



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELISIANE PINTO FEISTLER

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (PAM's) DA LAGARTA *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: Noctuidae) EM RESPOSTA AO DESAFIO MICROBIANO**

Orientador: Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

CASCAVEL – PR

2020

ELISIANE PINTO FEISTLER

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (PAM's) DA LAGARTA *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: Noctuidae) EM RESPOSTA AO DESAFIO MICROBIANO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

**CASCADEL - PR
2020**

ELISIANE PINTO FEISTLER

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (PAM's) DA LAGARTA *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: Noctuidae) EM RESPOSTA AO DESAFIO MICROBIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. José Luis da Conceição Silva

BANCA EXAMINADORA:

Prof^o. Dr. José Luis da Conceição Silva
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador

Prof^a Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE

Dr^a. Juliana Moço Corrêa
Pós-doutora no Programa de Mestrado
em Conservação e Manejo de Recursos
Naturais/PPRN
UNIOESTE

ELISIANE PINTO FEISTLER

BIOGRAFIA RESUMIDA

Elisiane Pinto Feistler, natural de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, nascida no dia 13 de março de 1980, formou-se em Farmácia na Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Paraná, em dezembro de 2006. Ingressou no Programa de Pós-graduação stricto sensu em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2018. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde, orientado pelo Dr. José Luis da Conceição Silva.

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAM's) DA LAGARTA *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae) EM RESPOSTA AO DESAFIO MICROBIANO

Resumo

Os insetos representam a classe mais numerosa dos organismos vivos. Expostos a infecções, apresentam múltiplas reações de defesa inatas. Possuem uma grande variedade de espécies, sendo adaptados a diversos habitats e, em razão disso, é de grande importância científica o estudo do seu sistema imune frente a agressões, sejam elas ambientais ou biológicas, através de microrganismos patogênicos. A lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), inseto modelo e objeto deste estudo, é considerada uma praga para a lavoura de milho, arroz, algodão, entre outras, e tem um sistema imune que é capaz de protegê-la de diversos desafios. A imunidade humoral inata na classe Insecta inclui a expressão de Peptídeos Antimicrobianos (PAM's) produzidos no órgão análogo ao fígado dos vertebrados, denominado de corpo gorduroso. Os PAM's produzidos são secretados na hemolinfa, podendo esta produção ser induzida, aumentando a expressão a agentes patogênicos. Os PAM's atuam basicamente desintegrando a parede celular bacteriana, causando lise e morte celular. Isso os torna fortes candidatos a serem utilizados como novos antimicrobianos frente a infecções principalmente bacterianas, visto que atualmente há uma ampla gama de microrganismos multirresistentes. Este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão da Atacina e Gloverina, ambos PAM's já descritos em outras espécies de Lepidópteros, após desafio das lagartas com microrganismo, entretanto ainda não reportados em *S. frugiperda*. A detecção dos peptídeos na fase larval da *S. frugiperda* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com primers desenhados a partir de sequências homólogas destes peptídeos presentes na ordem Lepidoptera. Os experimentos foram conduzidos por meio de extração de RNA total do corpo gorduroso, síntese de cDNA e RT-PCR convencional, após o desafio das lagartas com microrganismos. Os resultados mostraram que o desafio das lagartas com os microrganismos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Beauveria bassiana*) provocaram aumento da expressão dos genes PAM's por RT-PCR. Em adição, a expressão do gene foi observada na hemolinfa das lagartas através da extração das proteínas e visualização em Tricina SDS-PAGE, onde se constatou a presença dos PAM's induzidos com massa molecular inferior a 6,5 kDa. As bandas de peptídeos com massas moleculares de 6,1 kDa e 4,7 kDa, respectivamente, foram retiradas e tripsinizadas a partir do gel 1-D e submetidas à Espectrometria de massas (Maldi-Tof), entretanto não foi obtida identificação positiva com os dados de espectrometria de massas tipo Maldi-Tof. Contudo a indução das bandas peptídicas com o desafio microbiano sugere que estas são prováveis peptídeos da classe dos PAM's com função imune em *S. frugiperda*.

Palavras-chave:

Spodoptera frugiperda; peptídeos antimicrobianos (PAM's); Atacina; Gloverina

CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES (AMP's) EXPRESSION FROM THE ARMYWORM *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae) IN RESPONSE TO MICROBIAN CHALLENGE

Abstract

Insects represent the most numerous class of living organisms. Faced with infections, they have multiple innate defense reactions. They have a wide variety of species being adapted to different habitats, and because of this, it is of great scientific importance, the study of their innate immune system in the face of aggressions, whether environmental or biological through pathogenic microorganisms. The *Spodoptera frugiperda* caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) insect model and object of this study, is considered a pest for corn, rice, cotton, among others, and has an immune system that is capable of protecting it from several challenges. The innate humoral immunity in the Insecta class includes the expression of Antimicrobial Peptides (AMP's) produced in the organ analogous to the liver of vertebrates, called the fatty body. AMP's are produced and secreted in the hemolymph, and this production can be induced, increasing expression in the face of exposure to pathogens. AMP's basically act by disintegrating the bacterial cell wall, causing cell lysis and death. This makes them strong candidates to be used as new antimicrobials against mainly bacterial infections, since there is currently a wide range of multi-resistant microorganisms. This study aimed to characterize the expression of *Atacin* and *Gloverin*, both AMP's already described in other species of Lepidoptera; however not yet reported in *S. frugiperda*. The detection of peptides in the larval phase of *S. frugiperda* was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers designed from homologous sequences of these peptides from of order Lepidoptera. The experiments were conducted through extraction of total RNA from the fatty body, synthesis of cDNA and conventional RT-PCR, after the challenge of the worms with microorganisms. The results show that the challenge of the worms with the microorganisms (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Beuaveria bassiana*) caused an increase in the expression of the AMP's genes by RT-PCR. In addition, the gene expression was observed in the hemolymph of the worms through the extraction of proteins and visualization in Tricina SDS-PAGE, where it was verified the presence of the AMP's induced with molecular mass below 6.5 kDa. The peptide bands with molecular mass of 6.1 kDa and 4.7 kDa, respectively, were removed and trypsinized from the 1-D gel and subjected to Mass Spectrometry (Maldi-Tof), however, no positive identification was obtained with the Maldi-Tof mass spectrometry data. However, the induction of peptide bands with the microbial challenge suggests that these are probable peptides of the class of AMP's with immune function in *S. frugiperda*.

Keywords:

Spodoptera frugiperda; antimicrobial peptides (AMP's); atacin; gloverin

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Cletirio e Vera**, pela entrega e disposição dedicada aos filhos.*

*Ao meu esposo **Thiago** e aos meus filhos **João Matheus e Gabriel Augusto**, por todo amor, apoio e compreensão.*

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir realizar os Teus planos para a minha vida e me mostrar que os Teus planos sempre serão maiores do que os meus sonhos!

Agradeço a Nossa Senhora, por estar sempre comigo, me guiando e intercedendo a meu favor.

Ao Professor Dr. José Luis da Conceição Silva, pela orientação, dedicação, compreensão, paciência com que me acompanhou neste percurso desafiador de novas descobertas.

À Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki, que contribuiu com seus conhecimentos, acrescentando muito ao nosso trabalho.

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

A todos do Laboratório de Bioquímica, em especial Juliana Beal e Letícia Rasbold, por sempre estarem disponíveis para ajudar e por tornarem o ambiente de trabalho tão leve.

À minha mãe e ao meu pai, agradeço por todos os ensinamentos de vida. Sou muito privilegiada por ter pais tão especiais.

Ao meu esposo, por todo amor, carinho, compreensão em todos os momentos difíceis desta caminhada.

Aos meus filhos João e Gabriel, por todo amor incondicional que vocês me dão todos os dias, mesmo não sendo a mãe presente que gostaria.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 A lagarta-do-cartucho do milho <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	4
3.2 Resposta Imune Humoral: características bioquímicas dos PAM's de insetos	7
3.3 Resistência a antibióticos e busca por PAM's como novas alternativas..	11
CAPÍTULO 1 - ARTIGO	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	155
2.1 Cultivo e condições de crescimento das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e microrganismos	15
2.2 Preparo dos inóculos, desafio imune das larvas e coleta das amostras..	15
2.2.1 Preparo dos microrganismos	166
2.2.2 Inoculação nas lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i>	166
2.2.3 Coleta das amostras do corpo gorduroso e hemolinfa.....	177
2.3 Extração de RNA total do tecido gorduroso.....	177
2.4 Dosagem em espectrofotômetro do RNA total.....	188
2.5 Tratamento do RNA total com DNase I.....	188
2.6 Síntese de cDNA com oligo(dT).....	19
2.7 Reconstituição dos oligonucleotídeos	19
2.8 PCR Convencional dos genes PAM's de <i>Spodoptera frugiperda</i>	200
2.9 Dosagem de Proteínas	200
2.10 Eletroforese em gel – Tricina SDS PAGE.....	211
2.10.1 Gel de Separação 16% - Tricina SDS PAGE	211
2.10.2 Gel de Empilhamento 4 % - Tricina SDS PAGE.....	211
2.11 Quantificação da expressão dos PAM'S por análise de gel.....	211
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	222
3.1 PAM's expressos no corpo gorduroso de <i>S. frugiperda</i> desafiada por injúria séptica.....	22
3.2 PAM`s na hemolinfa de <i>S. frugiperda</i> desafiada por injúria séptica....	233
4. CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO.....	266

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	266
6. REFERÊNCIAS.....	27
6.1 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	277
6.2 REFERÊNCIAS DO ARTIGO	Erro! Indicador não definido.0

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Larva madura da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*.....5

Figura 2: (adaptada): Caracterização da Lagarta: Pontuações pretas em pares ao longo do dorso. Sempre um par próximo e outro distante. Quatro pontuações no final do abdômen dispostas em forma de quadrado. Marca em formato de Y invertido na cabeça. Fonte:<https://www.agro.bayer.com.br/noticias/news-bucket/2019/01/16/20/39/falta-de-monitoramento-e-controle-quimico-deixa-escapar-lagarta>6

CAPÍTULO 1- ARTIGO

Figura 1: RT-PCR dos genes de PAM'S expressos no corpo gorduroso. Lane 0 = padrão 100 pb (Ludwig biotec). Lane 1= RNA total tratado com DNA se e amplificado por PCR com primer Actina; Lane 2= Gene controle actina 243 pb; Lane 3= Gene Gloverina 210 pb; Lane 4= Gene22

Figura 2: Eletroforese em Tricina SDS-PAGE 16%. P= Padrão Amersham Biosciences® molecular weight marker. Lanes 1N: 50 µg de hemolinfa extraída de lagarta nativa; 2B: 50 µg hemolinfa de lagarta desafiada por mix de bactérias, 3F: 50 µg de hemolinfa de lagarta desafiada por fungo. **2-B.** Análise com image J das bandas peptídicas **a** e **b** indicadas por setas em 2-A. **Figura 5:** Estimativa da massa molecular em Daltons (Da) das bandas a e b com o programa Microcal™ Origin® v. 6.0. Na reta estão distribuídas as bandas do padrão Amersham Biosciences® molecular weight marker como referência de massa molecular.23

Figura 3. Estimativa da massa molecular em Daltons (Da) das bandas a e b com o programa Microcal™ Origin® v. 6.0. Na reta estão distribuídas as bandas do padrão Amersham Biosciences® molecular weight marker como referência de massa molecular.....24

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Primers específicos para os PAM's de Lepidoptera.....	19
--	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Preparo dos primers específicos para os PAM's de Lepidoptera.....20

1. INTRODUÇÃO

Com a existência de inúmeros medicamentos antimicrobianos disponíveis e o indiscriminado uso destes nas últimas décadas; muitos microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência, ou seja, tornaram-se multirresistentes aos fármacos.

Neste contexto foi dada atenção especial para os antimicrobianos presentes em insetos, mais especificadamente os peptídeos antimicrobianos (PAM's). Os insetos representam um vasto grupo de organismos resistentes, adaptáveis aos mais variados ambientes. Quando desafiados frente a um organismo patogênico, os insetos aumentam e/ou alteram a expressão de alguns metabólitos, sendo de maior importância os peptídeos antimicrobianos (PAM's).

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), inseto modelo e objeto deste estudo, é considerada uma praga para a lavoura de milho, arroz, algodão, entre outras, e tem um sistema imune que é capaz de protegê-la de diversos desafios. Esta espécie causa muitos danos e prejuízos tanto para a lavoura quanto para os produtos que serão entregues ao consumidor.

Em geral, a imunidade humoral inata na classe Insecta inclui a expressão de Peptídeos Antimicrobianos (PAM's) produzidos no órgão análogo ao fígado dos vertebrados, denominado de corpo gorduroso. Os PAM's produzidos são secretados na hemolinfa, podendo esta produção ser induzida, aumentando a expressão perante exposição a agentes patogênicos; atuam basicamente desintegrando a parede celular bacteriana, causando lise e morte celular e agem de maneira diferente dos antimicrobianos já existentes, visto que não interagem com um receptor ou molécula específica do patógeno.

Essa característica torna os PAM's fortes candidatos a serem utilizados como novos antimicrobianos frente a infecções, principalmente bacterianas, visto que atualmente há uma ampla gama de microrganismos multirresistentes. Várias classes de PAM's já foram identificadas em diversos insetos.

Neste estudo, tivemos como objetivo caracterizar a expressão dos genes dos PAM's Atacina e Gloverina, ambos, já descritos em outras espécies de Lepidópteros, entretanto ainda não reportados em *S. frugiperda*. A detecção da expressão dos genes na fase larval da *S. frugiperda* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com primers desenhados a partir de sequências homólogas

destes genes presentes na ordem Lepidoptera. Em nosso estudo analisamos também os produtos da expressão gênica, ou seja, os PAM's presentes na hemolinfa dos insetos na fase larval após o desafio microbiano.

Aplicando esta abordagem em que os insetos, por meio da resposta humoral, secretam peptídeos antimicrobianos, é possível transformar um inseto praga da agricultura em um organismo promissor de novas fontes de potentes antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar e caracterizar a expressão de peptídeos antimicrobianos (PAM's) em lagartas de *Spodoptera frugiperda*, submetidas à injúria séptica em resposta ao desafio com fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* cepa 88 e bactérias gram+/gram-, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair RNA total do corpo gorduroso de lagartas em sexto instar e sintetizar cDNA com oligo (dT) a partir do RNA total das lagartas nativas (não desafiadas) e desafiadas por microrganismos.
- Desenhar e testar primers para peptídeos Atacina e Gloverina a partir de genes homólogos com a técnica de RT-PCR convencional.
- Verificar se há alteração ou não da expressão gênica dos genes dos PAM's por RT-PCR convencional nas lagartas desafiadas em relação ao controle não desafiado.
- Extrair proteínas da hemolinfa das lagartas e verificar se houve indução ou não dos peptídeos antimicrobianos em resposta à injúria séptica.
- Identificar os PAM's aplicando a técnica de espectrometria de massas do tipo Maldi-Tof.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

A ordem Lepidoptera destaca-se pela grande diversidade e é o segundo maior grupo da classe Insecta, compreendendo as borboletas e mariposas, constituindo-se de aproximadamente 13% e 87% respectivamente (ANDRADE; TEIXEIRA, 2017). Esta ordem é formada por mais de 160.000 espécies descritas, distribuídas em 124 famílias, e apresenta grande importância econômica por incluir espécies de pragas e agentes polinizadores (RIBEIRO; ANSANTE; VENDRAMIN; 2016).

Além disso, o grupo tem sido amplamente estudado como sistema-modelo em várias pesquisas científicas. Estes insetos são bastante utilizados como modelos ecológicos em diversos estudos, sendo considerados ótimos bioindicadores por serem sensíveis a alterações no ambiente, por possuírem ciclos de vida curto, pela taxonomia bem conhecida e pela facilidade na amostragem em diferentes períodos do ano (ANDRADE; TEIXEIRA, 2017). Uma vez que um único Lepidóptero adulto pode produzir centenas de ovos e sua principal fonte de alimento é normalmente material vegetal, eles podem causar danos significativos a culturas agrícolas (CASANOVA; GOODRICH, 2013; RIBEIRO; ANSANTE; VENDRAMIN, 2016).

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), comumente conhecida como a lagarta-do-cartucho do milho (figura 1), é considerada a principal praga da cultura do milho por sua ocorrência generalizada e por atacar todos os estágios de desenvolvimento da planta. O ataque deste inseto também pode levar a danos diretos às plantas, através de sua penetração nos tecidos, onde deixam orifícios que se constituem porta de entrada para fungos e bactérias, agentes estes causadores de várias doenças, diminuindo o potencial de produção e a qualidade dos grãos (WANGEN; JUNIOR; SANTANA, 2015).



Figura 1: Larva madura da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Fonte: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.

Apesar de haverem muitos estudos que relacionam o ataque da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) a grandes perdas em diversas culturas, com destaque para o milho, soja e algodão, que são largamente cultivados no Brasil e que possuem grande influência socioeconômica para o país, poucos são os estudos científicos que apontam as fases de maior importância para adoção de manejo voltado para o seu controle. Se tratando especificamente da cultura do milho, a maioria dos estudos indicam perdas de rendimento em razão do ataque da lagarta-do-cartucho, entre 30 e 50%, podendo ocorrer ataques desde o início até o final do ciclo (SILVA; FORESTI, 2016).

O gênero *Spodoptera* é composto por diversas espécies, entre as mais conhecidas, temos *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua* e *S. frugiperda*. A praga do milho, *S. frugiperda*, é uma das mais estudadas e no Brasil ocorre em todas as regiões produtoras. O desenvolvimento de uma população de insetos está associado a fatores como: qualidade do alimento, temperatura, umidade relativa e foto período; sendo estes que direcionam as características biológicas em condições controladas ou não.

O desenvolvimento de vida da lagarta é formado por 4 (quatro) estágios: ovo, lagarta, pupa, adulto. Os ovos de coloração verde-clara passando a alaranjado são colocados em massa, cerca de 100 (cem) por vez, em camadas sobrepostas, na parte superior das folhas, e permanecem neste estágio 3 (três) dias a 25 °C. As lagartas, inicialmente, apresentam coloração clara evoluindo para pardo-escura à esverdeada até quase preto. Alimentam-se, inicialmente, das cascas dos próprios ovos e depois raspam as folhas mais jovens da planta. No último ínstar, o 6°, a larva chega a atingir 50 mm de comprimento; é comum encontrar apenas uma lagarta por cartucho devido ao canibalismo; contudo podem ser visualizadas larvas em diferentes ínstares dentro de um mesmo cartucho. O período de lagarta é compreendido entre 12 a 30 dias, ocorrendo dentro do cartucho da planta. Depois de

desenvolvida a lagarta sai do cartucho e penetra no solo, transformando-se em pupa com aproximados 15 mm de comprimento. Em média, com coloração avermelhada ou amarronzada, a fase de pupa dura de 10 a 12 dias. O último estágio de desenvolvimento é quando a pupa eclode e temos a mariposa, com cerca de 35 mm de envergadura. As asas anteriores possuem coloração pardo-escuro, enquanto as asas posteriores branca-acinzentadas, com pontos claros na região central de cada asa. O tempo médio de vida do adulto é de 12 dias. O ciclo completo do inseto compreende de 30 a 40 dias.

Morfologicamente é diferenciada das demais espécies com suas características fenotípicas apresentadas na figura 2.



Figura 2: (adaptada): Caracterização da Lagarta: Pontuações pretas em pares ao longo do dorso. Sempre um par próximo e outro distante. Quatro pontuações no final do abdômen dispostas em forma de quadrado. Marca em formato de Y invertido na cabeça. Fonte: <https://www.agro.bayer.com.br/noticias/news-bucket/2019/01/16/20/39/falta-de-monitoramento-e-controle-quimico-deixa-escapar-lagarta>

A espécie apresenta grande capacidade de dispersão e rápida disseminação nas plantas hospedeiras, o que determina a complexidade dos seus padrões genéticos e migratórios (PINTO et al., 2015).

Estudos relacionados ao comportamento e à biologia dessas pragas são de grande importância, uma vez que fornecem subsídios para compreensão de aspectos como a dinâmica populacional, permitindo assim o estabelecimento de métodos adequados para o seu controle (ZIMMERMANN et al., 2011). Sua importância deve-se não somente aos danos provocados, mas especialmente à dificuldade de seu controle (SANTOS et al., 2004). A resistência do milho à queda

da lagarta-do-cartucho tem sido exaustivamente estudada e uma série de genótipos resistentes foi desenvolvida (PETERLINI et al., 2020).

Com o advento da biotecnologia, foi desenvolvida uma nova tática de controle de pragas, que consiste nas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos. Através de apuradas técnicas de laboratório, é conferido alto padrão de resistência da planta a algumas espécies de lepidópteros-praga (MICHELOTTO et al., 2011).

A lagarta *S. frugiperda* é bastante estudada em relação ao controle biológico com fungos entomopatogênicos (THOMAZONI; FORMENTINI; ALVES, 2014), contudo ainda é escasso o conhecimento em relação à imunidade inata desta espécie. Foi elucidado o genoma completo desta espécie (KAKUMANI et al., 2014), tornando-a um organismo modelo para estudos moleculares. Este aspecto abre campos para estudo dos genes de PAM's nesta espécie, que ainda são poucos descritos.

3.2 Resposta Imune Humoral: características bioquímicas dos PAM's de insetos

Os insetos são organismos evolutivamente bem sucedidos por conseguirem se adaptar a quase todos os habitats existentes na natureza (SILVA et al., 2010). São conhecidos como o maior e mais diversificado grupo de organismos vivos na Terra. Certamente sua resistência a vários microrganismos levou à sua rápida e vasta proliferação (BULET et al., 1999).

Os insetos têm reações imunes de defesa inata efetiva em resposta aos microrganismos invasores. As reações incluem o uso de barreiras físicas em conjunto com respostas do sistema imune (DUVIC et al., 2012). A imunidade inata dos insetos consiste em uma resposta humoral baseada na melanização e nos PAM'S, produzidos principalmente pelo corpo gorduroso (CHARLES; KILLIAN, 2015), e na resposta celular, que inclui fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos pelos hemócitos circulantes (XU et al., 2012; LIU et al., 2014; XIONG et al., 2015).

Os PAM's são amplamente distribuídos entre organismos vivos (DUVIC et al., 2012) e são pequenas proteínas produzidas por uma numerosa gama de organismos (de bactérias a humanos), que tem atividade antimicrobiana direta (CRAVA et al., 2015), são efetores do sistema imunológico inato contra a infecção por patógenos em organismos multicelulares. Mais da metade dos PAM's relatados

vêm de insetos e esses efetores atuam em conjunto para suprimir ou matar bactérias, fungos, vírus e parasitas (HE et al., 2015).

Os peptídeos antimicrobianos de insetos desempenham um papel importante na eliminação de patógenos e parasitas. Estes peptídeos são sintetizados em tecidos específicos, como o corpo gorduroso e hemócitos; e, após serem produzidos, são rapidamente excretados para a hemolinfa do inseto para que exerça a função antimicrobiana (BULET et al., 1999). Podem potencialmente ser aplicados em medicina e agricultura em vez de antibióticos tradicionais, pois são fáceis de sintetizar devido ao seu tamanho relativamente pequeno, possuem uma ação rápida e eficiente contra patógenos, fornecem uma abundante atividade antimicrobiana e têm baixa toxicidade para as células dos vertebrados (BANG et al., 2012).

PAM's são pequenos peptídeos catiônicos que se inserem e interrompem membranas microbianas, matando e eliminando patógenos. Eles são sintetizados por hemócitos e em maior quantidade no corpo gorduroso, do qual são liberados na hemolinfa do inseto rapidamente após infecção microbiana. Os PAM's também são expressos em tecidos extra-embrionários de ovos, que podem ajudar a proteger o embrião em desenvolvimento da infecção (CASANOVA; GOODRICH, 2013). Além disso, a maioria dos PAM's tem estruturas anfipáticas α -helicoidais que interagem e perturbam as membranas celulares para produzir seus efeitos antimicrobianos. Eles têm como alvo uma farta quantidade de bactérias e fungos, e esses patógenos não parecem prontamente desenvolver resistência. Como vários desses compostos também são tóxicos para os insetos, eles também mostram promessa de desenvolvimento como biopesticidas para o controle de pragas agrícolas resistentes a inseticidas (HUGHES; DOWD; JOHNSON, 2012).

Com a descoberta do primeiro PAM na década de 1980 em uma mariposa gigante da seda – cecropina, purificado das pupas de *Hyalophora cecropia* (YI et al., 2014) – um grande número de PAM'S foram identificados até o momento. Os PAM's de insetos geralmente compartilham características comuns: são moléculas catiônicas com menos de 100 resíduos de aminoácidos e sua expressão é geralmente induzida por lesão ou infecção por microrganismo.

Peptídeos antimicrobianos (PAM's) e lisozimas são os principais efetores do sistema imunológico de insetos e estão envolvidos nas respostas locais e sistêmicas. Entre as respostas locais, a reação imunológica do intestino médio desempenha um papel importante no combate a patógenos que atingem o corpo do inseto por via oral, assim como muitos microrganismos usados no controle de

pragas. Sob esse ponto de vista, compreender como os insetos se defendem localmente durante a primeira fase de infecções causadas por patógenos de origem alimentar é importante para melhorar ainda mais estratégias de controle microbiano (CRAVA et al., 2015). As funções dos PAM's foram expandidas para além do seu papel na defesa contra patógenos para incluir também o controle de endossimbiontes. PAM's são onipresentes entre os eucariotos, mas têm sido muito mais intensamente estudados em insetos. Os PAM's não ribossômicos produzidos por bactérias e fungos são diferentes daqueles que contribuem para a imunidade inata de células multicelulares e dos organismos que são produzidos ribossomicamente, e o termo PAM geralmente se refere especificamente para essas moléculas (MYLONAKIS et al., 2016). A importância dos PAM's pode ser vislumbrada na expansão dos genes que codificam para tais proteínas em genomas de insetos. De acordo com essa hipótese, a crescente disponibilidade de transcriptômicos e dados genômicos de várias espécies de insetos levaram à descoberta de uma variedade de genes relacionados que destacam a diversidade evolutiva e amplitude do arsenal de PAM's em insetos (CRAVA et al., 2015).

Os PAM's podem ser classificados em quatro grupos: os peptídeos α -helicoidais (por exemplo, cecropina e moricina), peptídeos ricos em cisteína (por exemplo, defensina de inseto e drosomicina), peptídeos ricos em prolina (por exemplo, apidaecina, drosocina e lebecina) e proteínas ricas em glicina (por exemplo, atacina e gloverina) (YI et al., 2014). A maioria dos PAM's de insetos, como defensinas de insetos, cecropinas, peptídeos ricos em prolina e atacinas, foi encontrada em mais de duas ordens de insetos, mas a moricina e a gloverina foram identificados apenas em Lepidoptera.

Os PAM's da classe das defensinas são amplamente estudados por possuírem cisteínas em suas estruturas, possibilitando a formação de ligações dissulfeto (BULET et al., 1999), o que fornece um aumento da biodisponibilidade e estabilidade da molécula, ao contrário de outros peptídeos que são lineares e acabam por favorecer sua própria clivagem, uma vez que os sítios em questão ficam expostos e susceptíveis à ação enzimática. Logo, significa que há uma boa relação entre estrutura da molécula e sua atividade. (KOEHBACH, 2017). Essa classe de PAM's é conhecida como "defensinas de insetos".

Em insetos, os peptídeos ricos em cisteína constituem uma família amplamente distribuída de moléculas de defesa contra infecções bacterianas e fúngicas. As defensinas de insetos que pertencem a essa família são peptídeos com

um motivo estabilizado por cisteína, envolvendo seis resíduos de cisteína conservados que conferem às moléculas alta estabilidade e resistência às proteases. As defensinas de insetos apresentam similaridades de sequência com defensinas de mamíferos; são geralmente peptídeos catiônicos compostos de 34 a 46 resíduos, com massas moleculares variando de 2 a 6 kilodaltons (kDa). Inicialmente descobertas em Diptera, as defensinas já foram descritas em muitas ordens de insetos neoptera. A maioria age contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, mas tem pouco efeito sobre bactérias Gram-negativas e fungos. Os peptídeos semelhantes à defensina foram identificados em lepidópteros (VOLKOFF et al., 2003).

Os PAM's ricos em glicina são exclusivos dos lepidópteros desempenham um papel dominante na eliminação de patógenos e parasitas. Entre os genes desses peptídeos antimicrobianos ricos em Glicina, a Atacina foi descrita pela primeira vez em *H. cecropia* e *Sarcophaga peregrina* e vários trabalhos demonstraram que as Atacinas possuem uma ampla capacidade antibacteriana, especialmente para bactérias Gram-negativas, contudo o modo de ação não está bem elucidado, embora a proteína parecesse aumentar a permeabilidade da membrana exterior da célula bacteriana. Um mecanismo proposto é que as Atacinas inibem a síntese de várias proteínas na membrana que afeta em sua permeabilidade (BANG et al., 2012).

A Gloverina também é um peptídeo antimicrobiano rico em glicina com atividade descrita contra bactérias gram-negativas (MACKINTOSH et al., 1998), resistente ao calor e rico em glicina, sendo encontrado em espécies de lepidópteros (XU et al., 2012). Ela pode inibir a síntese da membrana externa de bactérias e também interagir com a fração lipídica A de Lipossacarídeos, já que é carregado negativamente e pode interagir através de interação eletrostática com a Gloverina, que contém uma carga líquida positiva (XU et al., 2012).

A maioria das sequências desses PAM's foi identificada utilizando métodos moleculares e proteômicos (SILVA et al., 2010), como a espectrometria de massa ou clonagem de cDNA, a partir da hemolinfa dos insetos (KOEHBACH, 2017). Alguns pesquisadores têm utilizado técnicas para desafiar insetos com a finalidade de intensificar a resposta imune inata desse organismo (CHARLES; KILLIAN, 2015).

3.3 Resistência a antibióticos e busca por PAM's como novas alternativas

Os antibióticos são capazes de controlar infecções bacterianas, interferindo com metabolismo microbiano e processos fisiológicos, como a replicação do DNA e a biossíntese da parede celular. Apesar de múltiplos compostos serem frequentemente utilizados, foram notificados casos de resistência à maioria das classes de antibióticos utilizados em hospitais (MARIA-NETO et al., 2015).

A resistência generalizada aos antibióticos levou à necessidade urgente para a descoberta de novos antimicrobianos para tratar infecções principalmente bacterianas. A atividade bactericida de amplo espectro de PAM's torna-os candidatos promissores para uso terapêutico (ANDERSSON; HUGHES; KUBICEK-SUTHERLAND, 2016).

Frequentemente a atividade dos PAM's resulta na danificação da integridade da membrana celular. No entanto, os PAM's podem atuar em diferentes alvos celulares, incluindo DNA, RNA, enzimas reguladoras e outras proteínas, aparecendo como uma alternativa promissora para os antibióticos clássicos. Porém, uma vez que os PAM's forem inseridos no uso clínico, o desenvolvimento de estirpes resistentes a antimicrobianos será inevitável. Assim, a compreensão da resistência bacteriana contra esses compostos é extremamente necessária para um possível planejamento racional da próxima geração de antibióticos (MARIA-NETO et al., 2015).

As propriedades antibacterianas dos PAM's estão associadas a duas características inter-relacionadas dos peptídeos: sua carga líquida, que para a grande maioria dos PAM's é positiva, e sua propensão a ser anfipática (CHUNG; KHANUM, 2017), o que significa que eles podem dobrar em estruturas hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície. Estes recursos juntos facilitam a interação de PAM's com os componentes carregados negativamente do envelope bacteriano (por exemplo, lipopolisacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (TA) nas superfícies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente, e com os fosfolipídios negativamente carregados da membrana). Essa interação resulta em perda de controle sobre os fluxos de íons através da membrana e morte celular (ANDERSSON; HUGHES; KUBICEK-SUTHERLAND, 2016).

Muitos dos antibióticos produzidos por microrganismos são moléculas baseadas em peptídeos (ANDERSSON; HUGHES; KUBICEK-SUTHERLAND, 2016) e, considerando o alto interesse constante em PAM's como potenciais medicamentos terapêuticos para infecções bacterianas, surpreendentemente poucos

estudos tentaram avaliar o risco de desenvolvimento de resistência e explorar os mecanismos de resistência adquirida. Em parte, isso pode ser explicado pela crença longa e errônea de que a resistência às PAM's é muito difícil de adquirir e que, portanto, não é uma grande preocupação. (ANDERSSON; HUGHES; KUBICEK-SUTHERLAND, 2016)

PAM's geralmente exibem atividade de amplo espectro contra microrganismos patógenos e, uma vez que estes compostos não interagem com receptores específicos, seus alvos microbianos raramente desenvolvem fenótipos resistentes (AGEITOS et al., 2017).

Compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune do inseto a patógenos permite novas abordagens para o controle desta praga. Além disso, o isolamento de novos peptídeos antimicrobianos permite o desenvolvimento de antibióticos alternativos, porque o uso contínuo de antibióticos tradicionais resultou em cepas bacterianas resistentes. Novos peptídeos antimicrobianos podem potencialmente ser aplicados em medicina e agricultura em vez de antibióticos tradicionais, pois são fáceis de sintetizar devido a seu relativamente pequeno tamanho, possuem uma ação rápida e eficiente contra patógenos, fornecem uma ampla gama de atividade antimicrobiana, e têm baixa toxicidade para as células dos vertebrados (BANG et al., 2012).

Alguns PAM's já foram encontrados em diferentes espécies de *Spodoptera*, como moricinas, cecropinas e defensinas (SEUFI et al., 2001; DUVIC et al., 2012; YANG e al., 2018). Outro peptídeo que apresenta atividade antimicrobiana corresponde à Lebocina, que é rica em prolina e é encontrado em *Spodoptera litura* (YANG et al., 2019).

Os relatos encontrados na literatura para as espécies do gênero *Spodoptera* até o momento; e os dados genômicos disponíveis em *S. frugiperda* possibilitam a busca de novos PAM's nessa espécie. Desta forma este trabalho é justificado como pesquisa básica, ainda apresentando a possibilidade de gerar resultados com aplicação na área da saúde e na agricultura.

CAPÍTULO 1. ARTIGO

TÍTULO: PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EXPRESSOS NO CORPO GORDUROSO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM RESPOSTA AO DESAFIO MICROBIANO

RESUMO

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga nas lavouras de milho e tem um grande impacto na agricultura mundial. Vários estudos têm sido realizados sobre o controle biológico desta espécie, os quais demonstram resistência desta praga ao controle biológico e aos agrotóxicos. No entanto, o sistema imune humoral de *S. frugiperda* ainda não é completamente conhecido em relação à resposta imune inata aos agentes de controle biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos genes *Gloverina*, *Sf-gallerimicina* e *Atacina* no corpo adiposo de larvas de 6º ínstar de desenvolvimento da *S. frugiperda*, em resposta ao desafio microbiano. Nosso trabalho confirmou a expressão de *Sf-gallerimicina* em resposta ao desafio bacteriano, 24 horas pós-inoculação, e revelou pela primeira vez a expressão de *Gloverina* e *Atacina*, tanto com o desafio bacteriano quanto com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Os genes de *Gloverina* e *Atacina* foram regulados positivamente nas condições analisadas. Além disso, esta pesquisa apontou a presença de dois prováveis peptídeos antimicrobianos na hemolinfa, induzida 24 horas após o desafio com os microrganismos. Um peptídeo *b* de 4,7 kDa é provavelmente um peptídeo semelhante à defensina, e a banda *a* de 6,1 kDa é um peptídeo ainda não relatado em *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, *Beauveria bassiana*, corpo gorduroso, sistema imunológico, expressão gênica.

1. INTRODUÇÃO

Produtos alimentícios agrícolas cultivados no mundo sofrem ataques de pragas, que causam aproximadamente um terço das perdas na produção de alimentos durante o processo de crescimento, colheita e armazenamento. Os

insetos são um grupo proeminente de organismos que atacam as culturas, além de outros pequenos animais (Sarmiento et al., 2002). O ataque de pragas é intensificado devido ao desequilíbrio biológico causado pela eliminação de inimigos naturais (Ribeiro LP, Ansante TF, Vendramim JD, 2016).

A cultura do milho (*Zea mays*), que possui destaque econômico e social (Melo et al., 2006), sofre ataques de pragas durante quase todo o período de seu desenvolvimento (Peterlini et al., 2020), o que causa danos diretos às plantas (Wangen DRB, Júnior PHSP, Santana WS, 2015).

Em insetos, o sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Embora as respostas imunes inatas sejam inespecíficas, elas são amplamente distribuídas por todo o inseto, permitindo que atuem um papel crucial na manutenção da homeostase e na prevenção de doenças e infecções (Sheehan G, Garvey A, Croke M, Kavanagh K, 2018). A resposta imune depende de diversos fatores humorais e celulares, ocorrendo tanto local quanto sistemicamente (Destoumieux-Garzón D, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos (PAM's) são proteínas pequenas com atividade antimicrobiana (Pinto CC, et al., 2015), amplamente distribuídas entre os organismos vivos (Duvic B, et al., 2012). Os PAM's (respostas humorais) dos insetos exercem um papel importante na eliminação de patógenos e parasitas. Esses peptídeos são sintetizados em tecidos específicos, como corpo adiposo e hemócitos; após sua produção, os PAM's são rapidamente excretados na hemolinfa do inseto, desempenhando uma função antimicrobiana (Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D, 1999). Eles podem ser potencialmente aplicados na medicina e na agricultura ao invés dos antibióticos tradicionais, pois são fáceis de sintetizar devido ao seu tamanho relativamente pequeno, têm uma ação rápida e eficiente contra patógenos, fornecem uma ampla gama de atividade antimicrobiana e têm baixa toxicidade para as células de vertebrados (Bang K, Park S, Yoo JY, Cho S, 2012).

A maioria desses PAM's foi identificada a partir de hemolinfa de insetos usando métodos moleculares e proteômicos, como espectrometria de massa ou clonagem de cDNA (Silva JLC, et al., 2010; Koehbach J, 2017). Alguns pesquisadores usaram técnicas para desafiar insetos a fim de aumentar a resposta imune inata (Charles HM, Killian KA, 2015).

O inseto modelo do estudo é a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), que é a principal praga da cultura do milho no Brasil. O genoma completo desta espécie foi elucidado (Kakumani PK, Malhotra P,

Murkherjee SK, Bhatnagar RK, 2014), tornando-a um organismo modelo para estudos moleculares, o que permite o uso de técnicas moleculares para analisar a expressão de PAM's.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos genes de PAM's em *S. frugiperda*: *Gloverina*, *Sf-Gallerimicina* e *Atacina*. Pela primeira vez, a *Gloverina* e a *Atacina* foram revelados *in vivo* em larvas da broca-do-milho desafiadas por bactérias não patogênicas e o fungo *Beauveria bassiana*. Além disso, dois peptídeos foram revelados na hemolinfa em resposta ao desafio séptico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo e condições de crescimento das lagartas de *Spodoptera frugiperda* e microrganismos

As larvas de *S. frugiperda* foram mantidas em dieta artificial em $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa com fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas no escuro (16L:8D), em condições assépticas. As larvas de sexto ínstar foram utilizadas nos experimentos.

O fungo entomopatogênico utilizado, *Beauveria bassiana* cepa 88, foi mantido no laboratório de Biotecnologia de acordo com a metodologia descrita por Thomazoni et al., 2013.

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), foram reativadas e multiplicadas por 16 horas/ 37°C em meio LB (Luria Bertani) no laboratório de Biologia Molecular.

2.2 Preparo dos inóculos, desafio imune das larvas e coleta das amostras

Um grupo de 30 larvas de sexto ínstar foi inoculado com uma suspensão de esporos de fungo e outro grupo de 30 larvas inoculado com um mix de bactérias para desencadear a resposta imune. Após o período de 24 horas e de 48 horas foram coletadas as amostras de hemolinfa e tecido gorduroso das 60 lagartas desafiadas e as amostras foram armazenadas em -20°C .

2.2.1 Preparo dos microrganismos:

2.2.1.1 Fungo: O fungo *Beauveria bassiana* foi repicado em meio de esporulação (ágar 20g; MIX (NaNO₃ 1,58g; KH₂PO₄ 0,36g; MgSO₄·7H₂O 0,6g; Na₂HPO₄·7H₂O 1,05g e KCl 1,0g) 4,6g/L; glucose anidra ou dextrose 10g; extrato de levedura 5g e água destilada 1000mL). Após 7 (sete) dias as placas com os esporos do fungo foram raspadas e o material armazenado em frascos de vidro no freezer do laboratório de Biotecnologia.

2.2.1.2 Bactérias: para recuperar as bactérias de escolha, *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), foi preparado meio LB (Luria-Bertani) (triptona 0,5g; extrato de levedura 0,25g e NaCl 0,5g). As bactérias foram incubadas na proporção de 5 mL de meio e 50 µL de bactérias estoque conservadas em -20°C. Para o crescimento bacteriano no meio LB, foi incubado no Shaker com temperatura controlada de 37°C e 120 rpm no período de aproximadamente 14-16 horas.

2.2.2 Inoculação nas lagartas *Spodoptera frugiperda*

Para a inoculação das bactérias foi preparado um mix das bactérias de escolha, 750 µL de cada uma (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*). O preparado de bactérias foi lavado por três vezes com Tampão PBS. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado após a centrifugação foi conservado. Com uma agulha, o pellet foi tocado e essa mesma agulha, com a suspensão de bactérias (não definida), foi inserida nas lagartas, perfurando superficialmente sua parte frontal. Um grupo de trinta lagartas foi submetido a esse processo de inoculação e incubado em estufa B.O.D. em 25° ±1 °C por 24 horas.

Na inoculação do fungo, os esporos do fungo *Beauveria bassiana* foram lavados por três vezes com tampão PBS, por centrifugação (2500 rpm – 5 minutos). O pellet de esporos do fungo formado foi inoculado com uma agulha, como realizado para a inoculação das bactérias. Trinta lagartas foram inoculadas com o fungo.

Como controle, trinta lagartas não foram desafiadas e foram mantidas nas condições das lagartas desafiadas; à temperatura controlada de 25 °C por um período de 24 horas.

2.2.3 Coleta das amostras do corpo gorduroso e hemolinfa

De cada grupo de lagartas foi coletada primeiramente a hemolinfa; na sequência, o tecido gorduroso.

Para a coleta de hemolinfa, microtubos foram adicionados de cristais de fenilthiurea (C_7HN_2S). Uma das patas da lagarta foi seccionada e o líquido que extravasa – a hemolinfa – foi coletado no microtubo. Após coleta, o material foi centrifugado a 200xg (1450 rpm), a 4 °C, por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, o qual foi centrifugado a 20.000xg (14.500 rpm) a 4 °C por quinze minutos. Este microtubo foi conservado congelado a -20 °C. Os três grupos foram submetidos a tal processo: o grupo de lagartas desafiado com o mix de bactérias, o outro grupo com o fungo entomopatogênicos e o grupo de lagartas controle.

Antes de iniciar a coleta do tecido gorduroso, as lagartas foram submetidas a uma lavagem com 25 mL de tampão PBS mais 500 µL de RNA lather® Solution. O tecido gorduroso coletado foi armazenado em microtubo com 250 µL de RNA lather®. O material coletado foi centrifugado a 400 rpm por cinco minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi congelado a -20 °C.

2.3 Extração de RNA total do tecido gorduroso

O tecido gorduroso foi retirado e imerso em solução salina 0.9% com inibidor de RNase e centrifugado, sendo o material obtido congelado em freezer -20 °C até o momento da extração do RNA total. O reagente TRIzol® (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total – Invitrogen) foi utilizado para extração do RNA total. As amostras congeladas foram adicionadas em 1 mL do reagente TRIzol® e processadas de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações. Todas as soluções e reagentes foram preparados com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% para evitar degradação do RNA.

Ao tecido gorduroso obtido foi adicionado o reagente TRIzol®, homogeneizado e mantido à temperatura ambiente por dez minutos, na sequência foi submetido à agitação vigorosa no vórtex por cinco minutos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e o tubo foi agitado por quinze segundos, seguido de três minutos de incubação à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12000 g, a 4 °C por quinze minutos. A fase aquosa foi transferida

para outro microtubo. O RNA da fase aquosa foi precipitado com 500 μL de isopropanol e incubado à temperatura ambiente por dez minutos. Submetido a uma nova centrifugação a 12000 g, a 4 °C por dez minutos, o sobrenadante foi desprezado. Ao material do microtubo, foram acrescentados 1000 μL de etanol 75% (preparado com água DEPC), após o preparado foi agitado em vórtex. O material foi submetido a uma última centrifugação a 7500 g, a 4 °C por cinco minutos. Descartou-se o etanol e o material foi desidratado a 37 °C por dez minutos. O RNA foi ressuspensão em água livre de RNase (100 μL) e congelado a -20 °C. O RNA total obtido foi purificado e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

Todo processo descrito foi realizado para as amostras dos três grupos; ou seja, tecido gorduroso coletado das lagartas desafiadas com fungo, das lagartas desafiadas com mix de bactérias e das lagartas do grupo controle.

Para visualização, preparou-se um gel de agarose 1,5%. As amostras foram preparadas igualmente; 5 μL de amostra, 10 μL de Tampão RNA buffer. As amostras foram incubadas durante cinco minutos a 65°C; logo após permaneceram no gelo durante dois minutos. Decorrida a etapa inicial, foram adicionados a cada amostra 2 μL RNA loading buffer e 1 μL de brometo de etídeo. O RNA total extraído foi aplicado no gel de agarose por eletroforese e a corrida com Tampão MOPS 1x se deu a 100V.

2.4 Dosagem em espectrofotômetro do RNA total

Em cubeta de quartzo, quantificamos o RNA total das três amostras, em um comprimento de onda de 260 nm. Para cada amostra adicionou-se 995 μL de água Milli Q com 5 μL da amostra (diluí-se 200x). A relação utilizada foi de $1A = 40 \mu\text{g/mL}$ para o cálculo da concentração do RNA total.

2.5 Tratamento do RNA total com DNase I

Ao final do processo de extração de RNA total, as amostras foram submetidas ao tratamento com DNase I, que consiste no preparo de uma reação com: RNA total 3 μg , 10xbuffer com MgCl_2 , DNase 1U e água DEPC 5 μL , para cada microtubo. O material foi incubado a 37 °C por trinta minutos, adicionado, na sequência, 1 μL de EDTA 50mM (em cada uma das amostras), e incubado a 65°C por dez minutos.

2.6 Síntese de cDNA com oligo(dT)

A síntese de cDNA e a Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa (RT-PCR) foi realizada conforme recomendação do fabricante ImProm-II Promega® com modificação, através dos primers desenhados para os PAM's.

Em cada um dos microtubos foi adicionado 1 µL de Oligo(dT) 500 µg/mL e 4 µg de RNA tratado previamente com DNase I; incubados a 70 °C por cinco minutos para desestabilizar estruturas secundárias do mRNA e, rapidamente, na sequência, incubado em gelo e mantido por cinco minutos.

Em um tampão preparado previamente (19,8 µL de água, 12 µL de Improm II 5x Reaction Buffer, 7,2 µL de MgCl₂ 25 mM e 3 µL de dNTP mix - 10 nM) para a síntese de cDNA, foram adicionados 3 µL da ImProm II RT (enzima), totalizando 45 µL de solução. Essa solução foi misturada delicadamente nas amostras tratadas anteriormente – 5 µL de amostra e 15 µL da solução. Foi incubada 25°C por cinco minutos (anelamento); posteriormente incubada a 42 °C por sessenta minutos (extensão), e finalizando, os microtubos foram incubados a 70 °C por quinze minutos (inativação RT).

2.7 Reconstituição dos oligonucleotídeos

Os primers foram desenhados a partir de sequências homólogas de PAM's descritos em outras espécies do gênero *Spodoptera* (tabela 1). Os primers foram sintetizados pela empresa IDT DNA Technologies e reconstituídos de acordo com as instruções da empresa.

Tabela 1: primers específicos para os PAM'S de Lepidoptera

Primers	Sequência dos primers	Amplicom pb
<i>Atacina</i>	For 5' – GAC CAC CTG CCA TAC GAA CA – 3' Rev 5' – GGT TGT CGT TGT GGA ACA CG – 3'	397 pb
<i>Gloverina</i>	For 5' – GTA CTC CAA GTC AGT CCG CC – 3' Rev 5' – AAG TTG CTG CTG TCT CCG TT – 3'	210 pb
<i>Galeremicina SF 6454</i>	For 5' – AAG GTT TCA GTC ATG AAG GCT TGC – 3' Rev 5' – TAC AAA CAT GGC AAG ATG GAG AGC – 3'	274 pb
<i>Actina</i>	For 5' – ACT GCA GCG TGA CAT CAA GA – 3' Rev 5' – CCG AAT ACT GGG TTG TGC CT – 3'	243 pb

O primer para Galeremicina foi utilizado como PAM's já identificado em *Spodoptera frugiperda* e o primer para Actina (gene housekeeping) foi usado como controle da expressão gênica das reações (KAKUMANI, P.K. et al., 2014).

2.8 PCR Convencional dos genes PAM's de *Spodoptera frugiperda*

Foram utilizados os primers demonstrados da tabela 1 para amplificação dos genes dos PAM's por PCR convencional de acordo com as instruções do fabricante. O quadro 1 com os volumes do mix para a reação de PCR, na qual foi adicionada a enzima Taq polimerase 0,5U, tampão de reação 1x, MgCl₂ 25 mM, dNTP mix (10 mM) e água para o volume final da reação. A reação seguiu o programa no aparelho de PCR por 35 ciclos (temperatura de desnaturação 94 °C, anelamento em 58 °C e extensão em 72 °C). Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em tampão TAE (Tris, Acetato, EDTA) em gel de agarose 1,5% por adição de brometo de etídeo.

Quadro 1: Preparo dos primers específicos para os PAM's de Lepidoptera

Experimento	Primer Actina (For, Rev)	Primer Gloverina (For, Rev)	Primer Atacina (For, Rev)
Bactéria	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.
Fungo	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.
Controle	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.	1 µL CDNA + 1 µL For + 1µL Rev.

2.9 Dosagem de Proteínas

Para quantificar as proteínas da hemolinfa, inicialmente foi preparada uma solução de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G250 0,005 g; etanol 2,5 mL; ácido

ortofosfórico 85% 5,0 mL, e água Milli-Q 50 mL), confeccionada a reta padrão a partir da solução de BSA 0,2 mg/mL, obtendo a equação da reta.

O preparo das amostras de hemolinfa foi aquecido a 100 °C por 10 minutos, em seguida foi centrifugado em 4 °C, a 10000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado em outro microtubo. Na sequência, foi dosada a proteína para cada amostra, em 595 nm, utilizando a solução de Bradford.

2.10 Eletroforese em gel – Tricina SDS PAGE

2.10.1 Gel de Separação 16% - Tricina SDS PAGE

O gel de eletroforese de separação 16% (gel buffer 3x3,3 mL; Bis-acrilamida 30% 5,3 mL; água 0,36 mL; glicerol 50% 1,00 mL, persulfato de amônio 10% 120 µL e TEMED 16 µL) foi preparado e aguardou-se a polimerização.

2.10.2 Gel de Empilhamento 4 % - Tricina SDS PAGE

Após a polimerização do gel de separação 16%, o gel de empilhamento foi preparado (gel buffer 3x 1,2 mL; bis acrilamida 30% 0,66 mL, água 3,1 mL, persulfato de amônio 160 µL e TEMED 16 µL) e o sistema foi preenchido. Depois de polimerizado, as amostras foram aplicadas (controle, fungo, bactéria). Nos primeiros três poços as amostras foram adicionadas em 10 µL + 5 µL de tampão. Nos três poços seguintes as amostras foram preparadas em concentração dobrada. A corrida iniciou-se em 90 V e depois de 20 minutos passou para 110 V. Para a visualização, o gel foi corado por cerca de uma hora com Coomassie Blue e descorado com solução de metanol 15%, ácido acético 10% e água qsp para 1000 mL por overnight.

2.11 Quantificação da expressão dos PAM'S por análise de gel

O software ImageJ (software free – <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para a quantificação densitométrica das bandas de expressão dos PAM'S em RT-PCR e nos géis de Poliacriliamida Tricina SDS-PAGE 16%, para além da visualização nos géis, obter quantificação numérica da expressão diferencial nas diferentes condições de desafio imunológico.

No RT-PCR utilizamos o padrão de 100 pb Ludwig com concentração 0,1 µg/µL como referência para a determinação da concentração das bandas do PAM's, no SDS-PAGE foi do tamanho da área das bandas para fazer uma correlação da expressão dos PAM's.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PAM's expressos no corpo gorduroso de *S. frugiperda* desafiada por injúria séptica

O estudo da expressão dos PAM's em nosso trabalho foi realizado em larvas de sexto ínstar desafiadas por microrganismos, sendo o fungo *Beauveria bassiana* e as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. O resultado da expressão dos genes PAM's do corpo gorduroso por RT-PCR semi-quantitativo pode ser observado na figura 3.

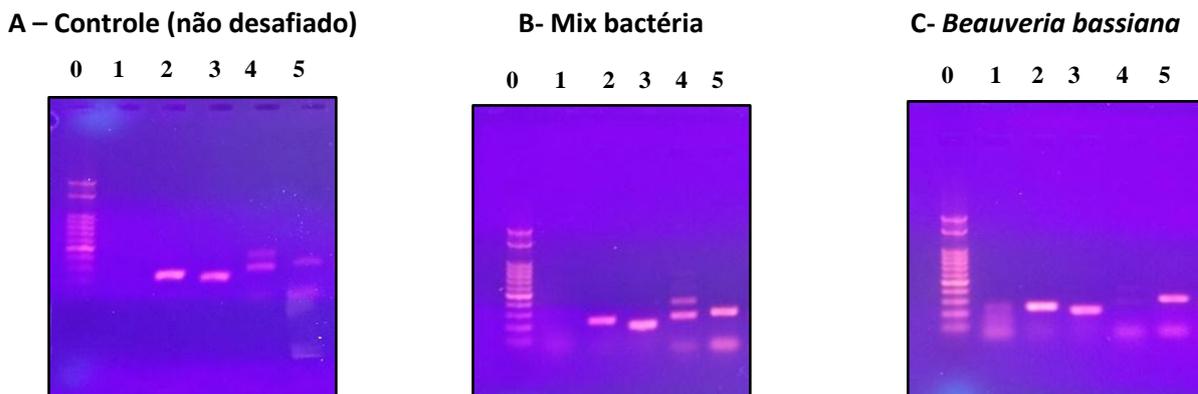


Figura 1. RT-PCR dos genes de PAM's expressos no corpo gorduroso. Poço 0 = padrão 100 pb (Ludwig biotec). Poço 1= RNA total tratado com DNase e amplificado por PCR com primer Actina; Poço 2= Gene controle actina 243 pb; Poço 3= Gene Gloverina 210 pb; Poço 4= Gene *Sf-Gallerimicina* 274 pb e Poço 5= Gene *Atacina* 397 pb.

No poço 1 de todos os géis (A, B e C) temos o RNA total tratado com DNase I amplificado por PCR com o primer actina para controle de contaminação com DNA genômico. No poço 2, tem-se o amplicon do RT-PCR do gene actina (housekeeping) em todos os géis. A expressão de actina foi calculada em relação à banda de 500 pb do padrão com o software ImageJ e serviu como comparativo na análise dos genes de PAM's.

No poço 3 há o gene do PAM *Gloverina* com amplicon de 210 pb, onde observa-se a expressão aumentada na figura 3-B em comparação ao controle de

actina na figura 3-A. A expressão de *Gloverina* foi 1.4 x ou 40% aumentada em comparação ao gene de *Gloverina* no ensaio 3-B.

No poço 4 dos géis temos o amplicon do gene *Galerecimina* 274 pb, onde podemos observar uma banda inespecífica superior ao tamanho do amplicon esperado, contudo o gene foi claramente induzido (1,10 x ou 10,48% upregulated) no desafio com o mix de bactérias (3-B), em contraste o gene *Galerecimina* teve a expressão reduzida no desafio com o fungo *B. bassiana* (3-C).

No poço 5 tem-se o amplicon do gene *Atacina* de 397 pb, onde pode-se visualizar um aumento da expressão nos experimentos 3-B e 3-C em comparação ao 3-A (não desafiado). No ensaio 3-B o gene de *Atacina* foi 1,45 x ou 45% mais expresso do que o controle de *Atacina* 3-B, e no ensaio 3-C foi 2,20x ou 45,40% downregulated em relação ao controle de actina 3-C.

3.2 PAM's na hemolinfa de *S. frugiperda* desafiada por injúria séptica

A presença dos PAM's na hemolinfa foi analisada após 24 horas do desafio séptico. Na figura 4 observa-se a presença dos PAM's nas amostras 1N (controle/não desafiada), 2B (desafiada mix bactérias) e 3F (desafiada por *B. bassiana*). Nesse caso foi detectado um aumento da concentração dos PAM's nas amostras desafiadas em comparação à amostra nativa. As bandas com massa molecular inferior a 6.5 kDa são apontadas pela seta *a* e *b* na figura 4.

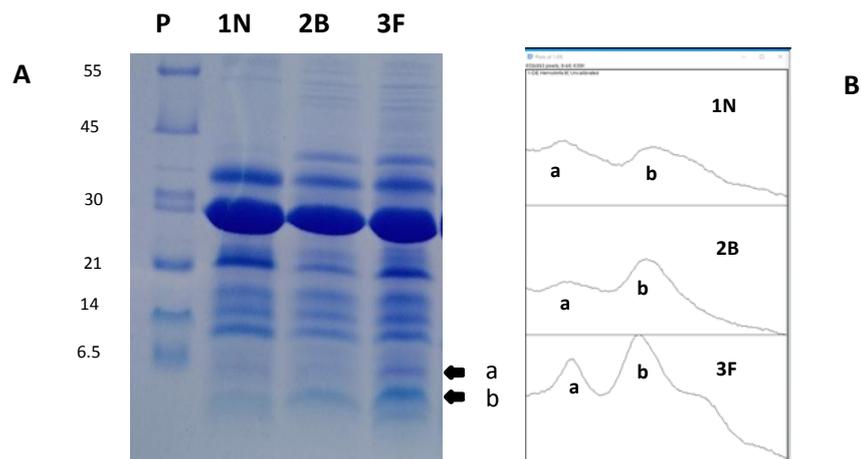


Figura 2. Eletroforese em Tricina SDS-PAGE 16%. P= Padrão Amersham Biosciences® molecular weight marker. Poços 1N: 50 µg de hemolinfa extraída de lagarta nativa; 2B: 50 µg hemolinfa de lagarta desafiada por mix de bactérias, 3F: 50 µg de hemolinfa de lagarta desafiada por fungo. **2-B.** Análise com image J das bandas peptídicas *a* e *b* indicadas por setas em 2-A.

Na figura 4-B observa-se a quantificação com o software imageJ, onde nota-se o aumento da área das bandas *a* e *b* indicadas pela seta, principalmente no

desafio com o fungo *B. bassiana* em relação ao controle. Essas bandas foram processadas para análise por espectrometria de massas a partir das bandas do gel da figura 4, contudo não geraram identificação positiva devido à falta de banco específico de Lepidoptera no Mascot database.

O programa ImageJ realiza a densitometria das bandas obtidas, contando cada microponto de tonalidade escura na foto. Deste modo, traça-se uma relação entre a densidade óptica da banda da sequência-alvo e a densidade óptica da banda controle. O programa gera uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade óptica, e, portanto, as regiões que apresentam bandas.

A banda *a* apresentou massa molecular relativa de 6.1 kDa e a banda *b* 4.7 kDa; ambas calculadas através da migração relativa no gel em comparação ao padrão de massa molecular (figura 5).

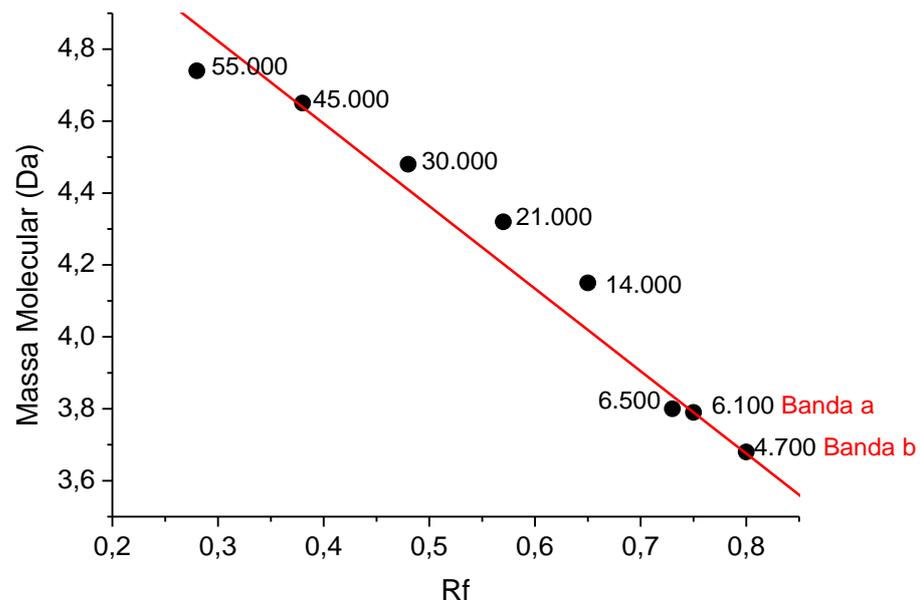


Figura 3. Estimativa da massa molecular em Daltons (Da) das bandas *a* e *b* com o programa Microcal™Origin® v. 6.0. Na reta estão distribuídas as bandas do padrão Amersham Biosciences® molecular weight marker como referência de massa molecular.

Em nosso trabalho, apesar de termos expressão basal nas larvas controles, mostramos a indução da expressão de Gloverina com o desafio séptico com o mix de bactérias e o fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

As atacinas são PAM's ativos principalmente contra bactérias (Gram-) e já foram descritas em *S. exigua* (Bang *et al.*, 2012). A expressão de Atacina e Gloverina foram suprimidas pela infecção com *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) em *S. exigua* (Choi *et al.*, 2012). A Galeremicina foi

induzida pelo desafio do mix de bactérias e suprimida no desafio com *B. bassiana* após 24 h de inoculação. Esse PAM é ativo contra bactérias e fungos, como pode ser comprovado no trabalho de Volkoff et al. (2003) e nosso trabalho confirmou que a indução pelo fungo é uma resposta mais tardia.

Os peptídeos presentes na hemolinfa são produtos do corpo gorduroso e hemócitos em resposta ao desafio imune. O nosso trabalho revelou a presença de dois PAM's que foram induzidos, contudo estes não foram identificados com as metodologias aplicadas. A banda *b*, um peptídeo de 4.7 kDa provavelmente semelhante a defensinas, as quais apresentam massa molecular de 4 kDa e são ativas contra bactérias e fungos (Marshall & Arenas, 2003). Outro peptídeo foi obtido, a banda *a* de 6.1 kDa, porém não relatado em *S. frugiperda*.

Um dos primeiros Lepidoptera modelo de estudo do sistema imune é a mariposa *Hyalophora cecropia*, que já foi extensivamente estudada e na qual foram identificadas várias classes de PAM's. Em *H. cecropia* foram identificadas PAM's da classe ricos em glicina (Hultmark et al., 1983; Axén et al., 1997). A partir destes achados iniciais os PAM's desta classe foram encontrados em vários outros Lepidoptera, com destaque para *Bombyx mori* (?3).

Em *Spodoptera exigua* foi reportado que a Gloverina é importante para a resistência contra *Bacillus thuringiensis* e a expressão de Gloverina foi induzida em desafio séptico com *Serratia marcescens* (Hwang & Kim, 2011; de Mandal et al., 2020).

Em 2003 foi identificada a presença de PAM'S semelhante à classe das defensinas em *S. frugiperda* (Volkoff et al., 2003) e recentemente foi relatada a expressão de Gloverin-3 com o desafio com Ascovírus em *S. frugiperda* (Zaghloul et al., 2020). Entretanto, em *S. frugiperda* nenhuma Gloverina foi relatada até o momento com o desafio séptico por bactérias não patogênicas e pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Estes são prováveis candidatos a PAM's que ainda necessitam ser isolados e estudados para a compreensão do seu papel na resposta imune de *S. frugiperda*.

4. CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

O desafio por injúria séptica das larvas de *Spodoptera frugiperda* mostrou ser capaz de modular a expressão dos genes dos PAM's analisados no estudo, o que indica que esses genes são homólogos aos descritos nas espécies do gênero *Spodoptera*.

Contudo, não foi possível a identificação positiva das proteínas a partir dos géis Tricina SDS-PAGE com os espectros obtidos por espectrometria de massas MALDI-ToF. Em princípio foram produzidos géis 2-DE que não tiveram bom resultado e a análise em gel unidimensional (1-DE) não produziu espectros com qualidade para identificação dos PAM's que estavam presentes nas amostras. Entretanto, a análise em gel 1-DE mostrou os PAM's expressos e induzidos na hemolinfa após o desafio microbiano.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O 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.

Os lepidópteros pragas agrícolas ainda são pouco estudados, entretanto alguns já estão emergindo como modelos de estudo, sendo a espécie *S. frugiperda* um modelo com genômica avançada, o que torna esta espécie um alvo para a busca de novos PAM's na ordem Lepidoptera.

Este trabalho abordou a imunidade inata na fase larval da mariposa, submetendo-a ao desafio séptico e caracterizando os genes expressos no corpo gorduroso e os PAM's presentes na hemolinfa. Com tantos desafios impostos, esse trabalho gerou uma pequena, mas promissora contribuição para novas pesquisas na área.

6 REFERÊNCIAS

6.1 Referências da dissertação

AGEITOS, J. M.; SÁNCHEZ-OÉRES, A.; CALO-MATA, P.; VILLA, T.G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 117–138, 2017.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43–57, 2016.

ANDRADE, D. A.; TEIXEIRA, I. R. V. Diversity of Lepidoptera in a forest fragment in Muzambinho, Minas Gerais. **Ciência Florestal**. V. 27, n. 4, 2017.

BANG, K.; PARK, S.; YOO, J.Y.; CHO, S. Characterization and expression of attacin, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Biology Reports**. V.39, p. 5151-5159. 2012.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 329–344, 1999.

CASANOVA-TORRES, Á.M., GOODRICH-BLAIR, H. Immune Signaling and Antimicrobial Peptide Expression in Lepidoptera. **Insects**. 4(3):320-38, 2013.

CHARLES, H. M.; KILLIAN, K. A. Response of the insect immune system to three different immune challenges. **Journal of Insect Physiology**, v. 81, p. 97–108, 2015.

CHOI, J.Y., ROH, J.Y., WANG, Y., ZHEN, Z., TAO, X.Y., LEE, J.H., LIU, Q., KIM, J.S., SHIN, S.W., JE, Y.H. Analysis of genes expression of *Spodoptera exigua* larvae upon AcMNPV infection. **PLoS One**. V. 7, 2012

CHUNG, P. Y.; KHANUM, R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 4, p. 405–410, 2017.

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**. V.10, 2015.

DUVIC, B.; JOUAN, V.; ESSA, N.; GIRARD P.A.; PÀGES, S.; ABI, K.Z.; VOLKOFF, N.A.; GIVAUDAN, A.; DESTOUMIEUX-GARZON, D.; ESCOUBAS, J.M. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. **Journal of Insect Physiology**. v.58, n. 6 p.881-888, 2012.

HE, Y.; CAO, X.; LI, K.; HU, Y.; CHEN, Y.; BLISSARD, G.; KANOST, M.R.; JIANG, H. A genome-wide analysis of antimicrobial effector genes and their transcription patterns in *Manduca sexta*. **Insect Biochem Mol Biol**. V. 62, p. 23-37, 2015.

HUGHES, S.R.; DOWD, P. F.; JOHNSON, E.T. Cell-Penetrating Recombinant Peptides for Potencial Use in Agricultural Pest Control Applications. **Pharmaceuticals**. V. 5, p. 1054-1063, 2012.

KOEHBACH, J. Structure-Activity Relationships of Insect Defensins. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. July, p. 1–10, 12 jul. 2017.

LEGEAI, F. et al. Establishment and analysis of a reference transcriptome for *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics**, 15:704, 2014.

LIU, Y.; SHEN, D.; ZHOU, F.; WANG, G.; AN, C. Identification of immunity-related genes in *Ostrinia furnacalis* against entomopathogenic fungi by RNA-seq analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

MACKINTOSH, J. A.; GOOLEY, A. A.; KARUSO, P. H.; BEATTIE, A. J.; JARDINE, D. R.; VEAL, D. A. gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial challenge. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, p. 387–399, 1998.

MARIA-NETO, S.; ALMEIDA, K. C.; MACEDO, M. L. R.; FRANCO, O. L. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 3078–3088, 2015.

MICHELOTTO, M.D.; FINOTO, E.L.; MARTINS, A.L.M.; DUARTE, A.P. Interação entre Transgênicos (*BT*) e inseticidas no controle de pragas-chave em híbridos de milho-safrinha. **Arq. Inst. Biol.** V. 78, n. 1, p. 71-79. 2011.

MYLONAKIS, E.; PODSIADLOWSKI, L.; MUHAMMED, M.; VILCINSKAS, A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. **Philosophical transactions R. Soc. B.** 371:20150290, 2016.

PETERLINI, E., PINTO, R.B., SCAPIM, C., RIZZARDI, D., BERTAGNA, F.A.B., JUNIOR, A.T.A. Diallel analysis of popcorn populations for yield, popping expansion and resistance to fall armyworm. **Revista Ceres**. V. 67, n.4, p. 288-295, 2020.

PINTO, C.C., GRÜTZMACHER, A.D., DA ROSA, A.P.S.A., MANICA-BERTO, R., MENDES, S.M., ARGE, L.W.P., BORGES). Molecular diversity among populations of *Spodoptera frugiperda* in Brazil evaluated by AFLP markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 50, n .4, p.343-346, 2015.

RIBEIRO, L.P.; ANSANTE, T.F.; VENDRAMIN, J.D. Effect of ethanolic extract from *Annona mucosa* seeds on development and feeding behavior of *Spodoptera frugiperda*. **Bragantia**, Campinas, v.75, n. 3, p. 322-330, 2016.

SANTOS, L.M.; REDAELLI, L.R.; DIEFENBACH, L.M.G.; EFROM, C.F.S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**. V. 34, n. 2, p. 345-350, 2004.

SEUFI, A.M.; HAFEZ, E.E.; GALAL, F.H. Identification, phylogenetic analysis and expression profile of an anionic insect defensin gene, with antibacterial activity, from

bacterial challenged cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **BMC Molecular Biology**. 2011.

SILVA, J. L.; BARBOSA, J.F.; BRAVO, J.P.; 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, 2010.

SILVA, P. R.; FORESTI, J.. Suscetibilidade do milho ao Ataque da Lagarta-do-Cartucho. **Agronegócio em Foco**, 2016.

THOMAZONI, D.; FORMENTINI, M. A.; ALVES, L.F. A. Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos à *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 81, n. 2, p. 126-133, 2014.

VOLKOF, A. N.; ROCHER, J.; D'ALENÇON, E.; BOUTON, M.; LANDAIS, I.; QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A.; FOURNIER, P.; MITA, K.; DEVAUCHELLE, G. Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidoptern insects? **Gene**. v. 319, p. 43-53, 2003.

WANGEN, D. R.B.; JUNIOR, P.H.S.P.; SANTANA, W.S.. Controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) na cultura do milho com inseticidas de diferentes grupos químicos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. v. 11, n. 22, p. 801, 2015.

XIONG, G.-H.; XING, L. S.; LIN, Z.; SAHA, T. T.; WANG, C.; JIANG, H.; ZOU, Z. High throughput profiling of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* immunotranscriptome during the fungal and bacterial infections. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 321, 2015.

XU, X. X.; ZHONG, X.; YI, H. Y.; YU, X. Q. Manduca sexta gloverin binds microbial components and is active against bacteria and fungi. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, n. 2, p. 275–284, 2012.

YANG, L.L.; ZHAN, M.Y.; ZHUO, Y.L.; PAN, Y.M.; XU, Y.; ZHOU, X.H.; YANG, P.J.; LIU, H.L.; LIANG, Z.H.; HUANG, X.D.; YU, X.Q.; RAO, X.J. Antimicrobial activities of a proline-rich proprotein from *Spodoptera litura*. **Developmental and Comparative Immunology**. V. 87, p. 137-146, 2018.

YANG, L.L.; ZHAN, M.Y., ZHUO, Y.L.; DANG, X.L.; LI, M.Y., XU, Y.; ZHOU, X.H.; YU, X.Q.; RAO, X.J. Characterization of the active fragments of *Spodoptera litura* Lebocin-1. **Insect Biochemistry and Physiology**. 2020.

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

ZIMMERMANN, A.O.; SILVA, D.M.; CARNEIRO, A.V.; BUENO, A.F.; MOSCARDI, F. Aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae) em diferentes plantas hospedeiras. **Embrapa Soja. Documentos**. 2011.

6.2 Referências do artigo

Axén, A., Carlsson, A., Engström, A., Bennich, H. (1997). Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora pupae*. *European Journal of Biochemistry*. 247(2):614-619. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00614.x.

Bang, K., Park, S., Yoo, J.Y., Cho, S. (2012). Characterization and expression of attacin, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Biology Reports* 39, 5151–5159. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1311-3>

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. 23(4-5):329-44. doi: 10.1016/s0145-305x(99)00015-4. PMID: 10426426.

Casanova-Torres, Á.M., Goodrich-Blair, H. (2013). Immune Signaling and Antimicrobial Peptide Expression in Lepidoptera. *Insects*. 4(3):320-38. doi: 10.3390/insects4030320. PMID: 25861461; PMCID: PMC4386667.

Charles, H.M., Killian, K.A. (2015). Response of the insect immune system to three different immune challenges. *Journal of Insect Physiology*. 81:97-108. doi: 10.1016/j.jinsphys. PMID: 26164746.

Choi, J.Y., Roh, J.Y., Wang, Y., Zhen, Z., Tao, X.Y., Lee, J.H., Liu, Q., Kim, J.S., Shin, S.W., Je, Y.H. (2012). Analysis of genes expression of *Spodoptera exigua* larvae upon AcMNPV infection. *PLoS One*. 7(7):e42462. doi: 10.1371/journal.pone.0042462. PMID: 22860129; PMCID: PMC3409162.

Destoumieux-Garzón, D., Brehelin, M., Bulet, P., Boublik, Y., Girard, P.-A., Baghdiguian, S., Zumbihl, R., Escoubas, J.-M. (2009) *Spodoptera frugiperda* X-Tox Protein, an Immune Related Defensin Rosary, Has Lost the Function of Ancestral Defensins. *PLoS ONE* 4(8): e6795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006795>

Duvic, B., Jouan, V., Essa, N., Girard, P.-A., Pagès, S., Khattar, Z.A., Volkoff, N.A., Givaudan, A., Destoumieux-Garzón, D., Escoubas, J.M. (2012). Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. *Journal of Insect Physiology*. v.58, p 881-888 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.001>

Hultmark, D., Engström, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., Boman, H.G. (1983). Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO Journal*. 2(4):571-6. PMID: 6628360; PMCID: PMC555063.

Hwang, J., Kim, Y. (2011). RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Volume 108, Issue 3, Pages 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.09.003>

Kakumani, P.K., Malhotra, P., Mukherjee, S.K., Bhatnagar, R.K. (2014) A draft genome assembly of the army worm, *Spodoptera frugiperda*. Genomics. 104(2):134-43. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.06.005. PMID: 24984256.

Koehbach, J. (2017). Structure-Activity Relationships of Insect Defensins. Frontiers in Chemistry, v. 5, p. 1–10, <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00045>

Mandal, S., Lin, B., Shi, M., Li, Y., Xu, X., Jin, F. (2020) iTRAQ-Based Comparative Proteomic Analysis of Larval Midgut From the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) Challenged With the Entomopathogenic Bacteria *Serratia marcescens*. Frontiers in Physiology. 8;11:442. doi: 10.3389/fphys.2020.00442. PMID: 32457652; PMCID: PMC7227483.

Marshall, S.H., Arenas, G. (2003) Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electronic Journal of Biotechnology vol. 6 doi: 10.2225/vol6-issue3-fulltext-1

Melo, E.P., Fernandes, M.G., Degrande, P.E., Cessa, R.M.A, Salomão, J.L., Nogueira, R.F. (2006). Spatial Distribution of Plants Infested with *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on Corn Crop. Neotropical Entomology 35(5):689-697.

Peterlini, E., Pinto, R.B., Scapim, C., Rizzardi, D., Bertagna, F.A.B., Junior, A.T.A. (2020). Diallel analysis of popcorn populations for yield, popping expansion and resistance to fall armyworm. Revista Ceres, Viçosa, v. 67, n.4, p. 288-295, 10.1590/0034-737X202067040006

Pinto, C.C., Grützmacher, A.D., Da Rosa, A.P.S.A., Manica-Berto, R., Mendes, S.M., Arge, L.W.P., Borges, C.T. (2015). Molecular diversity among populations of *Spodoptera frugiperda* in Brazil evaluated by AFLP markers. Pesquisa Agropecuária Brasileira. vol.50, no.4, p.343-346. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000400010>

Ribeiro, L.P., Ansante, T.F., Vendramim, J.D. (2016). Effect of ethanolic extract from *Annona mucosa* seeds on development and feeding behavior of *Spodoptera frugiperda*. *Bragantia*, 75(3), 322-330. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.473>

Sarmiento, R.A., Aguiar, R.W.S., Aguiar, R.A.S.S., Vieira, S.M.J., Oliveira, H.G., Holtz, A.M. (2002). Biology Review, Occurrence and Control of *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) in corn in Brazil. Biosci Journal v.18, n.2, p.41-48

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. Nature Protocols. 1(1):16-22. doi: 10.1038/nprot.2006.4. PMID: 17406207.

Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ?, Virulence, 9:1, 1625-1639, DOI: [10.1080/21505594.2018.1526531](https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531)

Silva, J.L.C., Barbosa, J.F., Bravo, J.P., Souza, E.M. de, Huergo, L.F., Pedrosa, F.O., Esteves, E., Daffre, S., Fernandez, M.A. (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(5), 431-436. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010005000010>

Silva, P.R., Foresti, J.(2016) Suscetibilidade do milho ao Ataque da Lagarta-do-Cartucho. *Agronegócio em Foco*.

Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., Sunagawa, T., Yamaji, K., Asaoka, A., Mita, K., Yamakawa, M. (2008) A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(12):1087-110. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.09.001 PMID: 18835443.

Thomazoni, D., Formentini, M.A., Alves, L.F.A. (2014). Patogenicity of entomopathogenic fungi to *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arquivos do Instituto Biológico* v. 81, n. 2, p. 126-133. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001162012>.

Viljakainen, L. (2015) Evolutionary genetics of insect innate immunity. *Briefings in Functional Genomics*, Volume 14, Issue 6, Pages 407–412, <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv002>

Volkoff, A.N., Rocher, J., d'Alençon, E., Bouton, M., Landais, I., Quesada-Moraga, E., Vey, A., Fournier, P., Mita, K., Devauchelle, G. (2003) Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidopteran insects? *Gene*. 13;319:43-53. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00789-3. PMID: 14597170.

Wangen, D.R.B., Júnior, P.H.S.P., Santana, W.S. (2015) Controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) na cultura do milho com inseticidas de diferentes grupos químicos. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*. v. 11, n. 22, p. 801. DOI: <http://dx.doi.org/10.18677>

Zaghloul, H.A.H., Hice, R., Bideshi, D.K., Arensburger, P., Federici, B.A. (2020) Mitochondrial and Innate Immunity Transcriptomes from *Spodoptera frugiperda* Larvae Infected with the *Spodoptera frugiperda* Ascovirus. *Journal of Virology* 94(9):e01985-19. doi: 10.1128/JVI.01985-19. PMID: 32075926; PMCID: PMC7163118.