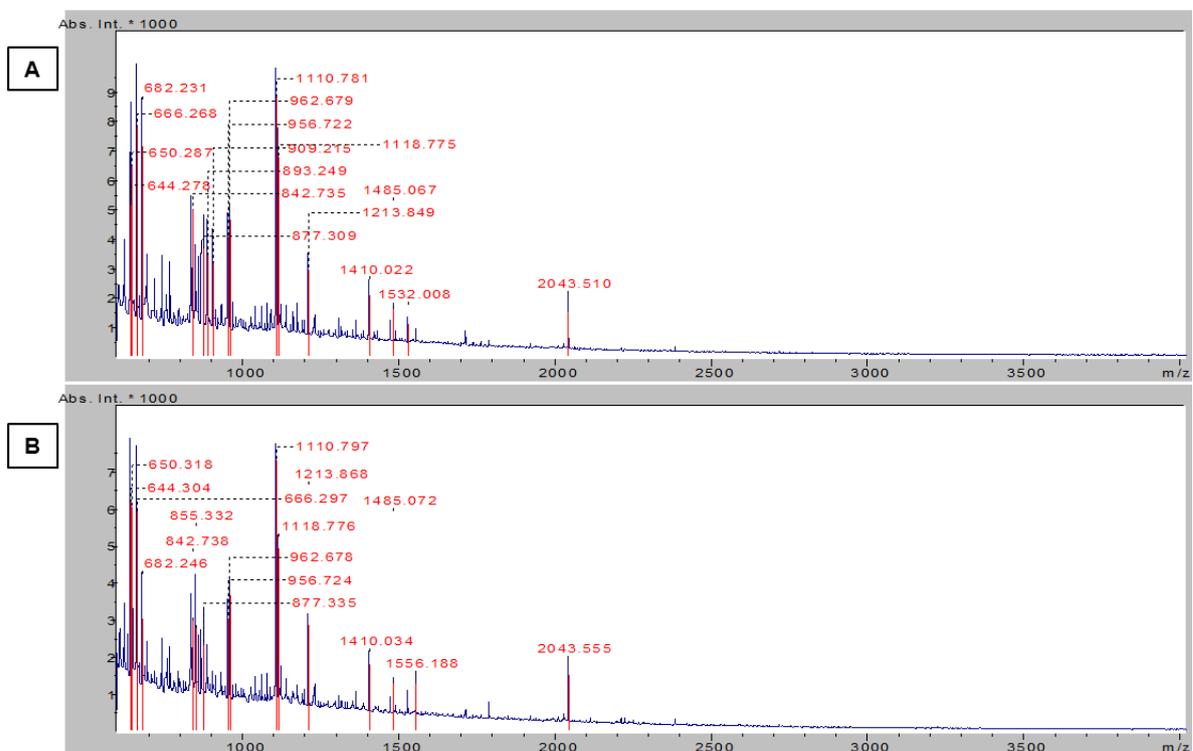


Figura 8 Espectros carga/massa referente aos spots CGBs 12 141 (A), CGEc 12 132 (B), CGEc 12 133 (C).

Identificação das proteínas presentes no extrato proteico do corpo gorduroso por características bioquímicas.

Os spots com peso molecular até 30 kDa foram comparados de acordo com suas características bioquímicas (pI e PM) com os bancos de dados de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot especificado para Lepidópteros, utilizando a ferramenta TagIdent na plataforma online ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal). Utilizando o banco de dados de proteínas do Mascot o spot CGEC 12 132 com pI

6,9 e peso molecular 25 kDa, apresentou identificação positiva para a proteína de estresse Heat Shock Protein 37.

A tabela 9 apresenta as proteínas que podem estar relacionadas com os spots dos géis 2-DE desafiados por injúria séptica de 6 horas.

Tabela 9 Identificação das proteínas do corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis* desafiado por microrganismos após 6 horas identificadas utilizando a ferramenta TagIdent

Spot ID	PM (kDa)	pI	Proteína (TagIdent)	Função
CGBs 129	25	8,3	Trypsin CFT-1	Bioquímica
CGBs 130	25	6,6	Microvitellogenin	Bioquímica
CGBs 136	22	9,4	Achelase-1	Bioquímica
CGBs 138	22	6,0	Insecticyanin-A	Bioquímica
CGBs 140	22	4,7	Myosin regulatory light chain 2	Bioquímica
CGBs 147	18	6,1	Apolipoporphin-3	Defesa
CGBs 152	16	5,2	General odorant-binding protein 2	Bioquímica
CGEc 159	29	9,3	Ubiquinone biosynthesis protein	Bioquímica
CGEc 166	27	6,0	Low molecular 30 kDa lipoprotein PBMHP-6	Estrutural
CGEc 168	27	5,6	Cytochrome c oxidase subunit 2	Bioquímica
CGEc 175	25	6,4	Microvitellogenin	Bioquímica
CGEc 177	24	5,4	Larval cuticle protein LCP-30	Estrutural
CGEc 185	24	4,4	Pupal cuticle protein 36 ^a	Estrutural
CGEc 187	23	5,3	Larval cuticle protein	Estrutural
CGEc 189	23	5,7	27 kDa hemolymph glycoprotein	Estrutural
CGEc 200	19	6,0	Peptidoglycan recognition protein	Defesa
CGEc 201	19	5,6	Attacin-F	Defesa
CGEc 202	19	9,6	Attacin	Defesa
CGEc 204	18	5,8	Apolipoporphin-3	Defesa
CGEc 205	18	5,7	Apolipoporphin-3	Defesa
CGEc 210	17	4,6	Pupal cuticle protein 27	Estrutural
CGBb 139	29	5,8	Low molecular 30kDa lipoprotein PBMHP-6	Estrutural
CGBb 140	29	9,8	40s ribosomal protein S3a	Estrutural
CGBb 148	26	5,7	Casein kinase II subunit beta	Bioquímica
CGBb 152	25	8,3	Trypsin CFT-1	Bioquímica
CGBb 155	23	4,8	Myosin regulatory light chain 2	Bioquímica
CGBb 157	23	5,8	27 kDa hemolymph glycoprotein	Estrutural
CGBb 160	22	9,8	40S ribosomal protein S7	Estrutural

CGBb 163	21	4,8	Myosin regulatory light chain 2	Bioquímica
CGBb 165	20	6,3	J domain-containing protein	Bioquímica
CGBb 168	18	6,7	Peptiglycan recognition protein	Defesa
CGBb 169	18	6,4	Apolipoporphin-3	Defesa
CGBb 170	18	4,5	Pupal cuticle protein 27	Estrutural
CGBb 217	16	5,6	Pupative defense protein 1	Defesa

A tabela 10 apresenta proteínas que podem estar relacionadas com os spots dos géis 2-DE desafiados por injúria séptica de 12 horas.

Tabela 10 Identificação das proteínas do corpo gorduroso de *Diatraea saccharalis* desafiado por microrganismos após 12 horas identificadas utilizando a ferramenta TagIdent

Spot ID	PM (kDa)	pI	Proteína (tagIdent)	Função
CGBs 143	26	6,7	Microvitellogenin	Bioquímica
CGBs 147	25	5,7	Pupal cuticle protein	Estrutural
CGBs 151	23	5,6	27 kDa hemolymph glycoprotein	Estrutural
CGBs 152	22	6,1	Insecticyanin-A	Bioquímica
CGBs 156	21	6,2	Insecticyanin-A	Bioquímica
CGBs 161	20	5,9	Attacin-F	Defesa
CGBs 167	18	6,0	Apolipoporphin-3	Defesa
CGBs 170	16	5,3	General odorant-binding protein 2	Bioquímica
CGEc 132	25	6,4	Microvitellogenin	Bioquímica
CGEc 133	25	6,7	Microvitellogenin	Bioquímica
CGEc 135	24	4,3	Elongation fator 1-beta	Bioquímica
CGEc 137	24	5,8	Pupal cuticle protein	Estrutural
CGEc 140	22	6,1	Insecticyanin-A	Bioquímica
CGEc 147	19	6,0	Attacin-F	Defesa
CGEc 149	16	4,7	Putative defense protein 3	Defesa
CGEc 186	28	5,7	Cytochrome C oxidase subunit 2	Bioquímica
CGBb 126	25	6,7	Microvitellogenin	Bioquímica
CGBb 127	25	6,4	Microvitellogenin	Bioquímica
CGBb 128	25	5,8	Pupal cuticle protein	Estrutural
CGBb 138	19	9,3	Attacin	Defesa
CGBb 139	17	4,5	Pupal cuticle protein 27	Estrutural
CGBb 141	14	5,7	Profilin	Bioquímica
CGBb 181	19	5,9	Apolipoporphin-3	Defesa

As proteínas apresentadas nas tabelas 9 e 10 podem ser classificadas de acordo com sua função biológica. Dos 57 spots dos géis 2-DE do extrato proteico do corpo gorduroso que apresentaram identificação por meio da ferramenta TagIdent foram encontradas 27 prováveis proteínas, sendo que 12 proteínas estão envolvidas em processos bioquímicos gerais, 9 podem ser classificadas como proteínas estruturais e 6 são proteínas de defesa do sistema imune.

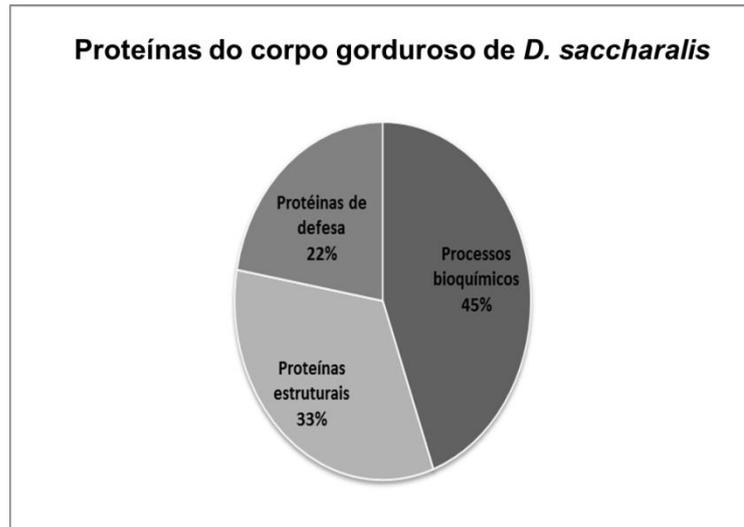


Figura 9 Perfil de proteínas obtidas do corpo gorduroso de acordo com a função biológica.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foram encontradas seis proteínas de defesa do sistema imune utilizando a ferramenta de identificação TagIdent, sendo elas Apolipoporphin-3, Atacina, Atacina-F, Proteína de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs), provável proteína de defesa 1 e provável proteína de defesa 3.

A imunidade inata de insetos utiliza proteínas de reconhecimento de padrão (PRPs) para realizar o reconhecimento de padrões moleculares presentes em patógenos, como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos. Uma das principais famílias de PRPs são as proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs), reconhecem patógenos e ativam cascatas de defesa do sistema imune como da Prophenoloxidase, IMD e Toll, que são vias de sinalização para melanização e a produção de peptídeos antimicrobianos, assim como algumas PGRPs apresentam atividade direta contra microrganismos (YANG et al, 2017; CHEN et al, 2016).

O primeiro PGRP foi isolado por Yoshida et al. (1996) da hemolinfa da lepidóptera *Bombyx mori*, uma proteína de 19 kDa, com peso molecular semelhante ao da proteína encontrada no corpo gorduroso de *D. saccharalis* desafiado por *B. bassiana* por 6 horas. Recentemente, Rocha et al. (2016) relataram, pela primeira vez, uma PGRP em *D. saccharalis* na hemolinfa desafiada por *B. subtilis* e *E. coli*.

Uma vez iniciada as cascatas IMD e Toll, serão produzidos os PAM's como resposta inata humoral ao desafio microbiano, no qual o inseto produzirá uma gama

de PAM's, por exemplo, cecropinas, defensinas, gloverinas, atacinas e outros PAM's (CHEN et al. 2016).

Atacina é um peptídeo antimicrobiano isolado pela primeira vez da hemolinfa da lepidóptera *H. cecropia* desafiada por *E. coli*, a partir de então já foi identificado em diversas espécies de lepidópteros. Atacinas apresentam atividade principalmente contra *E. coli* e outras Gram-negativas, aumentam a permeabilidade da membrana externa das bactérias e também podem inibir a síntese de proteínas da membrana externa. A literatura também cita atividade antimicrobiana para Gram-positivos e fungos (YI et al., 2014).

A Atacina encontrada no corpo gorduroso de *D. saccharalis* desafiado por *B. bassiana* por 12 horas neste trabalho apresentou regulação positiva em relação ao gel controle. Darsouei et al. (2017), em seu trabalho, apresentaram dados condizentes com estes ao desafiar larvas de *Spodoptera exigua* em 5° instar com proteínas tóxicas isoladas da bactéria *Xenorhabdus nematophila*, tendo umaregulação positiva de atacina em relação às larvas não desafiadas.

Alguns efetores da resposta imune humoral são proteínas multifuncionais com capacidade de atuar sinergicamente estimulando a produção de PAM's durante o desafio imune (BUTT et al., 2016).

Apolipophorina-3 (apoLp-III) é uma proteína multifuncional transportadora de lipídios presentes no corpo gorduroso de insetos, que também apresenta papel fundamental na resposta imune inata contra infecções microbianas (STACZEK et al, 2017). Wen et al. (2016), ao desafiarem larvas de *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) com *Staphylococcus aureus*, verificaram que essa demonstrou sinergismo entre a produção de PAM's e a presença de apoLp-III. Atacina, Cecropina e Lisozima apresentaram níveis de expressão mais baixos em larvas com o gene de apoLp-III silenciado e também demonstrou que a apoLp-III é capaz de reconhecer e ligar-se com padrões moleculares da membrana de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

Neste trabalho, a apoLp-III apresentou regulação positiva no corpo gorduroso desafiado por *B. subtilis* e *E. coli* após 6 horas e apresentou regulação negativa em corpo gorduroso desafiado por *B. subtilis* após 12 horas. Zdybicka-Barabas et al. (2015) observaram uma diminuição na concentração de apoLp-III no corpo gorduroso de larvas de *Galleria mellonella* desafiadas com *E. coli* e um aumento

significativo na concentração de apoLp-III após o desafio utilizando o fungo filamentoso *Fusarium oxysporum*.

A superclasse de proteínas conhecidas como proteínas de estresse ou proteínas de choque térmico (Heat-shock protein – HSP) desempenham papéis importantes no metabolismo de proteínas em condições normais e sobre estresses ambientais. As HSP são chaperonas moleculares que protegem as proteínas por meio de regulação e da manutenção estrutural. HSPs são expressas de acordo com as condições fisiológicas do ambiente, como choque térmico, privação de nutrientes, metais pesados, radicais livres e infecções bacterianas e virais (ZHOU et al., 2010; SUN et al., 2014). Zhou et al. (2010) demonstraram aumentos nos níveis de HSPs nos hemócitos de camarão branco, *Litopenaeus vannamei* após desafio séptico com *S. aureus* e *Vibrio alginolyticus* sugerindo que as proteínas de estresse estão presentes na resposta imune após infecção bacteriana. Esses dados condizem com a proteína ortóloga de Heat shock 27 proveniente do corpo gorduroso de *D. saccharalis* desafiado por *E. coli* sugerida neste trabalho após identificação na interface MASCOT.

Com as análises de comparação entre os géis desafiados por microrganismos e os géis controles foi possível observar que houve indução ou repressão de proteínas após o desafio séptico. 70 spots apresentaram diferenças significativas (ratio > 1,5) em sua expressão nos géis 2-DE desafiados por microrganismos em relação aos géis controle, sendo que 27 spots sofreram indução e 43 apresentaram repressão. Masova et al. (2010), ao analisarem as proteínas do corpo gorduroso das larvas de *Sarcophaga bullata* desafiadas por *E. coli*, também encontraram proteínas que sofreram indução ou repressão em relação ao corpo gorduroso não desafiado.

Concluimos que os resultados desse trabalho demonstram a importância de técnicas proteômicas para avaliar as modificações do sistema imune em espécies de lepidópteros que ainda não possuem muitos dados genéticos e não tenham genoma sequenciado.

5. CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

O desafio por injúria séptica mostrou ser capaz de induzir a expressão ou reprimir proteínas do corpo gorduroso de *D. saccharalis*, o que indica que essas proteínas possam estar envolvidas com o sistema imunológico do inseto.

A identificação positiva das proteínas do sistema imune inato com os espectros obtidos da espectrometria de massas MALDI-ToF e a busca nas bases de dados (Mascot) foram prejudicadas devido à falta de dados genômicos da *D. saccharalis* e, com isso, a pesquisa foi realizada em bases de dados muito distante do táxon Lepidoptera. As buscas foram realizadas contra o banco de dados de *Drosophila melanogaster*, a única espécie de inseto presente na base de dados Mascot. Outra razão metodológica que pode ter influenciado na identificação foi a concentração das proteínas digeridas, que pode ter sido insuficiente para gerar espectros com qualidade para identificação positiva.

Entretanto, utilizando a ferramenta TagIdent, foi possível identificar prováveis proteínas com os dados de pI e PM, e, desta forma, relacionar às condições experimentais e aos dados obtidos para encontrar as prováveis proteínas correspondentes nos bancos de dados. Essa ferramenta possibilitou a identificação das proteínas elencadas no artigo da dissertação. Foram apontadas 6 proteínas de defesa do sistema imune, sendo elas Apolipophorin-3, Atacina, Atacina-F, Proteína de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs), provável proteína de defesa 1 e Provável proteína de defesa 3.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal representante da ordem Lepidoptera com ampla quantidade de estudos genômicos e proteômicos é a lagarta da seda *Bombyx mori*, considerada um importante modelo biológico para estudo da imunidade inata.

As lepidópteras pragas agrícolas ainda são pouco estudadas, entretanto, algumas já estão emergindo como modelos de estudo, podemos citar: *Manduca sexta* e *Galleria mellonella*. Em contrapartida, a broca-da-cana *D. saccharalis* ainda é carente de estudos genômicos e proteômicos.

Este trabalho abordou a imunidade inata na fase larval da *D. saccharalis*, submetendo-a ao desafio séptico e caracterizando as proteínas expressas no corpo gorduroso após o desafio com microorganismos. Foram obtidas algumas proteínas órtologas possivelmente envolvidas na imunidade inata e outras com função bioquímica e estrutural, contudo, para a obtenção do mapa proteômico completo do corpo gorduroso, análises adicionais serão necessárias, bem como o sequenciamento do genoma da *D. saccharalis*, para que as bases de dados forneçam mais informações e, assim, existam subsídios para comparar e discutir os resultados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas da revisão bibliográfica

- 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, 2005.
- AOKI, W.; UEDA, M. **Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics.** Pharmaceuticals. v.6, p.1055-1081. Agosto, 2013.
- ARDIA, D.R.; GANTZ, J.E.; SCHNEIDER, B.C.; STREBEL, S. **Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity.** Functional Ecology, v.26, p. 732–739, 2012.
- 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.
- BERNARDI O.; BERNARDI, D.; AMADO, D.; SOUSA R.S.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.L.; CONVILLE, J.; BURD, T.; OMOTO, C. **Resistance Risk Assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 Insecticidal Protein Expressed in Corn.** Journal of Economic Entomology Advance, DOI: 10.1093/jee/tov219. Julho 2015.
- BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V.; **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** Nature reviews Microbiology, doi:10.1038/nrmicro3380. Dezembro 2014.
- CAPELI, M.J. **Manejo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1974) (Lepidoptera: Crambidae), na cultura de cana-de-açúcar.** 28 p. Dissertação. Faculdade de Tecnologia de Pompeia, Pompeia – São Paulo, 2012.
- CARVALHO, L.A.C; MACHINI, M.T.; **Hemocidinas derivadas da hemoglobina: Estrutura, propriedades e estruturas.** Quim. Nova, V. 36, N. 7, p. 1021-1029, 2013b.
- CARVALHO, M.M.; BUENO, R.C.O.F.; CARVALHO, L.C.; GODOY, A.F. **Importância econômica e generalidades para o controle de *Telchin lucis* Drury 1773 (Lepidoptera: Castiniidae) em cana-de-açúcar.** Enciclopédia biosfera, v.9, n.17, p. 1623, 2013a.
- CELORIO-MANCERA, M.L.P.; COURTIADÉ, J.; MUCK, A.; HECKEL, D.G.; MUSSER, R.O.; VOGEL, H. **Sialome of a Generalist Lepidopteran Herbivore: Identification of Transcripts and Proteins from *Helicoverpa armigera* Labial Salivary Glands.** PLoS ONE doi:10.1371/journal.pone.0026676. Outubro, 2011.
- CHAKRABORTI, S.; MANDAL, A.K.; SARWAR, S.; SINGH, P.; CHAKRABORTY, R.; **Bactericidal effect of polyethyleneimine capped ZnO nanoparticles on multiple**

antibiotic resistant mune ra harboring genes of high-pathogenicity mune r. 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.

Crava C.M.; Jakubowska A.K.; Escriche B.; Herrero S.; Bel, Y. **Dissimilar Regulation of Antimicrobial Proteins in the Midgut of Spodoptera exigua Larvae Challenged with Bacillus thuringiensis Toxins or Baculovirus.** PLoS ONE doi: 10.1371/journal.pone.0125991, 2015.

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

DAVIS, M.A.; HANASH, S. **Plasma-based proteomics in early detection and therapy.** Breast Cancer Research, doi:10.1186/bcr1619. Dezembro, 2016.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S.; **Microbial drug discovery: 80 years of progress.** The Journal of Antibiotics v. 62, p. 5–16; doi:10.1038/ja.2008.16. Janeiro 2009.

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.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J.; **The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era.** Nature reviews microbiology, doi:10.1038/nrd4510. Janeiro 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, Z.; 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. Março 2016.

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. Dezemro, 2016.

JOYCE, A.L.; WHITE, W.H.; NUSSLY G.S.; SOLIS, M.A.; SCHEFFER, S.J.; LEWIS, M.L.; MEDINA, R.F. **Geographic Population Structure of the Sugarcane Borer, Diatraea saccharalis (F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the Southern United States.** Plos One. doi:10.1371/journal.pone.0110036. Outubro, 2014.

KANG, J.; HUANG, F.; ONSTAD, D.W. **Modeling Evolution of Resistance of Sugarcane Borer (Lepidoptera:Crambidae) to Transgenic Bt Corn.** Environ. Entomol. v.43 n.4 p.1084-1104. Agosto, 2014.

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.

LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. **A química analítica do proteoma.** Revista Analytica, n.6, 2003.

MEDEIROS, A.H.; MINGOSSO, F.B.; DIAS, R.O.; FRANCO, F.P.; VICENTINI, R.; MELLO, M. O.; MOURA, D.S.; 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.** Int. J. Mol. Sci. doi:10.3390/ijms17091444. Julho, 2016.

MYLONAKIS, E.; PODSIADLOWSKI, L.; MUHAMMED, M.; VILCINSKAS, A. **Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides.** Phil. Trans. R. Soc. B371: 20150290. Fevereiro 2016.

OÑATE-GARZÓN, J.; MANRIQUE-MORENO, M.; TRIER, S.; LEIDY, C.; TORRES, R.; PATINÓ, E.; **Antimicrobial activity and interactions of cationic peptides derived from *Galleria mellonella* cecropin D-like peptide with model membranes.** The Journal of Antibiotics, doi:10.1038/ja.2016.134. Dezembro, 2016.

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.

PINHEIRO, D.O.; ZUCCHI, T.D.; ZUCCHI, O.L.A.D.; NASCIMENTO, V.F.; ALMEIDA, E.; CONSOLI, F.L. **Inorganic elements in the fat bodies of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 156 273–278. Abril, 2010.

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.

RICHARDS, A. L.; MERRILL, A.E.; COON, J.J. **Proteome sequencing goes deep.** Chemical Biology v.24 p.11–17, 2015.

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).** dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.091. Março, 2016.

- SEO, M.; WON, H.; KIM, J.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B. **Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review**. *Molecules*, v.17, p.12276-12286. Outubro, 2012.
- SIDRACH-CARDONA, R.; HIJOSA-VALSERO, M.; MARTI, E.; BALCÁZAR, J.L.; BECARES, E.; **Prevalence of antibiotic-resistant fecal mune ra in a river impacted by both na antibiotic production plant and urban treated discharges**. *Science of the Total Environment*, v. 488–489, n. 1, p. 220–227. Agosto, 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**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.43, n.5, p.431-436, maio, 2010.
- SIMÕES, R.A.; REIS, L.G.; BENTO, J. M.S.; SOLTER, L.F.; DELALIBERA, I. **Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae)**. *Biological Control*, v.63 p.164–171. Junho 2012.
- SONG, K. H.; JUNG, M. K.; EUM, J. H.; HWANG, I. C.; HAN, S. S. **Proteomic analysis of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma**. *Journal of Insect Physiology*, v. 54, p. 1271–1280. Junho, 2008.
- SOUHAIL, Q.A.; HIROMASA, Y.; RAHNAMAEIN, M.; GIRALDO, M.C.; TAKAHASHI, D.; VALENT, B.; VILCINKAS, A.; KANOST, M.R. **Characterization and regulation of expression of an antifungal peptide from hemolymph of an insect, *Manduca sexta***. *Developmental and Comparative Immunology*, dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.006. Janeiro, 2016.
- STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTOM, A.; BENNICHT, H.; BOMAN, H.G. **Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity**. *Nature*. v.292, p.246-248, 1981.
- VILCINSKAS, A. **Pathogens as Biological Weapons of Invasive Species**. *PLOS Pathogens*, DOI:10.1371/journal.ppat.1004714. Abril, 2015.
- WANG, G.; MISHRA, B.; LAU, K.; LUSHNIKOVA, T.; GOLLA, R.; WANG, X. **Antimicrobial peptides in 2014**. *Pharmaceuticals*, v.8, p. 123-150. Março 2015.
- WIMLEY, W.C.; HRISTOVA, K. **Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions**. *J Membrane Biol* v.239 p.27–34. Janeiro, 2011.
- YI, H.Y.; CHOWDHURY, M.; HUANG, Y.D.; YU, X.Q. **Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications**. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.13 n.98, p.5807–5822. Julho, 2014.

Referências bibliográficas do Capítulo I

- Almeida, L.C. <<http://www.canalbioenergia.com.br/artigoprejuizos-bilionarios-causados-pela-bruca-da-cana/>> acesso em: 13/02/2018
- Ardia, D.R., J.E. Gantz, B.C. Schneider, S. Strebelt (2012) Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional ecology*, 26: 732–739.
- Bradford, 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., C.J. Coates, I.M. Dubovskiy, N.A. Ratcliffe: Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Advances in Genetics* DOI: 10.1016/bs.adgen.2016.01.006.
- Carvalho, M.M., R.C.O.F. Bueno, L.C. Carvalho, A.F. Godoy (2013a) Importância econômica e generalidades para o controle de *telchin lucis* drury 1773 (lepidoptera: castiniidae) em cana-de-açúcar. *Enciclopédia biosfera* 9: 1623.
- Chen K., L. Zhou, F. Chen, Y. Peng, Z. Lu (2016) Peptidoglycan recognition protein-S5 functions as a negative regulator of the antimicrobial peptide pathway in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology* 61: 126-135.
- Chung, P.Y., R. Khanum (2016) Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug resistant bacteria. *Journal of microbiology, immunology and infection*. 20: 1-6.
- Darsoueia R., J. Karimia, G.B. Dunphy (2017) The role of pilin protein of *Xenorhabdus nematophila* against immune defense reactions of insects. *Journal of Insect Physiology* 101: 82-90.
- Hensley, S.D., A.M. Hammond (1968) Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of economic entomology*. 61: 1742-1743.
- Joyce, A.L., W.H. White, G.S. Nuessly, M.A. Solis, S.J.Scheffer, M.L. Lewis, R.F. Medina: Geographic population structure of the sugarcane borer, *diatraea saccharalis* (f.) (lepidoptera: crambidae), in the southern united states. *Plos one* DOI: 10.1371/journal.pone.0110036.
- Kingsolver, M.B., Z. Huang, R.W. Hardy (2013) Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors and connections. *Journal of molecular biology*. 425: 4921-4936.
- Liu, Y., D. Shen, F. Zhou, G. Wang, C. An: Identification of immunity-related genes in *Ostrinia furnacalis* against entomopathogenic fungi by RNA-seq analysis. *Plos one* DOI: 10.1371/journal.pone.0086436.
- Masova, A., M. Sanda, I. Selicharova (2010) Changes in the proteomes of the hemocytes and fat bodies of the flesh fly *Sarcophaga bullata* larvae after infection by *Escherichia coli*. *Proteome science* 8: 1-11.

Oñate-garzón, J., M. Manrique-moreno, S. Trier, C. Leidy, R. Torres, E. Patinõ: Antimicrobial activity and interactions of cationic peptides derived from *Galleria mellonella* cecropin d-like peptide with model membranes. The journal of antibiotics, DOI: 10.1038/ja.2016.134.

Pakkianathan, B.C., N. Singh, M. Krishnam, S. König (2012) 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*. BMC biochemistry 13: 5.

Pinheiro, D.O., T.D. Zucchi, O.L.A.D. Zucchi, V.F. Nascimento, E. Almeida, F.L. Consoli (2010) Inorganic elements in the fat bodies of *diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Comparative biochemistry and physiology, part B 156: 273–278.

Rocha, I.F. A. Maller, R.C.G. Simão, M.K. Kadowaki, L.F.A. Alves, L.F. Huergo, J.L.C. Silva: 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 DOI: org/10.1016/j.bbrc.2016.03.091.

Sandoval, S.S., K.C.A. Sêno: Comportamento e controle da *diatraea saccharalis* na cultura de cana-de-açúcar. Nucleus DOI: 10.3738/1982.2278-311.

Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, M. Mann (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Analytical chemistry, 68: 850-858.

Silva, J.L.C., I.F. Barbosa, J.P. Bravo, E.M.D. Souza, L.F. Huergo, F.O. Pedrosa, E. Esteves, S. Daffre, M.A. Fernandez (2010) Induction of a gloverin-like antimicrobial polypeptide in the sugarcane borer *diatraea saccharalis* challenged by septic injury. Brazilian journal of medical and biological research, 43: 431-436.

Stączek S., A. Zdybicka-Barabas, P. Mak, A. Sowa-Jasiłek, S. Kedracka-Krok, U. Jankowska, P. Suder, J. Wydrych, K. Grygorczuk, T. Jakubowicz, M. Cytryńska: Studies on localization and protein ligands of *Galleria mellonella* apolipophorin III during immune response against different pathogens, Journal of Insect Physiology DOI: 10.1016/j.jinsphys.2017.12.009.

Sun Y., Y. Sheng, L. Bai, L. Xiao, Y. Tan, Y. Shen (2014) Characterizing heat shock protein 90 gene of *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) and its expression in response to different temperature and pesticide stresses. Cell Stress and Chaperones 19: 725-739.

Wen, D., X. Wang, L. Shang, Y. Huang, T. Li, C. Wu, R. Zhang, J. Zhang: Involvement of a versatile pattern recognition receptor, apolipophorin-III in prophenoloxidase activation and antibacterial defense of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. Developmental and Comparative Immunology DOI: 10.1016/j.dci.2016.07.001.

Yang, P.J., M.Y. Yang, C. Zhan, C. Ye, X.Q. Yu, X.J. Rao: Molecular cloning and characterization of a short peptidoglycan recognition protein from silkworm *Bombyx mori*. Insect molecular biology DOI: 10.1111/imb.12330.

Yi, H.Y., M. Chowdhury, Y.D. Huang, X.Q. Yu (2014) Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl microbiol biotechnol*, 13: 5807–5822.

Yoshida H., K Kinoshita, M. Ashida (1996) Purification of a Peptidoglycan Recognition Protein from Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 13854-13860.

Zdybicka-Barabas A., A. Sowa-Jasiłek, S. Staczek, T. Jakubowicz, M. Cytrynska (2015) Different forms of apolipophorinIII in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides* 68: 105-112.

Zhou J., W. Wang, W. He, Y. Zheng, L. Wang, Y. Xin, Y. Liu, A. Wang (2010) Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 170-178.

Zhou, Z.H., H.J. Yang, M.L. Chen, Y.Z. Zhang, K.P. Chen, Y. Wang, M.L. Yu, F. Yu, J.Y. Li, B.X. Zhong (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.