

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

PROGRAMA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DA
HEMOLINFA DA BROCA-DA-CANA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) POR ANÁLISE PROTEÔMICA**

IARA FERNANDA ROCHA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

CASCADEL-PR

2015

IARA FERNANDA ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DA
HEMOLINFA DA BROCA-DA-CANA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) POR ANÁLISE PROTEÔMICA**

ORIENTADOR: PROF. Dr. JOSÉ LUIS DA CONCEIÇÃO SILVA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

CASCADEL-PR

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R573i Rocha, Iara Fernanda
Identificação de polipeptídeos e proteínas antimicrobianas da hemolinfa da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) por análise proteômica. / Iara Fernanda Rocha.— Cascavel, 2015.
57 p.

Orientador: Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2015
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Proteoma. 2. *Diatraea saccharalis*. 3. Peptídeo antimicrobiano. I. Silva, José Luis da Conceição. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 615

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

A revisão dos recursos linguísticos (aspectos ortográficos) e normas de dissertação deste trabalho foram realizadas por Sueli Ferreira Rocha, com titulação em letras.

IARA FERNANDA ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DA
HEMOLINFA DA BROCA-DA-CANA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) POR ANÁLISE PROTEÔMICA**

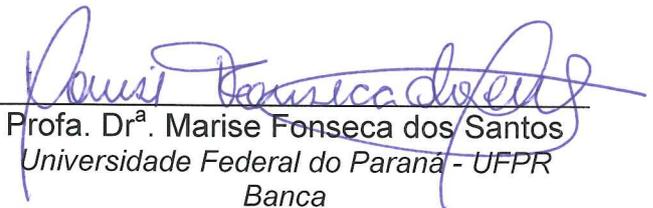
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

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

BANCA EXAMINADORA:



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



Profa. Dr^a. Marise Fonseca dos Santos
Universidade Federal do Paraná - UFPR
Banca



Profa. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE
Banca

BIOGRAFIA RESUMIDA

Iara Fernanda Rocha, filha de Jacó Ferreira Rocha e Josiane de Almeida Falcão Rocha, nasceu em 21 de agosto de 1989 na cidade de Céu Azul, no estado do Paraná. Concluiu o ensino médio na Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Graduiu-se em Farmácia Generalista pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná em 2013. Iniciou o Mestrado *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas em dezembro de 2013, na linha de pesquisa Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde, e defendeu sua dissertação no dia três de dezembro de 2015.

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor, e não aos homens, Sabendo que recebereis do Senhor o galardão da herança, porque a Cristo, o Senhor, servis”.

Colossenses 3: 23, 24. Bíblia Sagrada.

Ao meu esposo, Everton Nakai, pelo carinho,
amor, compreensão, apoio, incentivo,
companheirismo, e pelo seu grande coração.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que é tudo para mim, e me permitiu chegar até aqui, me dando força e perseverança, sendo o centro da minha vida e meu amor maior, devo tudo a Ele,

Ao meu esposo, Everton Nakai, pelo apoio, amor, carinho, por me bancar e não me deixar desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim, por ter paciência durante este período muitas vezes exaustivo, por seu melhor amigo e motivador;

Aos meus pais, Jacó e Josiane Rocha e ao meu irmão João Gabriel por serem meus pilares, por me incentivarem a estudar e persistir, por serem meus referenciais de determinação e esforço, pelas orações e amor inexplicável.

Ao meu orientador, professor José Luis da Conceição Silva (UNIOESTE, Cascavel), pela paciência, pela ajuda, pelos inúmeros ensinamentos, pela dedicação, pelo apoio e por me acompanhar em cada detalhe;

Às amigas Ana Flávia, Jakeline, Luana e Mariana, por serem tão incríveis, prestativas e divas, por me fornecerem carinho, conselhos, café, a chave da casa ou hospedagem em Curitiba, obrigada por me incentivarem e acreditarem em mim.

À Professora Marina Kimiko Kadowaki, que mesmo sendo da banca, não hesitou em nos acompanhar, dar dicas, conselhos e nos ajudar no decorrer de todo o trabalho, seu auxílio foi muito importante.

À Professora Marise Fonseca dos Santos (UFPR, Palotina), pelo compartilhamento de conhecimentos e por todas as correções e sugestões na qualificação e na defesa do Mestrado.

Ao Professor Luciano Fernandez Huergo (UFPR, Curitiba), pela ajuda, paciência, pela colaboração e dedicação em me ensinar e me auxiliar na identificação das proteínas, sua parceria foi essencial,

Ao professor Professor Luiz Francisco Angeli Alves (UNIOESTE, Cascavel), por nos permitir utilizar os insetos e dependências do setor de biotecnologia,

À Professora Adriana Fiorini e Professor Fábio Rosado (UFPR, Palotina), por me ajudarem a desvendar o Image Master;

A todos do laboratório que de alguma forma me auxiliaram, em especial: Amanda, Juliana, Carla, Jaína e Laysa.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DA HEMOLINFA DA BROCA-DA-CANA *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) POR ANÁLISE PROTEÔMICA

Diatraea saccharalis é um importante inseto praga da cana-de-açúcar e de outras culturas agrícolas, por isso, tem sido foco de pesquisas. De uma forma geral, os insetos apresentam sistema imunológico inato, que os provêm com uma gama de respostas imunológicas contra microrganismos. Inúmeros peptídeos antimicrobianos têm sido isolados e caracterizados a partir de insetos modelo, como *Bombyx mori* e *Drosophila melanogaster*. Em larvas de 5º instar de *Diatraea saccharalis* já foi reportada uma proteína da família Gloverina com atividade antimicrobiana. Considerando estes fatos, os objetivos deste trabalho foram determinar o perfil de proteínas da hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* em 5º instar desafiadas com *Escherichia coli* (ATCC 11224) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), identificar proteínas e polipeptídios diferencialmente expressos através da análise dos dados proteômicos, e verificar a atividade antimicrobiana do extrato bruto em placas por meio da inibição do crescimento microbiano. Foram extraídas proteínas da hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* desafiadas e de não desafiadas. As amostras foram quantificadas e submetidas à eletroforese bidimensional (2-DE) para obtenção de um perfil proteômico da hemolinfa nativa, de larvas desafiadas por *E. coli* e *B. subtilis*. Cada gel apresentou em média 300 spots protéicos e 92 destes spots eram correspondentes nos géis nas três condições. Foram retirados 41 spots protéicos diferentes dos géis, estes spots foram digeridos com tripsina e analisados por espectrometria de massas do tipo Maldi-ToF/ToF. Nesta análise, foi possível identificar 10 proteínas a partir dos espectros MS e MS/MS. Entre elas, proteínas que foram expressas pela indução com ambas as bactérias, como a quitinase, e os peptídeos antimicrobianos: proteína homóloga à turandot A (turandot A like-protein), proteína homóloga à Atacina (Attacin like-protein), proteína homóloga de reconhecimento de peptideoglicano. Outro peptídeo antimicrobiano encontrado, o homólogo à β -defensina (β -defensin like-protein), foi induzido somente na hemolinfa das larvas desafiadas por *B. subtilis*. Uma proteína homóloga à Ciclofilina (Cyclophilin like-protein) foi encontrada na hemolinfa da larvas desafiadas e não-desafiadas. Além disso, também foram encontradas proteínas com atividade de eclosão, hidrolítica, não caracterizada e proteína hipotética com função desconhecida. Adicionalmente, foi também testada a atividade antimicrobiana dos extratos brutos da hemolinfa, pelo ensaio de zona de inibição do crescimento microbiano em placa, e nesta análise, foi verificada a inibição do crescimento de *B. subtilis* com o extrato da hemolinfa de larvas desafiadas com *B. subtilis*. Esta é a primeira análise do perfil proteômico da hemolinfa de uma importante praga agrícola, na qual verificou-se a expressão de algumas proteínas com funções diversas e quatro proteínas relacionadas a resposta imunológica. Estes resultados contribuem para a compreensão do sistema imunológico da *D. saccharalis* sob condição de infecção.

Palavras-chave: proteoma, hemolinfa, resposta inata.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF POLYPEPTIDES AND PROTEIN ANTIMICROBIAL THE HEMOLYMPH OF SUGAR CANE BORER *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) FOR ANALYSIS PROTEOMIC

Diatraea saccharalis is an important insect pest of sugarcane and other crops, so it has been the focus of research. In general, the insects present innate immune system, which come with a range of immune responses against microorganisms. Many antimicrobial peptides have been isolated and characterized from model insects such as *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. In the 5th instar larvae of *Diatraea saccharalis* has already been reported a protein of Gloverin family with antimicrobial activity. Considering these facts, the objectives of this study were to determine the protein profile of hemolymph larvae from *Diatraea sacharalis* at 5th instar challenged with *Escherichia coli* (ATCC 11224) and *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), identify differentially expressed proteins and polypeptides by analyzing the proteomic data, and verifying the antimicrobial activity of crude extract on plates by inhibition of microbial growth. Proteins from the hemolymph of larvae of *D. sacharalis* challenged and unchallenged were extracted. The samples were quantified and subjected to two-dimensional electrophoresis (2-DE) to obtain a proteomic profile of native hemolymph, challenged by *E. coli* and *B. subtilis*. Each gel showed an average of 300 protein spots and 92 spots were correspondents in these gels on three conditions. Were taken 41 different protein spots from gels, these spots were digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry of the type MALDI-TOF/TOF. In this analysis, it was possible to identify 10 proteins from MS and MS/MS spectra. Among these proteins were expressed by induction with both bacteria such as chitinase and antimicrobial peptides: protein homologous to the turandot (turandot the like-protein), protein homologous to attacin (Attacin like-protein), and protein homologous peptidoglycan recognition. Another antimicrobial peptide was found, the homologous to β -defensin (β -defensin-like protein), induced only in the hemolymph of the larvae challenged by *B. subtilis*. A homologous protein Cyclophilin (Cyclophilin-like protein) was found in the hemolymph of larvae challenged and non-challenged. In addition, were also found proteins with hatching activity, hydrolytic not characterized and hypothetical protein of unknown function. Additionally, it also tested the antimicrobial activity of crude extracts from the hemolymph, by testing inhibition of microbial growth plate area, and this analysis was observed inhibition of growth of *B. subtilis* with the hemolymph extract from larvae challenged with *B. subtilis*. This is the first analysis of proteomic profile of hemolymph of a major agricultural pest, which verified the expression of some proteins with several functions and four related proteins immune response. These results contribute to the understanding of the immune system *D. saccharalis* under condition of infection.

Keywords: proteome, hemolymph, innate response.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 13 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 13 |
| 3.1 Modelo de estudo: <i>Diatraea saccharalis</i> | 13 |
| 3.2 <i>Diatraea saccharalis</i> como praga da cana-de-açúcar..... | 14 |
| 3.3 Sistema imunológico de insetos..... | 16 |
| 3.4 Peptídeos antimicrobianos..... | 18 |
| 3.5 Peptídeos antimicrobianos em insetos..... | 22 |
| 3.6 Coexistência de Insetos e Microrganismos..... | 23 |
| 3.7 A problemática de resistência a antimicrobianos | 24 |
| 3.8 Busca por novos antibióticos | 25 |
| 3.9 Ferramentas proteômicas | 27 |
| 4.0 Abordagens proteômicas aplicadas ao estudo da imunidade em insetos | 29 |
| INTRODUÇÃO..... | 31 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| Manutenção da cultura de <i>D. saccharalis</i> e coleta da amostra da hemolinfa não desafiada..... | 33 |
| Desafio imunológico das larvas com <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> | 33 |
| Obtenção e dosagem das proteínas da hemolinfa | 34 |
| Focalização isoeletrica (IEF) das proteínas extraídas..... | 34 |
| Eletroforese bidimensional (2-DE), análise das imagens de géis e digestão com tripsina..... | 34 |
| Espectrometria de massa Maldi-ToF/ToF..... | 35 |
| Identificação das Proteínas..... | 35 |
| Ensaio da zona de inibição do crescimento bacteriano | 36 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |

| | |
|---|----|
| Perfil proteômico da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> | 36 |
| Proteínas diferencialmente expressas nas condições de desafio séptico | 39 |
| Atividade antimicrobiana do extrato protéico da hemolinfa..... | 41 |
| CONCLUSÕES..... | 42 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 42 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 (artigo) Lista das proteínas expressas na hemolinfa da larva da <i>D. saccharalis</i> desafiada com <i>B. subtilis</i> e <i>E. coli</i> identificadas por Maldi-ToF/ToF (diferença de pelo menos 1,5 vezes)..... | 38 |
| Quadro 2 Antibióticos em uso clínico, alvo no microrganismo patogênico e mecanismo de ação para atividade antimicrobiana..... | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Ciclo biológico da Broca da cana-de-açúcar (<i>Diatraea saccharalis</i>) e duração de cada fase do inseto. Fonte: ALMEIDA, 2009..... | 14 |
| Figura 2 Furo feito pela broca <i>D. saccharalis</i> no colmo da cana-de-açúcar. Fonte: Joelmir Silva 2004..... | 15 |
| Figura 3 Podridão vermelha resultante da entrada de fungos pelo furo no colmo. Fonte BASF S. A..... | 15 |
| Figura 4 Diferentes estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos. (A) estruturas α -helicoidais; (B) folha- β ; (C) estrutura dobrada e (D) estrutura estendida (adaptado de Resende <i>et al.</i> , 2008)..... | 19 |
| Figura 5 Representação esquemática de alguns mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos (PAM). A ação dos diferentes PAMs pode se manifestar por uma atividade detergente (A) ou pela formação de poros (B) nas membranas dos microrganismos (adaptado de TOKE, 2005)..... | 22 |
| Figura 1 (artigo) Proteínas identificadas por Maldi/ToF-ToF. (A) Gel bidimensional (2-DE) de proteínas expressas na hemolinfa de larvas controle de <i>D. saccharalis</i> . Gel (B) infectadas com <i>B. subtilis</i> e (C) infectadas com <i>E. coli</i> | 37 |
| Figura 2 (artigo) (A) 1-Extrato da hemolinfa de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> nativas, 2-Extrato da hemolinfa de larvas desafiadas com <i>E. coli</i> , 3-Antibiótico Gentamicina, 4-Disco controle (sem adição de extrato ou antibiótico), 5-Extrato da hemolinfa de larvas desafiadas com <i>B. subtilis</i> . (B) Zona de inibição de crescimento bacteriano ao redor do disco contendo o extrato da hemolinfa..... | 41 |

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, houve um enorme progresso no conhecimento sobre a defesa imunológica dos insetos. Devido à biodiversidade desses organismos, eles têm proporcionado modelos de estudo importantes para estratégias antimicrobianas, já que estas podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de controle de patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Apesar dos insetos não terem um sistema imunológico adaptativo, eles têm um sistema imune inato para defenderem-se das infecções microbianas. Esta defesa inata consiste de barreiras estruturais e passivas, bem como reações relacionadas principalmente à imunidade celular e à imunidade humoral, produzindo peptídeos com atividade antibiótica (NETEA *et al.* 2011).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) desempenham um papel significativo no sistema de defesa de plantas, insetos, anfíbios, artrópodes e mamíferos. Enquanto suas propriedades antibióticas só recentemente foram identificadas, PAMs têm recebido atenção como novos quimioterápicos, moléculas sinalizadoras intracelulares e agentes antitumorais (LEE *et al.*, 2015). Além disso, o envolvimento de PAMs na regulação de alguns processos imunológicos e inflamatórios, os tornam possíveis candidatos como imunoestimulantes ou adjuvantes de vacinas (MELONI *et al.*, 2015).

Os PAMs têm atraído a atenção como antibióticos alternativos ou complementares, devido à perspectiva de potencial, com ação rápida e amplo espectro de atividade contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, vírus, fungos e parasitas. Além de proteger contra microrganismos ambientais, eles apresentam vários mecanismos de ação e, conseqüentemente, uma baixa capacidade de induzir resistência repetida, o que permite o uso limitado de outros antibióticos (SUN *et al.*, 2015; DOSLER *et al.*, 2014).

Estudos *in vivo* relacionados com os organismos - bactérias, plantas, insetos e mamíferos – centram-se em empregar PAMs em decifrar suas interações com os microrganismos, patógenos e simbiontes (MARÓTY *et al.*, 2011).

As análises proteômicas voltadas para a identificação de PAMs, ainda são poucas e limitadas a algumas espécies, apesar de serem fundamentais para a descoberta de novos compostos com atividade antibiótica, levando-se em consideração que alguns estudos já reportaram resultados relevantes, inclusive em relação à *Diatraea saccharalis*.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi realizar a análise diferencial dos polipeptídios da hemolinfa da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*, utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas do tipo Maldi-ToF/ToF. E assim, determinar o perfil proteômico da hemolinfa da larva *Diatraea saccharalis* em 5º instar em grupos de lagartas nativas e infectadas com *E. coli* e com *B. subtilis*.

Os objetivos específicos foram: identificar os polipeptídios empregando ferramentas de bioinformática para comparação dos espectros de massas experimentais e dados físico-químicos (ponto isoeletrico e massa molecular) com dados depositados nos bancos de dados; encontrar proteínas e/ou polipeptídios que estejam envolvidos na resposta imune do inseto, que apresentem atividade antimicrobiana e que sejam reguladas positivamente ou negativamente na situação de infecção por uma ou ambas as bactérias utilizadas para o desafio séptico; e verificar por ensaio em placa, a presença de halo de inibição de crescimento microbiano nos extratos brutos das amostras de hemolinfa que apresentarem identificação positiva para compostos antimicrobianos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Modelo de estudo: *Diatraea saccharalis*

D. saccharalis é um inseto que passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. A mariposa é a forma adulta e apresenta uma coloração amarelo-palha, com manchas escuras nas asas anteriores e asas posteriores brancas. Os machos são menores que as fêmeas e apresentam pigmentação mais evidente nas asas, além de possuírem cerdas no último par de pernas. Os adultos possuem asas em forma de “V” invertido quando fechadas e vivem cerca de cinco dias. As fêmeas depositam aproximadamente 200 a 400 ovos durante este período (PANUTTI, 2002).

Após o acasalamento, inicia-se o ciclo (Figura 1), a fêmea põe seus ovos nas folhas da planta, preferencialmente na face abaxial do limbo. O número de ovos de cada inseto pode variar a cada postura de 5 a 50, que são muito sensíveis ao ressecamento

quando a umidade relativa do ar se encontra inferior a 70%, A eclosão destes dá-se em um intervalo de quatro a nove dias (CAPELI, 2012).

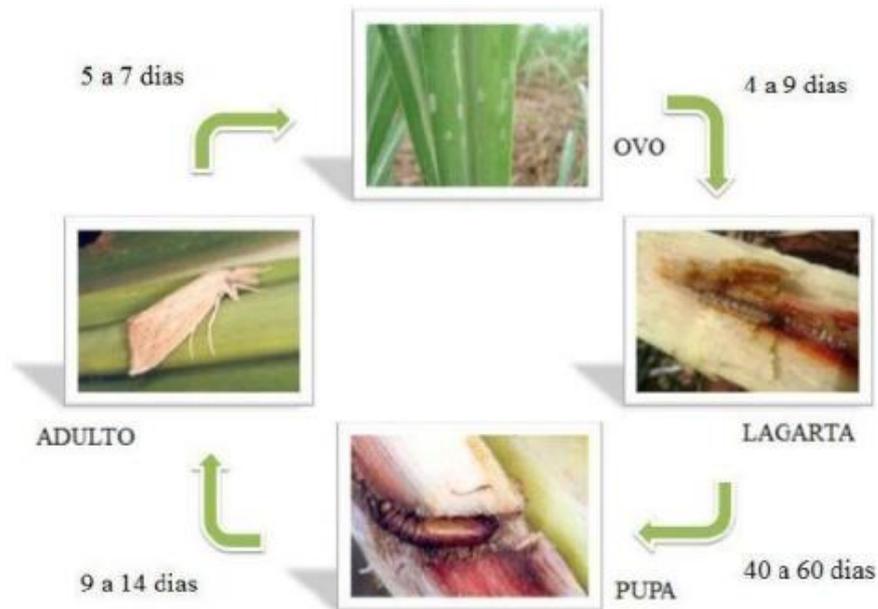


Figura 1 Ciclo biológico e duração de cada fase da Broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Fonte: Figura reproduzida de Almeida (2009).

3.2 *Diatraea saccharalis* como praga da cana-de-açúcar

Desde quando o homem passou a cultivar as plantas para fins alimentícios e medicinais, deteve-se com problemas de animais que se alimentavam dessas plantas, ocasionando competitividade e frequentemente danos (CARVALHO *et al.*, 2013).

A cana-de-açúcar é um agro ecossistema que abriga numerosas espécies de insetos, sendo que algumas delas, dependendo da época do ano e da região, podem ocasionar sérios prejuízos econômicos (PORTELA *et al.*, 2010).

A ordem Lepidóptera, a qual pertence a *D. saccharalis*, é a mais conhecida entre os insetos, com sistemática bem estabelecida para a maioria dos grupos. Apresenta uma série de espécies de mariposas, capaz de causar severas perdas em várias das principais culturas agrícolas em todo o mundo (SILVA-BRANDÃO *et al.*, 2011).

Existem cerca de 50 espécies de larvas de Lepidópteros que são reconhecidas como praga da cana-de-açúcar, variando de uma região para outra, atacam

principalmente gramíneas, entre elas, as espécies do gênero *Chilo*, *Sesamia* e especialmente *Diatraea* (LONG e HENSLEY, 1972).

A broca da cana, *Diatraea saccharalis*, é considerada a praga da cana mais importante no hemisfério ocidental, sendo responsável por danos diretos e indiretos na planta (SIMÕES *et al.*, 2012).

Os danos diretos (Figura 2) são caracterizados pela abertura de “galerias” no colmo, perda de peso e fragilidade que facilita o tombamento de plantas pelo vento. Já os indiretos (Figura 3), acontecem devido à penetração de fungos através dos orifícios e galerias, ocasionando a podridão vermelha do colmo e conseqüentemente, perdas maiores do que aquelas causadas pelos danos diretos (PAULI, 2009). Além disso, a redução da quantidade e pureza do caldo que pode ser extraído a partir da cana quando brocas estão presentes e a produção de sacarose pode ser diminuída de 10 a 20% (CAPINERA, 2001).



Figura 2 Furo feito pela broca *D. saccharalis* no colmo da cana-de-açúcar. Fonte: Joelmir Silva 2004



Figura 3 Podridão vermelha resultante da entrada de fungos pelo furo no colmo. Fonte BASF S. A.

Além de acometer a cana-de-açúcar, ocasionalmente, este inseto também causa perdas econômicas em outras culturas. Ultimamente, *D. saccharalis* tornou-se uma praga da haste do milho (HUANG *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2004) e provoca, às vezes, prejuízos econômicos em lavouras de arroz, fato que tem demonstrado maior importância nas regiões Norte e Centro-oeste do país, tendo sido verificado em lavouras e experimentos com a cultura (FERREIRA *et al.*, 2004).

A presença em todas as fases de desenvolvimento da planta ao longo do ano, bem como, a localização das fases de larva e pupa dentro da planta torna o controle da broca da cana uma tarefa árdua (CORTÉS *et al.*, 2010).

Dessa forma, a partir do momento em que a broca encontra-se no interior do colmo, passa-se a dar maior ênfase a trabalhos que busquem obter medidas alternativas, dentre elas a resistência das plantas, que pode ser tanto constitutiva quanto induzida, para que ela consiga combater a praga (BORTOLI, 2005).

3.3 Sistema imunológico de insetos

Semelhante ao sistema de defesa dos vertebrados, o dos insetos é composto por barreiras estruturais “passivas” e por respostas ativas, contra elementos estranhos que alcancem a sua hemocele. O rígido exoesqueleto, o sistema digestivo e as barreiras respiratórias, funcionam como barreiras estruturais que constituem a primeira linha de defesa dos insetos. Além disso, os insetos cicatrizam rapidamente as suas feridas causadas por trauma ou invasão por parasitas, impedindo a perda fatal de fluidos corporais e a penetração de patógenos oportunistas (NEGREIRO *et al.*, 2004).

O sistema imunológico do inseto é inato e, compreende em um conjunto de respostas de defesa celular e humoral que são altamente eficientes contra ataques de microrganismos ou parasitas (LAVINE e STRAND, 2002).

A imunidade inata refere-se à defesa inicial do hospedeiro contra as fases iniciais da infecção por microrganismos (KINGSOLVER *et al.*, 2013). A distinção entre os mamíferos e insetos é importante, porque os insetos não têm um sistema imunológico adaptativo, ou, pelo menos, eles não têm anticorpos e células T de memória do tipo que ocorrem em vertebrados (SCHMIDT *et al.*, 2008).

Apesar disso, insetos e vertebrados exibem semelhanças consideráveis nas vias de sinalização intracelular, que regulam a resposta imune inata e em alguns dos mecanismos efetores utilizados contra microrganismos. Assim, as descobertas feitas através de pesquisa em insetos, podem ser aplicáveis na clínica médica em humanos (PASKEWITZ, 2008).

O reconhecimento de um microrganismo pelo inseto é conhecido como “não próprio”, e é a maneira pela qual ele distingue de seus próprios tecidos para que a resposta imune possa ser ativada. A imunidade inata compreende inúmeros mecanismos efetores que são eficazes em controlar a infecção, estão incluídas neste processo três etapas distintas: o reconhecimento do corpo estranho, a rede regulatória e os

mecanismos efetores, ou seja, as células e moléculas de defesa, que eventualmente destroem o invasor (OLIVEIRA, 2008).

Os insetos possuem sistema imunológico eficiente, tanto nos componentes celulares quanto nos humorais. Mediada por hemócitos, a defesa celular inclui fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento, enquanto a chave da resposta humoral, é a indução da expressão de peptídeos antimicrobianos que em resposta à infecção sistêmica, são produzidos e secretados na hemolinfa, onde atacam diretamente os microrganismos (BAE e KIM, 2003; HUSSAIN e ASGARI, 2014; LAVINE *et al.*, 2005)

Além disso, a imunidade humoral é constituída por cascatas proteolíticas na hemolinfa, que levam á melanização localizada (acúmulo de melanina que ocasiona pigmentação no tegumento) e coagulação. Porém, o mecanismo de como a infecção inicial é um sinal para a produção de PAMs pelo corpo gorduroso, não está totalmente compreendido. Tem sido proposto que cascatas proteolíticas são desencadeadas por componentes da parede celular dos microrganismos, que conduz à clivagem de proteínas circulantes, como citocinas, para ligantes que interagem com receptores transmembranares ativos de células do corpo gorduroso. (UTTENWEILER-JOSEPH *et al.*, 1998).

Assim, o corpo gorduroso de insetos é um agente ativo na resposta humoral, uma vez que produz um número de proteínas diretamente envolvidas na defesa imunológica. Adicionalmente, o corpo gorduroso é o principal órgão responsável pela síntese e armazenamento de nutrientes em insetos. Este tecido está envolvido com várias funções metabólicas, além da manutenção da homeostase em insetos. Está também relacionado com o metabolismo de lipídeo, açúcar e nitrogênio, que são precursores no metabolismo de outros tecidos. (PINHEIRO *et al.*, 2010).

No sistema imunológico dos insetos, não foram evidenciadas imunoglobulinas específicas (anticorpos monoclonais) para reconhecimento de antígenos. Assim, torna-se importante a caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos em resposta a infecções em várias espécies de insetos, já que estes possuem um sistema de reconhecimento de patógenos capaz de ativar um complexo molecular sinalizador e dessa forma, coordenar a expressão de vários genes (NEGREIRO *et al.*, 2004).

3.4 Peptídeos antimicrobianos

Uma estratégia de proteção, constantemente observada na natureza, presente na grande maioria dos organismos vivos, como, por exemplo, plantas, animais vertebrados e invertebrados e microrganismos é a produção de peptídeos com atividade antimicrobiana (Quadro 1). Apesar de possuírem características estruturais diversificadas, em sua maioria são peptídeos catiônicos, que podem ser classificados de acordo com sua estrutura primária e secundária. Podem ter tamanho que varia de 30 a 100 resíduos e uma grande variedade de aminoácidos em sua composição (SIMONE e SOUZA, 2002).

Quadro 1 Alguns exemplos de Peptídeos Antimicrobianos produzidos por organismos eucarióticos e procarióticos

| Organismo Produtor | Peptídeos Antimicrobianos |
|---------------------------|------------------------------------|
| Mamíferos | Defensivas, protegrina |
| Anfíbios | Magainina, bombinina, demaseptinas |
| Insetos | Defensinas, cecropinas, melitina |
| Plantas | Defensinas, tioninas, AP24 |
| Bactérias | Bacteriocinas |

Fonte: Quadro reproduzido do site do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés UFRJ.

É possível agrupar os peptídeos antimicrobianos em quatro classes distintas de estruturas secundárias. As α -hélices são as estruturas mais comumente observadas (Figura 4A), formadas apenas quando o peptídeo entra em contato com a membrana, e as folhas- β (Figura 4B), estabilizadas por ligações dissulfeto e que ocasionalmente apresentam pequenos segmentos de estrutura α -hélice. As demais estruturas, menos comuns, são as estruturas curvadas (Figura 4C), e estruturas estendidas (Figura 4D) (VERLY, 2010).

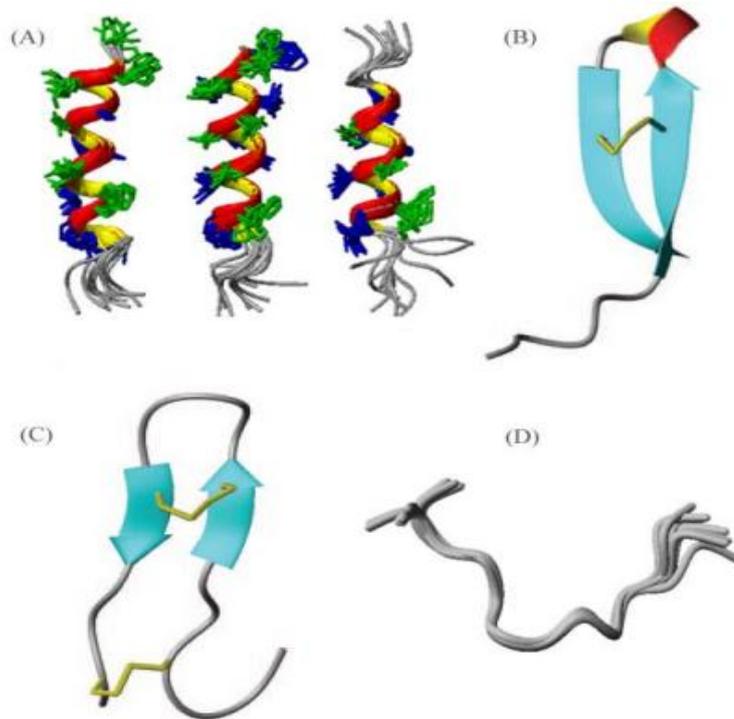


Figura 4 Estruturas tridimensionais encontradas em peptídeos antimicrobianos: (A) estruturas α -helicoidais; (B) folha- β ; (C) estrutura dobrada e (D) estrutura estendida (adaptado de Resende *et al.*, 2008).

Embora os peptídeos variem em sua composição de aminoácidos, no tamanho e conformação, eles mostram semelhanças na sua função antimicrobiana. (CHAURASIA *et al.*, 2015).

Os PAMs partilham características comuns, tais como estabilidade térmica elevada e amplo espectro de atividade antimicrobiana, baseado na sua composição de aminoácidos. Após a infecção, as vias de sinalização são rapidamente ativadas para induzir a síntese de grande quantidade destes peptídeos, finalmente resultando em forte atividade antimicrobiana na hemolinfa para eliminar o microrganismo invasor (ZHANG *et al.*, 2013).

Um grande número de PAMs foi identificado a partir de uma ampla variedade de fontes, ou gerado por hidrólise de proteínas. A caracterização e purificação deles são importantes para investigação das propriedades e outras aplicações, mas a identificação em amostras complexas é muitas vezes um desafio. As propriedades químicas e físicas complexas de PAMs, em conjunto com as baixas quantidades em fontes naturais, também contribuem para a dificuldade da tarefa (TANG *et al.*, 2015).

Na base de dados (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), estão depositados mais de 2.000 peptídeos antimicrobianos, pertencentes a várias classes de moléculas antibióticas. Verificou-se que PAMs têm mantido a sua atividade antimicrobiana durante a evolução, assim, a diversidade de sequências destes peptídeos, provavelmente indica a adaptação de organismos a sobreviver em diferentes ambientes contendo patógenos. Após a infecção, um único inseto pode produzir até 10 a 15 peptídeos antimicrobianos que podem, efetivamente, matar os invasores. A liberação simultânea de múltiplos PAMs durante uma resposta imune pode ser um fator essencial para inibir a resistência dos microrganismos (JEARAPHUNT *et al.*, 2015).

Muitas espécies de insetos já tiveram o sistema imunológico caracterizado por sequenciamento do genoma e análise do transcriptoma, tornando necessário estudos comparativos de repertórios de genes de imunidade em diferentes insetos, principalmente em relação aos genes que codificam peptídeos antimicrobianos, visto ser conhecido que a função destes peptídeos em vertebrados não se resume a morte direta de microrganismos, mas também na neutralização de lipopolissacarídeo, imunomodulação, reparação de feridas, indução de apoptose e angiogênese (VILCINSKAS, 2015).

Mecanismos primitivos de defesa inata, sob a forma de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, são agora considerados como candidatos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias. PAMs são improváveis de induzir resistência, por atuarem de modo relativamente inespecífico. Portanto, estes amplificadores conservados, têm um grande potencial na terapia antibiótica (LOHAN *et al.*, 2014; WAGHU, 2014).

O aumento de microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos utilizados atualmente tem estimulado a busca por alternativa antimicrobiana proveniente de fontes naturais. Os PAMs apresentam facilidade e velocidade de síntese, além de ampla especificidade contra células procariotas e ausência de toxicidade para o hospedeiro eucarioto. Assim, eles fornecem uma maneira de restringir rapidamente o crescimento bacteriano durante a infecção aguda, e facilitam os meios de prevenção da colonização por bactérias oportunistas (SCHNAPP *et al.*, 1996; TAVARES *et al.*, 2008).

Combinações multidrogas são por vezes utilizadas para o tratamento de infecções bacterianas de rotina. Assim, é razoável propor uma terapia de combinação utilizando os PAMs e antibióticos químicos, porque o mecanismo de ação dos peptídeos, de permeabilização da membrana, é totalmente diferente dos antibióticos convencionais. Foi proposto na literatura que os PAMs podem apresentar sinergia com antibióticos

aumentando a permeabilidade das membranas bacterianas. Também tem sido sugerido que os peptídeos antimicrobianos podem aumentar a atividade das hidrolases bacterianas ou outras enzimas, que diminuem a integridade da camada de peptidoglicano, permitindo que os antibióticos que afetam a síntese da parede celular (por exemplo, β -lactâmicos) possam agir mais eficientemente (TIPPER e STROMINGER, 2008).

Muitos peptídeos antimicrobianos exibem atividade contra bactérias, leveduras e fungos, e até mesmo alguns vírus envelopados e protozoários. Outros peptídeos são mais limitados quanto ao seu espectro de ação, até mesmo pequenas variações na estrutura peptídica podem influenciar a atividade, e uma compreensão sistemática da relação entre estrutura e atividade do peptídeo é uma área importante para futuras investigações (GANZ, 2003).

A expressão destes PAMs pode ser constitutiva ou induzível, no segundo caso, devido a estímulos infecciosos e/ou inflamatórios, tais como citocinas, bactérias, ou de moléculas que induzem a imunidade inata, como, por exemplo, lipopolissacarídeos (LPS) (JENSSEN *et al.* 2006).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) possuem massa molecular de pequeno tamanho. A interação entre os PAMs e os microrganismos invasores, é devido às cargas positivas dos resíduos de aminoácidos e as cargas negativas dos fosfolipídios que constituem a membrana dos microrganismos, além disso, a inserção na membrana também é facilitada devido à presença de resíduos hidrofóbicos nos PAMs. Os genes dos PAMs são transcritos no corpo gorduroso, e nos insetos, a transcrição é ativada algumas horas após a infecção (FUKUZAWA, 2007).

O mecanismo de ação dessas moléculas manifesta-se geralmente por uma atividade detergente sobre as membranas dos microrganismos (Figura 5A) ou pela formação de poros (Figura 5B), ou ainda pela interferência na síntese de macromoléculas importantes no seu metabolismo (ROSA, 2007).

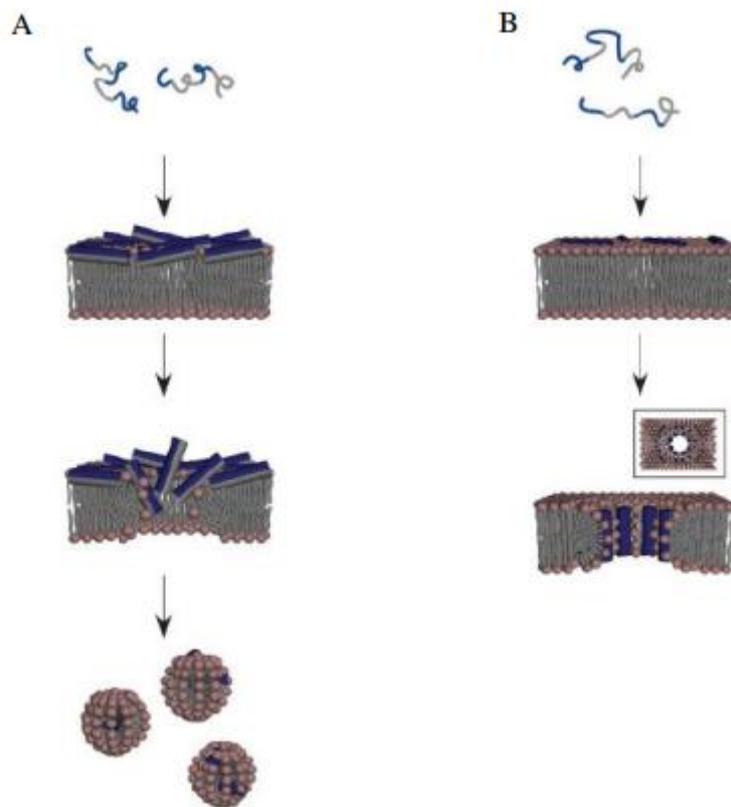


Figura 5 Representação esquemática de alguns mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos (PAMs). (A) Atividade detergente ou (B) formação de poros nas membranas dos microrganismos (adaptado de TOKE, 2005).

3.5 Peptídeos antimicrobianos em insetos

Peptídeos de defesa são fatores-chave na imunidade inata contra bactérias e fungos em vertebrados, bem como em invertebrados. Particularmente, em insetos que carecem de um sistema imunológico adaptativo, PAMs desempenham um papel crucial na luta contra patógenos invasores (CYTRYNSKA, 2007; LEE, 2004).

A literatura sobre a presença de PAMs e polipeptídios na luta contra microrganismos em invertebrados, em particular, insetos, é extensa. Estes componentes humorais, conhecidos como atacinas, cecropinas, defensinas, drosomicinas, tanatinas, etc., diferem em suas atividades específicas (MANDRIOLI, 2003).

Diversos PAMs foram descobertos em insetos e em *Drosophila melanogaster*, os mecanismos de sinalização, que induzem a expressão, são melhores compreendidos. Embora *D. melanogaster* seja hoje o melhor organismo conhecido entre os insetos com imunidade inata caracterizada, o primeiro peptídeo antimicrobiano induzível em insetos, cecropina, foi isolado e caracterizado de pupas de traça gigante *Hyalophora cecropia*

desafiadas com bactérias, (STEINER *et al.*, 1981). Desde então, peptídeos com atividade antimicrobiana foram purificados e descritos em muitas outras espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens: Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Himenóptera, Hemíptera, Trichóptera e Odonata (CYTRYNSKA *et al.*, 2007).

Os PAMs são sintetizados no corpo gorduroso visceral da larva, em particular na larva em instar final, antes de se tornar pupa, e são transportados para o sistema circulatório aberto, a hemolinfa, por endocitose mediada por receptor para atingir os seus respectivos tecidos, de uma forma dependente do tempo, durante o desenvolvimento pós-embrionário e a metamorfose. As proteínas antimicrobianas aumentam simultaneamente com o desaparecimento de hormônio juvenil na hemolinfa e são sintetizadas em ambos os sexos (PAKKIANATHAN, 2012).

Cerca de 200 destes peptídeos foram identificados a partir de insetos. Diversos estudos de sequenciamento de genomas têm promovido aplicação de abordagens computacionais para a descoberta de elementos envolvidos na imunidade inata de insetos. Alguns exemplos incluem *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum* e *Bombyx mori* (TIAN *et al.*, 2010)

O isolamento e caracterização desses peptídeos têm despertado um interesse considerável, principalmente devido ao aparecimento de numerosas cepas de microrganismos que são resistentes aos antibióticos tradicionais (CARLIER *et al.*, 2014).

3.6 Coexistência de Insetos e Microrganismos

Espécies como *Bacillus subtilis* (bactéria Gram-positiva) e *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) já foram isoladas de baratas *Blattella germanica* (TUMITAN e SILVA, 2015). E para conseguirem conviver em um mesmo ambiente é necessário que os insetos produzam substâncias capazes de realizar a defesa contra esses microrganismos, por exemplo o *Bacillus subtilis*, na hemolinfa de insetos, apresenta efeito ativador de proteínas responsáveis pelo sistema imunológico de diferentes espécies (SANTOS, 2012).

Além disso, o sistema imune inato dos insetos promove um ataque aos microrganismos através de mecanismos como reconhecimento dos não-próprios, mudança na circulação dos hemócitos, antígenos de adesão de hemócitos, atividade de enzimas e síntese de peptídeos antimicrobianos pelo corpo gorduroso (SILVA, 2002).

Pesquisas relatam a presença de microrganismos endossimbiontes em larvas de Díptera, e algumas espécies podem contribuir como fonte natural para a seleção de potenciais produtores de substâncias de interesse econômico, inclusive contra microrganismos patogênicos aos humanos e utilizados em controle biológico de insetos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Bacillus sphaericus* (PONTES, 2010).

Sobretudo, a *D. sacharalis* está em constante contato, em seu ambiente natural, com microrganismos, todavia o inseto tem sua sobrevivência garantida mesmo na presença destes, indicando a presença de um sistema imunológico eficiente que possibilita esta convivência.

3.7 A problemática de resistência aos antimicrobianos

A descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, abriu o caminho para o estudo da nova geração de agentes antimicrobianos. Atualmente, os antibióticos são fabricados em uma escala estimada de cerca de 100 mil toneladas por ano em todo o mundo. Por outro lado, as bactérias têm o potencial para desenvolver resistência contra os antibióticos, capacidade esta que é geneticamente codificada, utilizando-se de diferentes estratégias. Novos métodos são, portanto, necessários para identificar e desenvolver a próxima geração de drogas ou agentes para controlar infecções bacterianas (CHAKRABORTI *et al.*, 2014).

A resistência acontece através de dois grandes mecanismos: mutação num loci do cromossoma ou transferência horizontal de genes, isto é, por aquisição de genes de resistência anteriormente presentes em outros microrganismos. Os genes responsáveis pela resistência contidos em plasmídeos, normalmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células. Para desenvolver a resistência aos antibióticos, é necessário combinar dois elementos principais: a presença de um antibiótico capaz de inibir a maioria das bactérias presentes em uma colônia e uma colônia de bactérias heterogênea, onde ao menos uma destas bactérias transporta o determinante genético capaz de expressar a resistência ao antibiótico (ALANIS, 2005).

O uso excessivo de antibióticos nos hospitais, comunidades e produção animal, e a utilização inadequada de antibióticos para infecções que não são comprovadas como

bacterianas, como por exemplo, resfriados e outras infecções virais, levaram a altos níveis de resistência aos antibióticos. Este fenômeno representa uma ameaça constante para a saúde pública, e, portanto, requer uma investigação contínua sobre os agentes novos como PAMs. Estes elementos do sistema imune são conservados na sua estrutura, função e modo de ação, o que os torna bons candidatos para a próxima geração de antibióticos (SIDRACH-CARDONA *et al.*, 2014; TRINDADE *et al.*, 2015; MARSHALL e LEVY, 2011).

Muitos microrganismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional, quanto contra os antibióticos de última geração, causando graves problemas de saúde pública e consideráveis prejuízos econômicos. O impacto da crescente resistência de microrganismos a medicamentos e a substâncias específicas tem movimentado vários grupos de pesquisa, assim como a indústria farmacêutica, para desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de lidar efetivamente com as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram (PRATES e BLOCH JÚNIOR, 2000).

3.8 Busca por novos antibióticos

Os antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de microrganismos. São classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Entre os anos 1940-1960, vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram-positivas. Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado. Nas décadas de 1960-1980, foram introduzidos no mercado antibióticos semi-sintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, análogos aos antibióticos naturais já existentes. Já entre os anos 1980-2000, as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana.

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipodepsipeptídeo natural Daptomicina pelo FDA em 2003. Os principais mecanismos de ação antibiótica dos agentes terapêuticos em uso clínico estão listados no Quadro 2 (OLIVEIRA, 2010).

Quadro 2 Antibióticos em uso clínico, alvo no microrganismo patogênico e mecanismo de ação para atividade antimicrobiana

| Antibióticos | Alvo | Mecanismo de ação |
|--|--|--|
| β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas) | Enzima transpeptidase | Inibição de formação de ligação cruzada entre cadeias de peptideoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana |
| β -lactâmicos (oxapeninas, sulfoxapeninas) | Enzima β -lactamase | Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β -lactâmicos |
| Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas (dalfopristina e quinupristina), cloranfenicol, oxazolidinoas (linezolida) | Subunidade 50S ribossômica | Inibição da síntese protéica bacteriana |
| Aminoglicosídeos (vancomicina, teicoplanina) | Subunidade 30S ribossômica | Inibição da síntese protéica bacteriana |
| Aminoglicosídeos, tetraciclina | Subunidade 30S ribossômica | Inibição da síntese protéica bacteriana |
| Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina) | Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptideoglicano | Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana |
| Peptídeos não ribossomais (bacitracina, gramicidina C, polimixina b) | Membrana plasmática | Afeta permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana |
| Lipodepsipeptídeos (daptomicina) | Membrana plasmática | Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram-positivas |
| Rifampicina | RNA polimerase dependente de DNA | Inibição da síntese de RNA |
| Floroquinolonas | Enzima DNA girase | Bloqueio da replicação e reparo do DNA |
| Sulfonamidas | Enzima di-hidropteroato sintetase | Bloqueio da formação de co-fatores de ácido fólico, importantes para a síntese de ácidos nucleicos |

Fonte: Quadro reproduzido de OLIVEIRA, 2010.

A maneira mais comum de classificar os antibióticos é de acordo com o modo de ação contra o organismo infectante, mas existem outras formas como, por exemplo, de acordo com sua estrutura química e quanto ao espectro de ação, que pode ser largo

(compostos ativos contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas), baixo (compostos efetivos contra um grupo restrito de bactérias) e intermediário (substâncias com atividade contra algumas espécies bacterianas Gram-negativas) o que dependerá da espécie bacteriana os quais estes são ativos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

3.9 Ferramentas proteômicas

O conjunto de proteínas codificadas pelo genoma de um organismo em um determinado estado fisiológico é definido como proteoma. O proteoma não é apenas a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas incluem também proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas. Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o estado fisiológico e as fases da diferenciação celular. O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto dessas moléculas, que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (BARBOSA *et al.*, 2012).

Dessa forma, a proteômica compreende, basicamente, um conjunto de ferramentas que permite visualizar alterações das proteínas. A história dos estudos proteômicos começou há muitos anos atrás, com um protocolo básico de eletroforese bidimensional (2-DE), descrito por O'Farrell (1975), sendo até hoje utilizado. Este procedimento tornou-se a base tecnológica para visualizar a mudança global de expressão de proteínas pela análise proteômica, permitindo alta resolução e reprodutibilidade (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Em um dos processos do protocolo da 2-DE, as proteínas são separadas em duas etapas consecutivas. Na primeira etapa, denominada focalização isoeletrica (IEF), as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga é igual a zero (ponto isoeletrico ou pI). Na segunda etapa, as proteínas são submetidas a uma eletroforese com direção perpendicular à IEF em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e então separadas de acordo com sua massa molecular. Para tornar visíveis as bandas ou *spots* proteicos, os géis são corados com Azul de Coomassie, nitrato de prata ou outros corantes comerciais. No caso de géis 2-DE, podem ser visualizados de 100 a 2.000 pontos (*spots*), cada um contendo uma ou algumas proteínas. Após digitalização das imagens dos géis e com a utilização de ferramentas de

informática, os *spots* são comparados e os dados normalizados e analisados estatisticamente para quantificação de volumes proteicos ou intensidades (BARBOSA *et al.*, 2012).

Usualmente, a técnica 2-DE é combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massa (MS). Apesar da promissora tecnologia alternativa/complementar (identificação de proteínas multidimensional, rotulagem do isótopo estável, matrizes de proteína) que surgiram recentemente, 2-DE é uma tecnologia que pode ser rotineiramente aplicada para perfil de expressão quantitativa de grandes conjuntos de mistura de proteínas complexas (GÖRG *et al.*, 2005).

Estimulado pelo advento dos métodos de ionização, a espectrometria de massa tornou-se o método central para análise de proteínas. Desde então, a profundidade e a velocidade que um proteoma pode ser caracterizado tem melhorado, de modo que hoje, a análise abrangente da maioria dos proteomas está mais acessível (RICHARDS *et al.*, 2015). Assim, devido à melhoria no desempenho da espectrometria de massas tornou possível alcançar a cobertura total do proteoma (DING, *et al.* 2013).

A identificação de uma proteína por espectrometria de massa do tipo Maldi/ToF/ToF (*time of flight*), indica uma determinação exata da massa do composto avaliado. Em certos casos, o conhecimento da massa exata de uma proteína, em comparação com a sua massa teórica calculada a partir da sequência, é uma informação suficiente para confirmar se a molécula observada é a esperada. Um segundo passo consiste em realizar uma digestão proteolítica específica de uma proteína isolada, para gerar um conjunto de peptídeos clivados, que pode ser utilizado para pesquisar em bases de dados (CHAURAND *et al.*, 1999).

No Maldi-ToF/ToF, pequenos fragmentos ou peptídeos são cristalizados dentro de uma matriz sólida, a qual é bombardeada com um laser para ionizar os peptídeos com apenas uma carga positiva, estes então são separados pela metodologia de tempo de voo, onde partículas menores passam através de um tubo de voo mais rápido do que as partículas grandes e com maior carga, gerando um espectro de picos massa/carga (DAVIS e HANASH, 2006). As proteínas são analisadas e, teoricamente, identificadas com base nas semelhanças estatísticas com proteínas de um banco de dados submetidas à hidrólise teórica (AZAD *et al.*, 2006).

Outra abordagem utilizada foi a Espectrometria de massa em Tandem (MS/MS), onde o íon analito de interesse, um íon de um peptídeo parental obtido no primeiro

processo, com a massa mensurada, é especificamente selecionado e fragmentado no espectrômetro de massas gerando informações estruturais. A fragmentação é gerada por dissociação induzida por colisão no espectrômetro de massa. A técnica é realizada com instrumentos capazes de selecionar íons de uma massa/carga particular e sujeitá-lo a esta fragmentação e os fragmentos têm sua massa/carga determinada no MS com o espectrômetro de massas (WESTERMEIER e NAVEN, 2002)

O objetivo maior na era pós-genoma, é entender como a compressão dos elementos funcionais codificada por um genoma pode ser utilizada para permitir a um organismo se desenvolver e adaptar-se a vida sob diferentes condições. Tecnologias transcriptômicas e proteômicas fornecem informações importantes para este conhecimento (SCHWANHAUSSER *et al.*, 2011).

O estudo transcriptômico e proteômico resultou na identificação de um grande número de PAMs, entre os quais estão: gloverinas, atacinas, cecropinas, defensinas, lisozimas e várias proteínas de reconhecimento de padrões (CELORIO-MANCERA *et al.*, 2011).

4.0 Abordagens proteômicas aplicadas ao estudo da imunidade em insetos

Em comparação com os genomas e proteomas de microrganismos e de mamíferos, os dos invertebrados ainda são pouco investigados. A maioria dos estudos é de bactérias, fungos ou mamíferos. Algumas tentativas têm sido feitas para aplicar esta técnica proteômica a invertebrados, incluindo insetos. Estudos moleculares, incluindo alguns que utilizam 2-DE, têm investigado proteínas ou peptídeos induzidos em insetos devido a alguns tipos de infecção (STADLER e HALES, 2002).

Além disso, a proteômica fornece informações funcionais únicas, como por exemplo, sobre alterações fisiológicas a nível celular. Desta forma, alguns pesquisadores aplicam essa técnica para estudar a adaptação do inseto e da resposta imune, quando há infecção por microrganismos.

Vários estudos envolveram o uso da proteômica para investigar as mudanças na hemolinfa de um inseto causadas por um parasitóide. No trabalho realizado por Zhu *et al* (2008), investigou-se as alterações fisiológicas das proteínas de *Papilio xunthus* (Lepidoptera: Papilionidae), causadas por envenenamento pela vespa endoparasítica

Pteromalus puparum (Hymenoptera: Pteromalidae). Visto que os primeiros estudos já revelavam que o veneno pode inibir resposta celular imune, deprimir a capacidade metabólica, interromper o desenvolvimento, e, finalmente, matar seu hospedeiro *Papilio xuthus*.

A 2-DE combinada com o Maldi-ToF/ToF tem sido utilizado para explorar o proteoma da hemolinfa. No estudo elaborado por Zhang *et al.* (2014) o proteoma da hemolinfa de *Bombyx mori* foi identificado utilizando Maldi e cromatografia líquida (LC-MS/MS). Várias e abundantes proteínas de armazenamento de nutrientes e proteínas relacionadas com a imunidade foram analisadas, melhorando a compreensão fisiológica e funcional da hemolinfa desta lepidóptera.

Silva *et al* (2010) reportaram a presença de uma proteína semelhante à Gloverina na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* desafiadas septicamente.

As análises de genomas e proteomas de insetos proporcionam também uma oportunidade única de comparar a evolução entre os organismos. Os insetos cujos genomas foram sequenciados asseguram a cobertura de uma valiosa amplitude filogenética entre eles (YANAY *et al.*,2008).

ARTIGO

**PERFIL PROTEÔMICO DA HEMOLINFA E DETECÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS INDUZIDOS EM RESPOSTA AO DESAFIO MICROBIANO EM
*Diatraea saccharalis***

Iara Fernanda ROCHA¹, José Luis da Conceição SILVA.
iaraf_rocha@hotmail.com

RESUMO

Os insetos possuem um sistema imunológico inato bastante eficiente, que os provem com respostas celulares e humorais contra microrganismos. No presente trabalho, o objetivo foi identificar proteínas na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* em 5^o instar desafiadas com *Escherichia coli* (ATCC 11224) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), proteínas estas que sejam diferencialmente expressas e que apresentem atividade antimicrobiana, e verificar esta atividade em placa por meio da inibição do crescimento microbiano. O gel de eletroforese bidimensional (2-DE) das proteínas extraídas da amostra controle e desafiadas com *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* apresentou em média 300 spots de proteína, e 92 destes spots eram correspondentes nos géis nas três condições. Foram excisados 41 spots proteicos de géis 2-DE, e analisados por espectrometria de massas do tipo Maldi-ToF/ToF. Nesta análise, foi possível identificar 10 proteínas, entre elas, estão peptídeos antimicrobianos como a proteína homóloga à β -defensina, proteína homóloga à Atacina, proteína homóloga à Turandot A, Proteína homóloga de Reconhecimento de Peptideoglicano e a proteína homóloga à imunossupressora Ciclofilina. Entre as 10 proteínas, nove estavam presentes nas situações nativa, desafio com *E. coli* e com *B. subtilis*, e apenas uma, a β -defensina, estava presente somente na condição de infecção por *B. subtilis*. A atividade antimicrobiana em placa foi verificada apenas no ensaio da zona de inibição do crescimento microbiano de *B. subtilis* utilizando o extrato da hemolinfa das lagartas desafiadas com *B. subtilis*. Este é o primeiro perfil proteômico da hemolinfa da *D. Saccharalis* desafiada com bactérias, no qual foram identificadas a presença de importantes proteínas relacionadas à resposta imunológica.

Palavras-chave: proteoma, hemolinfa, *Diatraea saccharalis*, peptídeo antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um enorme progresso no conhecimento sobre a defesa imunológica dos insetos, devido à biodiversidade desses organismos, eles têm proporcionado modelos de estudo importantes para estratégias antimicrobianas, já que estas podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de metodologias de controle de patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Apesar dos insetos não terem um sistema imunológico adaptativo, eles têm um sistema imune inato para defenderem-se das infecções. A defesa inata de insetos consiste de barreiras estruturais e passivas, bem como reações relacionadas

principalmente à imunidade celular e à imunidade humoral, produzindo, em alguns casos, inclusive peptídeos com atividade antibiótica (NETEA *et al.* 2011).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são os efetores da resposta humoral e desempenham um papel significativo no sistema de defesa de plantas, insetos, anfíbios, artrópodes e mamíferos. Além disso, o envolvimento de PAMs na regulação de alguns processos imunológicos e inflamatórios, os tornam possíveis candidatos como imunoestimulantes ou adjuvantes de vacinas (MELONI *et al.*, 2015).

Os insetos tem atraído a atenção de pesquisadores, por serem uma importante fonte de PAMs, servindo como modelo para compreensão da biologia básica do sistema imunológico e para o planejamento de fármacos anti-infecciosos. Aproximadamente 200 do PAMs foram identificados a partir de insetos, alguns exemplos incluem *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum* e *Bombyx mori* e inclusive, insetos praga como *Manduca sexta* (TIAN *et al.*, 2010).

Os estudos proteômicos em insetos da ordem Lepidoptera voltados para a identificação de PAMs, ainda são poucos e limitados a algumas espécies, apesar de serem fundamentais para a descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana. Em comparação com os genomas e proteomas de microrganismos e de mamíferos, os dos invertebrados ainda são pouco investigados. Nos últimos anos, estudos proteômicos, têm investigado proteínas ou peptídeos induzidos por alterações em insetos devido a algum tipo de infecção, lesão ou parasitismo (STADLER e HALES, 2002).

Alguns exemplos de estudos utilizando ferramentas proteômicas foram reportados por Zhu *et al* (2008), em que verificou-se as alterações fisiológicas das proteínas da hemolinfa do *Papilio xunthus* (Lepidoptera: Papilionidae), causadas por envenenamento pela vespa endoparasítica *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae); Zhang *et al.* (2014) onde identificou-se no proteoma da hemolinfa de *Bombyx mori* várias e abundantes proteínas de armazenamento de nutrientes e proteínas relacionadas com a imunidade; e ainda Silva *et al* (2010), em que reportou-se presença de uma proteína semelhante a Gloverina na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* desafiadas septicamente.

Neste estudo, aplicamos as ferramentas de análises proteômicas para a identificação das proteínas presentes na hemolinfa da larva, na fase final do desenvolvimento, em 5º ínstar, antecedente à fase de pupa. As larvas foram desafiadas

com microrganismos (Gram-positivos e Gram-negativos) com o objetivo de induzir a produção de PAMs, potenciais candidatos a antibióticos. Em adição, os extratos brutos proteicos obtidos foram testados quanto à atividade antimicrobiana em placa através do ensaio de zona de inibição do crescimento bacteriano. Este trabalho apresenta o perfil proteômico da hemolinfa da *D. saccharalis*, no qual foi possível identificar a presença de algumas importantes proteínas da hemolinfa e de proteínas envolvidas na resposta imunológica desta importante praga agrícola.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção da cultura de *D. saccharalis* e coleta da amostra da hemolinfa não desafiada

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 5^o ínstar, as larvas foram retiradas dos tubos de dieta, em fluxo laminar, e higienizadas com álcool 70%. A hemolinfa das larvas não desafiadas foi coletada e transferida para um microtubo imerso em gelo, contendo cristais de Feniltiouréia (Sigma), para evitar, respectivamente, a melanização e a ação das proteases. Centrifugou-se a hemolinfa em 300g (4 °C por 10 minutos) para separar os constituintes celulares e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C até o uso.

Desafio imunológico das larvas com *E. coli* e *B. subtilis*.

As larvas foram desafiadas com os microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), conforme as metodologias descritas por CYTRINSKA *et al.*, 2007 e Silva *et al.*, 2010, utilizando-se microaplicador de precisão (Burkard-PAX 100-3). Preparou-se o inóculo de bactérias em meio Luria Bertani (LB), e após crescimento *overnight* (14-16 horas a 37° C), o meio foi centrifugado (800 g por 10 minutos) e o precipitado foi lavado com tampão fosfato-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 que fosse injetada uma quantidade conhecida de microrganismos. A concentração de *E. coli* foi de $1,198 \times 10^6$ células/ μ L e de *B. subtilis* foi de $1,190 \times 10^6$ células/ μ L. Injetou-se 3 μ L/larva da suspensão de *E. coli* em um grupo de larvas e, de *B. subtilis* em outro grupo, sendo que cada grupo continha 50 larvas. A

hemolinfa foi coletada após 10 horas de infecção, segundo o procedimento descrito por Zhang *et al.*, (2013) com algumas modificações. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C , até o uso para extração de proteínas.

Obtenção e dosagem das proteínas da hemolinfa

As amostras foram centrifugadas em microtubos com microfiltro (Microcon-Millipore, YM-3, NMWL 3000 Da) durante 100 minutos em $14000g$ a 4°C , e os peptídeos superiores a 3000 Da foram recuperados na fração retida no microfiltro. As proteínas totais presentes na fração retida foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976) modificado.

Focalização isoeletrica (IEF) das proteínas extraídas

As amostras previamente quantificadas foram separadas por focalização isoeletrica em um sistema de focalização isoeletrica IPGphor (Amersham Biosciences). Cerca de $500\ \mu\text{g}$ de proteínas totais extraídas foram aplicadas em tiras de gradientes de pH imobilizados (Immobiline drystrips, pH 3-10, GE Healthcare) para a focalização. O programa utilizado na focalização isoeletrica ocorreu em temperatura de 20°C e corrente de $0,05\ \text{mA}$ por tira de IPG. A voltagem total acumulada foi de 24800 volts.

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 isoeletrico (pI) passaram por etapas de redução e alquilação das proteínas, acondicionamento em solução de equilíbrio (Tris-HCl $7,5\ \text{mM}$ pH 8.8, Ureia $6\ \text{M}$, Glicerol $29,3\ \%$, SDS 2% e traços de azul de bromofenol). Na primeira etapa, as fitas foram mantidas na solução de equilíbrio adicionada de 1% de ditioneitol (DDT) por 30 minutos para a redução dos grupamentos tiólicos das proteínas. Em seguida, as tiras foram mantidas na solução de equilíbrio adicionada de $2,5\ \%$ de iodoacetamida (IAA) por 30 minutos para a alquilação e estabilização dos grupos tiol das proteínas e eliminação do DDT residual. As tiras foram transferidas para o sistema de eletroforese (Ruby-Amershan), para a realização da 2-DE em SDS-PAGE 15% . Estas análises seguiram a metodologia descrita por Zhou *et al.* (2008).

Foi feito um gel para cada amostra de hemolinfa coletada das lagartas. A eletroforese foi realizada por 4,5 horas (programação de 600 volts para entrada no gel, com corrente de $8\ \text{mA/gel}$ durante 30 minutos, e fase 2 de 600 volts, $30\ \text{mA/gel}$ durante 4

horas). 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, os mesmos foram escaneados no Image Scaneer Amersham e os *spots* proteicos expressos foram identificados com o software ImageMaster 2-DE Platinum 6.0. A análise incluía detecção automática de *spots*, seguida por designação manual dos *spots* como pontos de referência para o alinhamento do gel. Um gel mestre resumindo os *spots* que foram detectados em todos os géis foi construído e os *spots* de proteína 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/ToF

As amostras digeridas com tripsina foram analisadas utilizando o equipamento híbrido MALDI-ToF/ToF-MS/MS (BruckerDaltonics) modelo autoflex II. O programa de computador utilizado foi o FlexControl 2.0. Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0.

Identificação das Proteínas

Os espectros de massa ou *Peptides Mass Fingerprint* (PMF) e os espectros MS-MS dos íons obtidos das amostras foram analisados com a interface MASCOT (Matrix Science) - <http://www.matrixscience.com> - associado ao uso de banco de dados para Metazoa ou *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. Outra abordagem empregada foi a busca dos peptídeos gerados no Mascot contra base de dados de proteínas do NCBI (National Center Biotechnology Information) com o software Blast p - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> - restringindo a busca para proteínas da ordem Lepidóptera. Algumas proteínas foram identificadas utilizando o software <http://web.expasy.org/tagident/> do site <http://www.expasy.org/> por meio da

similaridade de ponto isoelétrico e peso molecular de proteínas presentes nas bases de dados.

Ensaio da zona de inibição do crescimento bacteriano

A suspensão de bactérias (2×10^8 CFU/mL) de *Escherichia coli* (ATCC11229), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Staphylococcus haemolyticus* e *Klebsiella pneumoneae* (isoladas de amostra clínica do Hospital Universitário, gentilmente cedidas pela Dr^a Nereida Mello da Rosa Gioppo) foram primeiramente crescidas em meio caldo triptona de soja (Kasvi) a 37 °C, e semeadas em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton (Kasvi). As amostras concentradas de hemolinfa da *D. saccharalis* nativa, desafiada com *B. subtilis* e com *E. coli*, todas na concentração de 10 µg/µL foram aplicadas em discos de papel estéreis, totalizando 100 µg/disco. Os discos foram colocados nas placas semeadas com as bactérias e o disco com antibiótico Gentamicina (10 µg/disco) foi utilizado como controle. A zona de inibição foi avaliada após 24 horas de incubação a 37°C, seguindo o protocolo descrito por Hultmark *et al* (1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil proteômico da hemolinfa de *D. saccharalis*

Os géis de amostra nativa, desafiada por *E. coli* e *B. subtilis* apresentaram, cada um, cerca de 300 *spots* de proteína. Entre eles, 92 *spots* protéicos foram encontrados simultaneamente nos três géis. Os *spots* mais intensos de cada gel foram excisados, em um total de 41 *spots* dos três géis, nestes, 10 proteínas foram identificadas e, apenas uma não estava presente nos três géis simultaneamente, a proteína representada pelo spot 7 (sete) que foi induzida somente na condição de desafio por *B. subtilis*, as demais foram encontradas em todos os géis, embora apresentassem diferentes intensidades de coloração (Figura 1).

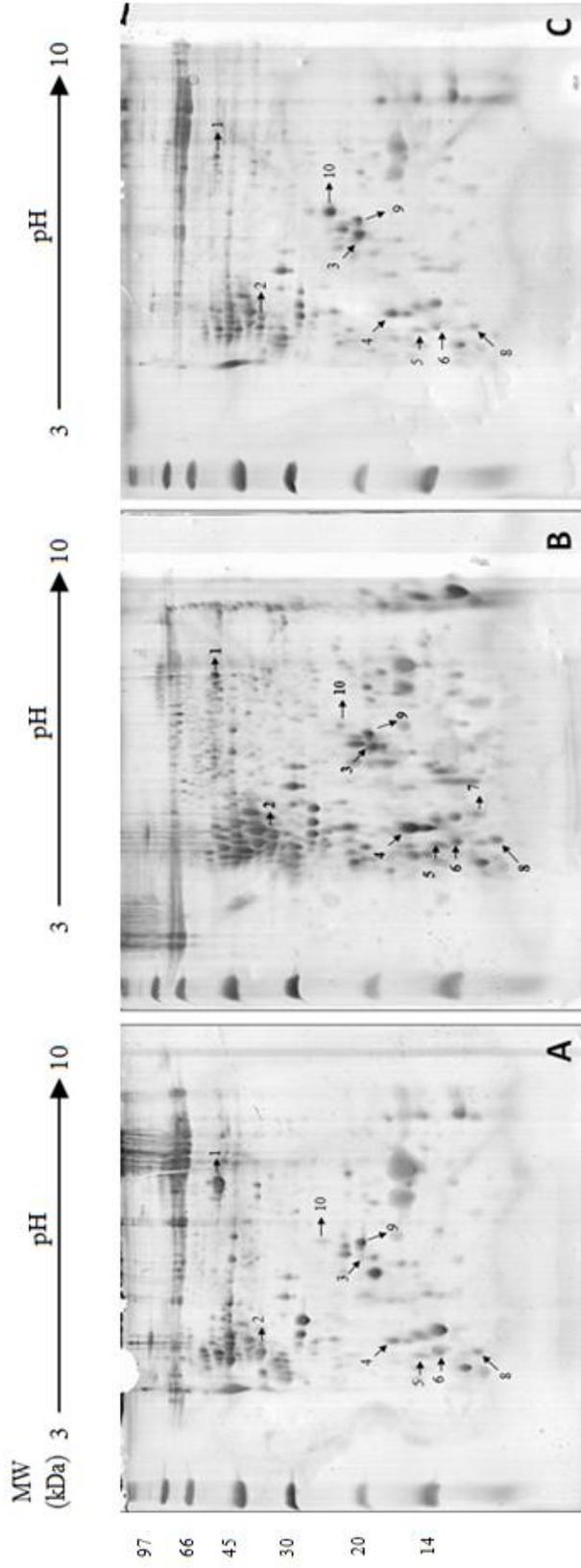


Figura 2 (A) Proteínas identificadas por Maldi/ToF-ToF. Gel bidimensional de proteínas expressas na hemolinfa de lagartas controle de *D. saccharalis*. Gel (B) infectadas com *B. subtilis* e (C) com *E. coli*.

A expressão de algumas proteínas foi regulada positivamente e em outras negativamente ao comparar a hemolinfa das lagartas controle e das desafiadas com *B. subtilis* e *E. coli* (Tabela 1).

Tabela 1 Proteínas expressas na hemolinfa da larva da *D. saccharalis* desafiada com *B. subtilis* e *E. coli* identificadas por Malid-ToF-ToF (diferença de expressão de pelo menos 1,5 vezes).

| Nº. do spot | ¹ Diferença de expressão | Ponto Isoelétrico (pI) | Massa Molecular (MM) | Proteína Identificada | Espécie de origem | Modo de Identificação |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Desafio com <i>B. subtilis</i> | | | | | | |
| Proteínas reguladas negativamente | | | | | | |
| 1 | 2.24 | 7.91 | 49 | Quitinase-like | <i>Bombyx mori</i> | MS-MS |
| 6 | 1.09 | 5.08 | 13 | Turandot A-like | <i>Drosophila melanogaster</i> | PMF |
| 9 | 1.50 | 6.49 | 20 | Ciclofilina | <i>Bombyx mori</i> | PMF |
| Proteínas reguladas positivamente | | | | | | |
| 2 | 1.46 | 5.17 | 33 | Hipotética KGM 12068 | <i>Danaus plexippus</i> | MS-MS |
| 3 | 2.79 | 6.86 | 19 | Reconhecimento de peptideoglicano | <i>Ostrinia furnacalis</i> | MM e pI |
| 4 | 3.67 | 5.34 | 16 | Glicosil-hidrolase | <i>Fernaldella fimetaria</i> | MS-MS |
| 5 | 1.36 | 5.02 | 14 | Não caracterizada | <i>Plutella xylostella</i> | PMF |
| 7 | 1000000 | 5.61 | 12 | β-defensina-like | <i>Chrysolophus pictus</i> | PMF |
| 8 | 1.24 | 5.12 | 11 | Precursora de eclosão | <i>Ostrinia furnacalis</i> | PMF |
| 10 | 1.95 | 6.90 | 23 | Atacina-like | <i>Antheraea pernyi</i> | MM e PI |
| Desafio com <i>E. coli</i> | | | | | | |
| Proteínas reguladas negativamente | | | | | | |
| 1 | 31.55 | 7.91 | 49 | Quitinase-like | <i>Bombyx mori</i> | MS-MS |
| Proteínas reguladas positivamente | | | | | | |
| 2 | 1.91 | 5.17 | 33 | Hipotética KGM 12068 | <i>Danaus plexippus</i> | MS-MS |
| 3 | 25.49 | 6.86 | 19 | Reconhecimento de peptideoglicano | <i>Ostrinia furnacalis</i> | MM e pI |
| 4 | 2,63 | 5.34 | 16 | Glicosil Hidrolase | <i>Fernaldella fimetaria</i> | MS-MS |
| 5 | 1.29 | 5.02 | 14 | Não caracterizada | <i>Plutella xylostella</i> | PMF |
| 6 | 1.10 | 5.08 | 13 | Turandot A-like | <i>Drosophila melanogaster</i> | PMF |
| 8 | 1.26 | 5.12 | 11 | Precursora de eclosão | <i>Ostrinia furnacalis</i> | PMF |
| 9 | 1.14 | 6.49 | 20 | Ciclofilina | <i>Bombyx mori</i> | PMF |
| 10 | 18.94 | 6.90 | 23 | Atacina-like | <i>Antheraea pernyi</i> | MM e pI |

¹Mudança na expressão entre larvas desafiadas e larvas controle.

Proteínas diferencialmente expressas nas condições de desafio séptico

A expressão da proteína semelhante à quitinase (1) diminuiu após o desafio imunológico das lagartas tanto com *E. coli* quanto *B. subtilis*. Quitinase é uma importante enzima responsável pela degradação da quitina que constitui em torno de 25 a 40 % da cutícula de insetos. Além disso, a quitina possui atividade antimicrobiana e colabora com a coagulação e cicatrização, porém, para que a quitina seja produzida é necessário que a expressão de quitinase seja diminuída, o que justifica a regulação de expressão desta enzima neste caso (SILVA *et al.*; 2006).

A proteína de reconhecimento de peptidoglicano (3) teve sua expressão aumentada tanto pela infecção por *B. subtilis* quanto por *E. coli*. O peptidoglicano é um heteropolímero constituinte da parede celular das bactérias e as proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (PRP) pertencem a família de proteínas antibacterianas da imunidade inata e podem matar tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas e, por isso, houve este aumento de expressão da mesma após o desafio séptico (SILVEIRA *et al.*, 2006, KASHYAP *et al.*, 2014).

A expressão da proteína glicosil hidrolase (4), aumentou na infecção com ambas as bactérias utilizadas no experimento, esta proteína pertence a um grupo de enzimas que estão envolvidas na degradação de polímeros de plantas e são produzidas por diversos organismos procariotos e eucariotos (FERRER *et al.*, 2012) e está presente na hemolinfa devido ao fato de ser necessária, durante a fase larval, nas lagartas que se alimentam de plantas, auxiliando na degradação destas (AERTGEERTS *et al.*, 2004).

A proteína homóloga à Atacina-like 9 foi regulada positivamente tanto na infecção com *E. coli* quanto com *B. subtilis*, entretanto, a expressão foi maior na hemolinfa das larvas induzidas com *E. coli*. Atacinas são proteínas antimicrobianas produzidas em resposta a uma infecção bacteriana, elas atuam ao anexarem-se aos lipopolissacarídeo (LPS) presentes nas membranas das bactérias, principalmente as Gram-negativas, e enviam um sinal para interromper a transcrição de proteínas de membrana externa e assim, conseguem combater a infecção (MONDAL *et al.*, 2011).

A proteína homóloga à β -defensina (7) foi expressa somente no gel da hemolinfa de lagartas infectadas com *B. subtilis*. De acordo com Teixeira (2012) estudos de perfil de expressão também permitem mostrar as diferenças entre as respostas imunitárias a patógenos distintos. E uma análise de comparação direta entre infecções sistêmicas

com *E. coli* e *M. luteus*, Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente, resultou em diferentes proteínas expressas.

Defensinas já foram isoladas a partir de fungos, plantas, insetos, mexilhões, pássaros, mamíferos entre outros. Tendo sido identificados em proteomas da hemolinfa de vários insetos, elas são predominantemente ativas contra bactérias Gram-positivas, e algumas delas são também ativas contra bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos. Essa ação mais evidente contra bactérias Gram-positivas justifica a expressão da proteína apenas no gel da hemolinfa da *D. saccharalis* desafiada com *B. subtilis*, que é uma bactéria Gram-positiva (HERVÉ-GRÉPINET, 2010; SELFI *et al*, 2011).

Wei *et al.* (2015) purificaram e caracterizaram uma defensina a partir das glândulas salivares da mosca negra. As moscas que foram desafiadas com *B. subtilis* manifestaram níveis relativamente elevados de RNAm de defensina quando comparado com os insetos desafiados com *S. aureus*.

Houve uma diminuição da expressão da proteína Ciclofilina (9) após a infecção da lagarta por *B. subtilis*, ela é pertencente à família de proteínas implicadas na ação imunossupressora. A ciclofilina foi expressa nos três géis, mas diminuiu na condição de infecção por *B. subtilis*, desta maneira, o sistema imunológico não continuou suprimido e houve a produção de peptídeo antimicrobiano, como resposta à infecção.

A proteína precursora de hormônio de eclosão (8), não apresentou expressão diferencial nas condições de injúria microbiana. Também não houve diferença de expressão do peptídeo antimicrobiano Turandot A (TOTA) (6) após as larvas serem desafiadas com *E. coli* e *B. subtilis*, o que indica que ele pode ser constitutivo. O TOTA é um membro de uma família de genes de resposta humoral ao stress de *Drosophila* (MAHAPATRA e RAND, 2012).

As proteínas encontradas condizem com o trabalho de Zhu *et al.* (2009), que avaliaram as mudanças no proteoma do hemolinfa de *Papilio xhutus* parasitado pela vespa endoparasitóide *Pteromalus puparum* e, verificaram que as proteínas identificadas incluíam enzimas, proteínas estruturais de células, de transdução de sinal, de desintoxicação e proteínas importantes na imunidade de insetos.

Zhang *et al.* (2014) verificaram 85 proteínas na proteoma da hemolinfa do *Bombyx mori*, incluindo proteínas de reconhecimento, sinalizadoras, efetoras e outras moléculas do sistema imunológico.

Soulages *et al.* (2009) identificaram um total de 229 proteínas diferentes por MS/MS no corpo gorduroso e ovários da lepidópera *Manduca sexta*, em que o número e variedade de proteínas identificadas foram consistentes com estudos proteômicos anteriores. Estes resultados são importantes, uma vez que a análise proteômica é essencial para a elucidação de processos biológicos, pois fornece a informação que não pode ser deduzida a partir de dados genômicos/transcriptômicos (CERNÝL *et al.*, 2013).

Segundo Zhang *et al* (2007), entre as diversas proteínas que podem ser identificadas utilizando-se as ferramentas de proteômica, as proteínas relacionadas ao estresse e a resposta imune, constituem uma fração significativamente maior na caracterização realizada no proteoma específico de insetos, sendo condizente com as proteínas identificadas no presente trabalho.

Atividade antimicrobiana do extrato protéico da hemolinfa

O extrato protéico da hemolinfa, livre de células, proveniente da larva infectada ^A com *B. subtilis* apresentou atividade bacteriostática contra *B. subtilis* semeado em placa (Figura 2), indicada pela zona de inibição de crescimento ao redor do disco de papel contendo o extrato bruto da hemolinfa, devido provavelmente a presença das substâncias antimicrobianas identificadas como β -defensina, turandot A, atacina e proteína de reconhecimento de peptidoglicano.

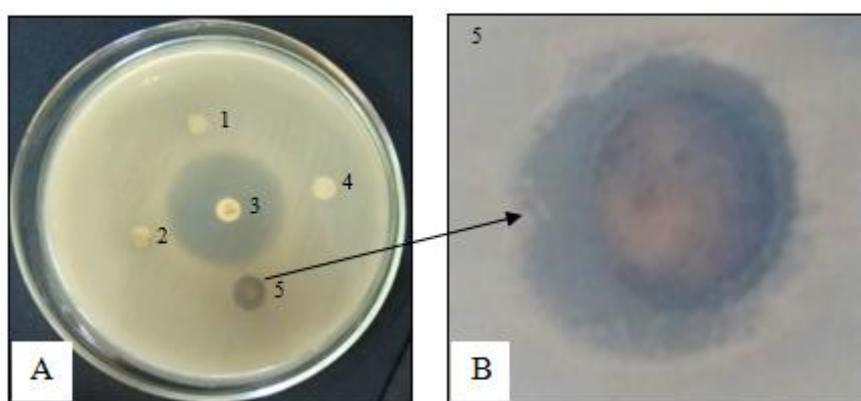


Figura 2 (A) 1-Extrato da hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* nativas, 2-Extrato da hemolinfa de larvas desafiadas com *E. coli*, 3-Antibiótico Gentamicina, 4-Disco controle (sem adição de extrato ou antibiótico), 5-Extrato da hemolinfa de larvas desafiadas com *B. subtilis*. (B) Zoom do halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor do disco contendo extrato da hemolinfa.

Este resultado foi similar aos relatos de Santos (2012), em que verificou-se que o *Bacillus subtilis*, quando na hemolinfa de insetos, apresenta efeito ativador de proteínas responsáveis pelo sistema imunológico.

CONCLUSÕES

A hemolinfa da *Diatraea saccharalis*, nas condições experimentais testadas, apresentou diversas proteínas, porém a identificação de algumas proteínas diferencialmente expressas foi dificultada, devido à ausência de genoma para este organismo.

Neste trabalho, foram identificadas algumas proteínas já descritas na literatura, além de proteínas ainda não caracterizadas e hipotéticas, que podem ser estabelecidas em pesquisas futuras.

Quatro das proteínas encontradas, pertencentes ao sistema imune inato da *D. saccharalis*, órtologas de β -defensina, Turandot A, Atacina e Proteína de reconhecimento de peptídeo glicano são caracterizadas como proteínas antimicrobianas, e podem ser utilizados como base para pesquisas posteriores e possível potencial para aplicação na clínica médica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da metodologia proteômica fornece informações importantes sobre o conjunto de proteínas expressas em um tecido específico de um organismo e, neste trabalho foi possível verificar a presença de proteínas funcionais e constitucionais na hemolinfa da broca-da-cana, colaborando com outros trabalhos em que proteomas de insetos foram determinados e explanados.

Não obstante, para obtenção do mapa proteômico completo, análises adicionais são necessárias, bem como o sequenciamento do genoma da *Diatraea saccharalis*, para que as bases de dados forneçam mais informações e para que assim, existam subsídios para comparar e discutir os resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTGEERTS, K.; YE, S.; SHI, L.; SRIDHAR, P.; G.; WITMER, D.; CHI, E.; SANG, B. C.; WIJNANDS, R. A.; WEBB, D. R.; SWANSON, R. V. Glicosilação ligada a N de dipeptidil-peptidase IV (CD26): Efeitos sobre a actividade da enzima, a formação de homodímero, e de ligação de adenosina-desaminase. **Journal of Protein Science**. V. 13. n. 1, p. 145-154, Jan. 2004.

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

ALMEIDA, L. C. **Pragas em cana crua: Monitoramento e controle**. Disponível em <<http://www.assocana.com.br/restrito/AlmeidaPragasCanaCrua-Orplana.pdf>>. Acesso em: 02/09/2015.

AZAD, N. F.; RASOOL, N.; ANNUNZIATA, C. M.; MINASIAN, L.; WHITELEY, G.; KOHN, E. C. Proteomics in clinical trials and practice – present uses and future promise. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, n. 10, p. 1819-1829, May 2006.

BAE, S.; KIM, Y.; Lysozyme of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: activity induction and cDNA structure. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 135, n. 3, p. 511–519, July 2003.

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. June 2012.

BRADFORD, M. M. A.; Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.

BORTOLI, S. A.; DÓRIA, H. O. S.; ALBERGARIA, N. M. M.; BOTTI, M. V.; Aspectos biológicos e dano de *Diatraea saccharalis* (Fabr, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em sorgo cultivado sob diferentes doses de nitrogênio e potássio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 2, p. 257-263 Mar./Apr. 2005.

CAPELI, M. J.; **Manejo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1974) (Lepidoptera: Crambidae), na cultura de cana-de-açúcar**. Dissertação. Faculdade de Tecnologia de Pompeia. Pompeia-SP, 2012.

CAPINERA, J. L.; **Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)**, 2001. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu>. Acesso em: 22 set. 2014.

CARLIER, L.; JOANNE, P. B. KHEMTEMOURIAN, L. A.; LACOMBE, C. A. D.; NICOLAS, P. B.; LEQUIN, O. Investigating the role of GXXXG motifs in helical folding and self-

association of plasticins, Gly/Leu-rich antimicrobial peptides. **Biophysical Chemistry**. V. 196, n. 2015; p. 40–52, Sep. 2014.

CARVALHO, M. M.; BUENO, R. C. O. F.; CARVALHO, L. C.; GODOY, A. F.; FAVORETO, A. L.; Importância econômica e generalidades para o controle de *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae) em cana-de-açúcar. **Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.9, n.17; p. 1624, Dec. 2013.

CASTRO, B.A.; RILEY, T.J.; LEONARD, B.R.; BALDWIN, J; GALORE, B.; Borers Galore: Emerging Pest in Louisiana Corn, Grain Sorghum and Rice. **Louisiana Agriculture Magazine**. v. 47, p. 4-6, Jan. 2004.

CELORIO-MANCERA, M. L.; COURTIADÉ, J.; MUCK, A.; HECKEL, 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**, v. 6, n. 10, p. e26676, Oct. 2011.

CERNÝL, M.; KUKLOVÁ, A.; HOEHENWARTER, W.; FRAGNER, L.; NOVÁK, O.; ROTKOVÁ, G.; JEDELSKÝ, P. L.; ZAKOVÁ, M. S; SMEHILOVÁ, M.; STRNAD, M.; WECKWERTH; BRSOBOHATÝ, B.; Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* identifying both distinct and similar responses to cytokinin down- and up-regulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4193–4206, Sep. 2013.

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

CHAURASIA, M. K.; PALANISAMY, R.; BHATT, P.; KUMARESAN, V.; GNANAMM, A. J.; PASUPULETI, M.; KASI, M.; HARIKRISHNAN, R.; AROCKIARAJ, J.; A prawn core histone 4: Derivation of N- and C-terminal peptides and their antimicrobial properties, molecular characterization and mRNA transcription. **Microbiological Research**. v. 170, p. 78-86, Jan. 2015.

CHAURAND, P.; LUETZENKIRCHEN, F.; Peptide and Protein Identification by MatrixAssisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source Decay Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, n. 2, p. 91-103, Feb. 1999.

CÔNSOLI, F. L.; SALVADOR, G.; Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v. 45, n. 1, p. 103-110, Dec. 2008.

CORTÉS, A. M. P.; ZARBIN, P. H. G.; TAKIYA, D. M.; BENTO, J. M. S.; GUIDOLIN, A. S.; CONSOLI, F. L.; Geographic variation of sex pheromone and mitochondrial DNA in *Diatraea saccharalis* (Fab., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 11, p. 1624-1630, Nov. 2010.

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, Dec. 2007.

DAVIS, M. A.; HANASH, S.; High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer. Plasma-based proteomics in early detection and therapy. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 217-221, Dec. 2006.

DING, C.; JIANG, J.; QIN, J.; A Fast Workflow for Identification and Quantification of Proteomes. **Molecular e cellular proteomics**, v.12, n. 8, p. 2370-2380. Aug. 2013.

DOSLER, S., KARAASLAN, E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. **Peptides**. v. 62, p. 32–37, Dec. 2014.

FERREIRA, E.; BARRIGOSI, J. A. F.; CASTRO, E. da M. de.; SANTOS, A. B.; Perdas de produção pela broca do colmo (*Diatraea saccharalis* Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em genótipos de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n.2, p.99-103, maio/ago. 2004.

FERRER, M.; GHAZI, A.; BELOQUI, A.; VIETES, J. M.; LÓPEZ-CORTÉZ, N.; MARÍN-NAVARRO, J.; NECHITAYLO, T. Y.; GUAZZARONI, M.; POLAINA, J.; WALICZEK, A.; CHERNIKOVA, T. N.; REVA, O. N.; GOLYSHINA, O. V.; GOLYSHIN, P. N.; Functional Metagenomics Unveils a Multifunctional Glycosyl Hydrolase from the Family 43 Catalysing the Breakdown of Plant Polymers in the Calf Rumen. **PLoS One**. v. 7, n. 6, e38134, June 2012.

FUKUWASA, A. H.; **Envolvimento dos hemócitos na resposta imune da aranha caranguejera *Acanthoscuria gomesiana***. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. 2007.

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

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J.; Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**. V. 5, n. 3, p. 826-827, Feb. 2005.

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, Fev. 2010.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**. v.61, n. 6, p.1742-1743, Dec. 1968.

HERVÉ-GRÉPINET, V.; RÉHAULT-GODBERT, S.; LABAS, V.; MAGALLON, T.; DERACHE, C.; LAVERGNE, M.; GAUTRON, J.; LALMANACH, A. C.; NYS, Y.; Purification

and Characterization of Avian Defensin 11, na Antimicrobial Peptide of the Hen Egg. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 54, n. 10, p. 4401–4408. Oct. 2010.

HUANG, F.; LEONARD, R.; MOORE, S.; YUE, B.; PARKER, R.; REAGAN, T.; STOUT, M.; COOK, D.; AKBAR, W.; CHILCUTT, C.; WHITE, W.; LEE, D.; BILES, S.; Geographical susceptibility of Louisiana and Texas populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein. **Crop Protection**. v. 27, n. 3-5, p. 799-806 Mar. /May 2008.

HULL, J. J.; COPLEY, K. S.; SCHEGG, K. M.; QUILICI, D. R.; SCHOOLEY, D. A.; WELCH, W. H.; De Novo Molecular Modeling and Biophysical Characterization of *Manduca sexta* Eclosion Hormone. **Biochemistry**. v. 48, n. 38, p. 9047–9060, Sept 2009.

HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; ANDERSSON, K.; STEINER, H.; BENNICHT, H.; BOMAN, H.G. Insect immunity: Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. **EMBO Journal**. v.2, n. 4, p. 571-576, 1983.

HUSSAIN, M.; ASGARI, S.; Reply to Skalsky et al.: MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 111, n. 23, p. 2746–2751, Jun. 2014.

JEARAPHUNT, M.; AMPARYUP, P.; SANGSURIYA, P.; CHAROENSAPSRI, W.; SENAPIN, S.; TASSANAKAJON, A.; Shrimp Serine Proteinase Homologues *PmMasSPH-1* and *-2* Play a Role in the Activation of the Prophenoloxidase System. **PLoS One**. v. 10, n. 3, Mar. 2015.

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

KASHYAP, D. R.; ROMPCA, A.; GABALLA, A.; HELMANN, J. D.; CHAN, J.; CHANG, C. J.; HOZO, I.; GUPTA, D.; DZIARSKI, R.; Peptidoglycan Recognition Proteins Kill Bacteria by Inducing Oxidative, Thiol, and Metal Stress. **PLoS Pathogens**. V. 10 n. 7. July 2014.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinase – regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**. V. 8, n. 3, p. 809-824, June 2003.

KINGSOLVER, M. B.; HUANG, Z.; HARDY, R. W.; Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 4921-4936, Dec. 2013.

LAVINE, M. D.; CHEN, G.; STRAND, M. R.; Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includes*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 12, p. 1335-1346, Dec. 2005.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R.; Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 32, n. 10, p. 1295-1309, Oct. 2002.

LEE, Y. S.; YUN, E. .; JANG, W. S.; RYU, K. S.; SEO, S. J.; KIM, C. H.; LEE, I. H.; Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 65-72. Jan. 2004.

LONG, W. H.; HENSLEY, S. D.; Insect pests of sugar cane. **Annual Review of Entomology**, v. 17, p.149 -176, Jan. 1972.

LOHAN, S.; MONGA, J.; CAMEOTRA, S. S.; BISHT, G. S.; *In vitro* and *in vivo* antibacterial evaluation and mechanistic study of ornithine based small cationic lipopeptides against antibiotic resistant clinical isolates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 88, Pages 19–27, Dec. 2014.

MAHAPATRA, C. T.; RAND, M. D.; Methylmercury tolerance is associated with the humoral stress factor gene Turandot A. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 34, n. 4, p. 387–394, July–Aug. 2012.

MANDRIOLI, M.; BUGLI, S.; SALTINI, S.; GENEDANI, S.; OTTAVIANI, E.; Molecular characterization of a defensin in the IZD-MB-0503 cell linederived from immunocytes of the insect *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). **Biology of the Cell**, v. 95, n. 1, p. 53-57, Jan/Feb. 2003.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B.; Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, Oct. 2011.

MARÓTY, G.; KERESZT, A.; KONDOROSI, E.; MERGAERT, P.; Natural role of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**. V. 162, n. 4, p.363-374. Feb. 2011.

McNABB, S, L.; TRUMAN, J. W.; Light and peptidergic eclosion hormone neurons stimulate a rapid eclosion response that masks circadian emergence in *Drosophila*. **The Journal of Experimental Biology**. V. 211, N. 14, p. 2263–2274, July 2008.

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

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L.; Insect chitin synthases. **Journal of comparative physiology B**. v. 176, n. 1, p. 1-15, Jan. 2006.

MONDAL, S. N.; DUTT, M.; GROSSER, J. W; DEWDENEY, M. M.; Transgenic citrus expressing the antimicrobial gene Attacin E (attE) reduces the susceptibility of 'Duncan' grapefruit to the citrus scab caused by *Elsinoë fawcettii*. **European Journal of Plant Pathology**. n. 133, p. 391-404. Dec. 2012.

NEGREIRO, M. C. C.; ANDRADE, F. G.; FALLEIROS, A. M. F.; SEMINA. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia*

gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Ciências Agrárias**. v. 25, n. 4, p. 293-308, out./dez. 2004.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAND DER MEER, J. W. M.; Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. **Cell Host e Microbe**. V. 9, n. 5, p. 355-361, May 2011.

OLIVEIRA, I. F.; **Expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos de *Aedes aegypti* em resposta à infecção por *Wuchereria bancrofti***. Dissertação (mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008.

OLIVEIRA, M. A. P.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; MARQUES, E. J.; ALBUQUERQUE, A. C.; SANTOS, F. A. B.; BARROS, R.; TEIXEIRA, A. A. C.; Dinâmica hemocitária em *diatraea saccharalis* f. (Lepidoptera: Crambidae) desafiada imunologicamente pelos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *metarhiziumanisopliae* (Metsch.) Sorok. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p.173-179, abr./jun., 2008.

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, Feb. 2012

PANNUTI, L. E. R.; **Incidência de *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794 (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae), produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar em função da irrigação e da fertilização nitrogenada**. Dissertação (Mestre em Ciências Agrônômicas). Botucatu-SP, 2012.

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

PASKEWITZ, S. M.; LI, B.; KAJLA, M. K.; Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**. V. 17, n. 3, p. 217-225, June 2008.

PINHEIRO, D. O.; ZUCCHI, T. D.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; ALMEIDA, E. CÔNSOLI, 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: Biochemistry and Molecular Biology**. V. 156, n. 4, p. 273–278, Aug. 2010.

PONTES, W. CAMARA, C.; GONDIM-JUNIOR, M.; OLIVEIRA, J.; SCHWARTZ, M.; Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaves of *Protium bahianum* Daly. **Journal of Essential Oil Research**. V. 22M, n 3, p. 279–282, May 2010.

PORTELA, G. L. F.; BRANCO, R. T. P. C.; BARBOSA, O. A.; SILVA, P. R. R.; Flutuação populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera –Crambidae) em cana-de-açúcar no município de União-Pi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.3, p.303-307, jul.-set., 2010.

PRATES, M. V.; BLOCH JÚNIOR, C.; Peptídeos Antimicrobianos: Uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. V. 3, n. 17, Nov./dez. 2000.

RAFIKOV, M.; SILVEIRA, J. C.; On dynamical behavior of the sugarcane borer – Parasitoid agroecosystem. **Ecological Complexity**. V. 18, p. 67–. 73, June 2014.

RESENDE, J. M.; MORAES, C. M.; PRATES, M. V.; CESAR, A.; ALMEIDA, F. C. L.; MUNDIM, N.; VALENTE, A. P.; BEMQUERER, M. P.; PILÓ-VELOSO, D. E BECHINGER, B. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1,-2, and-3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. **Peptides**, v.29, n.10, p.1633-1644. Oct. 2008.

ROSA, R. D.; **Identificação e caracterização de sequências codificadoras de peptídeos antimicrobianos (PAM) nas células da hemolinfa de espécies nativas de peneídeos marinhos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Florianópolis, 2007.

RICHARDS, A. L.; MERRILL, A. E.; COON, J. J.; Proteome sequencing goes deep. **Current Opinion in Chemical Biology**. V. 24, p. 11–17, Feb. 2015.

SANTOS, R. S. S., ação de formulações comerciais de *Bacillus* spp sobre lagartas de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.8, N.14; p. 16-22, Jun. 2012.

SCHNAPP, D.; KEMP, G. D.; SMITH, V. J.; Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**. V. 240, n. 3, p. 532-539, Sep. 1996.

SCHMIDT, O.; THOPOLD, U.; BECKAGE, N.; Insect and vertebrate immunity: key similarities verses differences. **Insect Immunology**. 322, n. 5905, p. 1199-1200, Nov. 2008.

SCHWANHÄUSSER, B.; BUSSE, D.; LI, N.; DITTMAR, G.; SCHUCHHARDT, J.; WOLF, J.; CHEN, W.; SELBACH, M.; Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**. N. 473, p. 337–342. May 2011

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858. May. 1996.

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

bacterial-challenged cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **BioMed Central Molecular Biology**, v. 12, n. 47. 2011.

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

SILVA, C. C. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 68-72, Jan./Fev. 2002.

SIVA, H. S. R. C. SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quím. Nova**. vol.29, n.4, p. 776-785, July/Aug. 2006

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, May 2010.

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

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M, TEREZI, H.; Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, vol.29 n.4, July/Aug. 2006.

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, n. 2, p. 164–171, Nov. 2012.

SIMONE, S. G.; SOUZA, A. L. A.; Peptídeos microbicidas. **Biociência e Desenvolvimento**. V. 24, p. 12-16, jan./fev. 2002.

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, Jun. 2008.

SOULAGES, J. L.; FIRDAUS, S. J.; HARTSON, S.; CHEN, X.; HOWARD, A. D.; ARRESE, E.; Developmental changes in the protein composition of *Manduca sexta* lipid droplets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 42, n. 5, p. 305–320, May 2012.

STADLER, F.; HALES, D.; Highly-resolving two-dimensional electrophoresis for the study of insect proteins. **Proteomics**, v.2, n. 9, p. , 1347–1353, Sep. 2002.

STEINER H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**. V. 292, n. 5820, p. 246-248, July 1981.

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

TAVARES, L. S.; SANTOS, M. O.; VICCINE, L. F; MOREIRA, J. S.; MILLER, R. N. G.; FRANCO, O. L. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides**. V. 29, n. 10, p. 1842–1851, Jun. 2008.

TEIXEIRA, L.; Whole-genome expression profile analysis of *Drosophila melanogaster* immune responses. **Briefings in functional genomics**. V. 1. N. 5. 375-386, Sep. 2012.

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

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

TIPPER, D. J., STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, V. 54, n. 4, p. 1133–1141, Oct. 1965.

TRINDADE, F.; AMADO, F.; COSTA, J. P.; FERREIRA, R.; MAIA, C.; HENRIQUES, C.; COLAÇO, B.; VITORINO, R.; Salivary peptidomic as a tool to disclose new potential antimicrobial peptides. **Journal of Proteomics**. V. 115, p. 49–57, Feb. 2015.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, 717-735, 2005.

TUMITAN, A. R. P.; SILVA, J. C. Ana Avaliação da colonização microbiológica por bactérias potencialmente patogênicas em baratas *Blattella germanica* capturadas em edifício residencial de uma cidade do interior paulista. **Colloquium Vitae**. 2015 jan-abr; N. 1, v. 122, p. 29-37, Jan-abr. 2015.

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

VERLY, R. M.; **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaio Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. Tese (Doutorado em Ciências – Química). Belo Horizonte, 2010.

VILCINSKAS, A.; Pathogens as Biological Weapons of Invasive Species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 4, e1004714, Apr 2015.

YANAY, C.; MORPURGO, N.; LINIAL, M.; Evolution of insect proteomes: insights into synapse organization and synaptic vesicle life cycle. **Genome Biology**. V. 9, n. 2. , Article R27, Feb. 2008.

YANO, S.; RATTANAKIT, N. WAKAYAMA, M.; TACHIKI, M. A chitinase indispensable for Formation of Protoplast of *Schizophyllum commune* in Basidiomycete-lytic Enzyme Preparation Produced by *Bacillus circulans* KA-304. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. V. 68, n. 6, p. 1299-1305, May, 2014.

ZHANG, G.; WANG, H.; SHI, J.; WANG, X.; ZHENG, H.; WONG, G. K.; CLARK, T.; WANG, W.; WANG, J.; KANG, L.; Identification and characterization of insect-specific proteins by genome data analysis. **BioMed Central Genomics**. V. 8, n. 93, Apr. 2007.

ZHANG, M.; ZHOU, F.; CHU, Y.; ZHAO, Z.; AN, C.; Identification and Expression Profile Analysis of Antimicrobial Peptide/Protein in Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **International Journal Biological Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1004–1012, oct. 2013.

ZHANG, Y.; DONG, Z.; WANG, D.; WU, Y.; SONG, Q.; GU, P.; ZHAO, P.; XIA, Q. Proteomics of larval hemolymph in *Bombyx mori* reveals various nutrient-storage and immunity-related proteins. **Amino Acids**. v. 46, p. 1021–1031, Jan. 2014.

ZHOU, Z. H.; YANG, H. J.; CHEN, M. L., ZHANG, Y.Z.; CHEN, K. P.; WANG, Y.; YU, M. L.; YU, F.; LI J, Y.; ZHONG, B. X. Comparative Proteomic Analysis between the Domesticated Silkworm (*Bombyx mori*) Reared on Fresh Mulberry Leaves and on Artificial Diet. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 12, p. 5103–5111, Dec. 2008

ZHU, J.; YE, G.; FANG, Q.; HU, C.; Proteome changes in the plasma of *c* (Lepidoptera: Papilionidae): effect of parasitization by the endoparasitic wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 10, n. 6, p. 445-453. June 2009.

WAGHU, F. H.; GOPI, L.; BARAI, R. S.; RAMTEKE, P.; NIZAMI, B.; IDICULA-THOMAS, S.; CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides Biomedical Informatics Centre of ICMR, National Institute for Research in Reproductive Health. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. p. 1154-1158, Jan. 2014.

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.

WEI, L.; MU, L.; WANG, Y.; BIAN, H.; LI, J.; LU, Y.; HAN, Y.; LIU, T.; LV, J.; FENG, C.; WU, J.; YANG, H.; Purification and characterization of a novel defensin from the salivary glands of the black fly, *Simulium bannaense*. **Parasites & Vectors**, V. 8. N. 71, Oct. 2015.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T.; **Proteomics in Practice: a Laboratory Manual of Proteome Analysis**. © Wiley-VCH Verlag-GmbH, Weinheim, Germany, 2002.

WHITE, W. H.; VIATOR, R. P.; DUFRENE, E. O.; DALLEY, C. D.; RICHARD JR., E. P.; TEW, T. L.; Re-evaluation of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) bioeconomics in Louisiana. **Crop Protection**. V. 27, n. 9, p. 1256–1261. Sep. 2008.