

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Identificação e caracterização de genes de peptídeos antimicrobianos
(AMPs) de três espécies de insetos-praga de cana-de-açúcar**

GÉSSICA DOS SANTOS ALVES

RECIFE 2023

GÉSSICA DOS SANTOS ALVES

**Identificação e caracterização de genes de peptídeos antimicrobianos
(AMPs) de três espécies de insetos-praga de cana-de-açúcar**

Monografia apresentada ao
Curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas/UFRPE
como requisito parcial para
obtenção do grau de
Licenciado em Ciências
Biológicas.

Orientador: José Dijair
Antonino de Souza Junior

RECIFE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474i

Alves, Géssica dos Santos

Identificação e caracterização de genes de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de três espécies de insetos-praga de cana-de-açúcar / Géssica dos Santos Alves. - 2023.
45 f.

Orientador: Jose Dijair Antonino de Souza Junior.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2023.

1. Cana-de-açúcar. 2. Inseto-praga. 3. *Diatraea saccharalis*. 4. *Diatraea impersonatella*. 5. *Telchin licus*.
I. Junior, Jose Dijair Antonino de Souza, orient. II. Título

CDD 574

GÉSSICA DOS SANTOS ALVES

**Identificação e caracterização de genes de peptídeos antimicrobianos
(AMPs) de três espécies de insetos-praga de cana-de-açúcar**

Comissão Avaliadora:

Prof. Dr. José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE Orientador

Prof. Dra. – Roberta Ramos Coelho - UFRPE Titular

Prof. Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva – UFPE Titular

MSc. Manoely Abreu Reis. – UFRPE Suplente

RECIFE

2023

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor José Dijair Antonino de Souza Junior, pela sua paciência e humanidade. Obrigada, professor, por ser um facilitador do meu processo, serei eternamente grata por seus ensinamentos e acolhimento.

A Michelle Giovanna, pelo suporte, acolhimento e incentivo durante a caminhada.

A Maysa Mirella, pelo companheirismo, apoio e paciência. Te amo!

Ao meu "quarteto fantástico", Leticia Brilhante, Maielly Sena e Ewerton Ferreira. Vocês foram imprescindíveis durante esses quase cinco anos, obrigada por todo carinho, conselhos e principalmente por não me deixarem abater nos momentos difíceis, amo vocês!

Aos amigos, Rizia, Richard e Lucas por tornarem o processo mais leve e harmonioso. Amo vocês!

A Sérgio Campos, pelo suporte e apoio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao LIMBo (Laboratório de Biologia Molecular de Insetos) pelo acolhimento e aprendizado. Aos integrantes do LIMBo, Manoelly, Felipe, Ianne e Glenda pelos ensinamentos, cafezinhos e risadas.

A UFRPE e o Departamento de Biologia, minha segunda casa, que me proporcionou experiências e sentimentos inesquecíveis.

A Deus, por toda sua bondade, que me sustentou para que eu pudesse chegar até aqui!

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Laudijane Francisca, por acreditar, motivar e ser a maior incentivadora dos meus sonhos. Te amo, mainha!

A Minha vizinha Nena (*in memoriam*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	35

RESUMO

A cana-de-açúcar, principal matéria prima para diversos insumos sofre ataques por diversas pragas, como os lepidópteros *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus*. O controle dessas pragas costuma ser realizados com inseticidas químicos, porém com pouca efetividade, e a utilização de agentes de controle biológico como os parasitoides, bactérias e fungos entomopatogênicos. No entanto, os insetos adquiriram ao longo da evolução mecanismos de defesa contra esses patógenos e parasitas. O sistema imune inato dos insetos possui respostas celular e humoral. A resposta humoral é responsável principalmente pela produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs). A síntese desses peptídeos ocorre através de três principais vias de sinalização, são as Via Toll, Jak-Stat e IMD (Imunodeficiência). Os peptídeos são classificados de acordo com sua estrutura e função. Foram caracterizados em Lepidoptera seis tipos de peptídeos: Attacina, Cecropina, Defensina, Gloverina, Moricina e Lebocina, que possuem ação contra fungos, leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Desta forma, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar a diversidade de AMPs presentes em transcritomas das principais brocas da cana-de-açúcar, assim como propor suas relações filogenéticas para observar potenciais diferenças e propor possíveis aplicações. Nós identificamos um total de 15, 18, e 25 para *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*, respectivamente, pertencentes a todas classes descritas para a ordem Lepidoptera. Aparentemente, *T. licus* apresenta uma maior quantidade de genes de AMPs quando comparado com *D. saccharalis* e *D. impersonatella*. Uma explicação possível é que *T. licus* durante a fase larval habita a soqueira da planta que fica no solo, e por isso a lagarta tem que lidar com um número maior de microrganismos, do que as espécies do gênero *Diatraea*. Porém, essa hipótese precisaria de validação. Outro ponto interessante é que aparentemente o genoma depositado para *D. saccharalis* no NCBI não parece ser da mesma espécie da população brasileira que também é denominada *D. saccharalis*. Os AMPs são a principal forma de resposta humoral dos insetos e diversidade destes genes parecem estar relacionados com o modo de vida dos insetos. Os dados gerados aqui podem servir de base para aplicação dos AMPs em diferentes áreas.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é cultivada principalmente na Ásia e na América Latina, principalmente no Brasil, que tem destaque por ser o maior produtor, além de possuir grande notoriedade na produção de etanol (LEITE et al., 2018). Ademais, o bagaço da cana-de-açúcar pode ser utilizado na produção de calor, energia mecânica, energia elétrica e em estudos recentes foi observado que o bagaço pode ser aproveitado para a produção de etanol de segunda (BATISTA; DE OLIVEIRA, 2020). A cana-de-açúcar sofre ataque de diversas pragas, dentre elas, *Diatraea saccharalis*, a broca comum, é a principal praga no país (DA SILVA et al., 2022). Outra praga capaz de afetar a produção de cana, especialmente no Nordeste, é a *Diatraea flavipennella* recentemente reclassificada como *Diatraea impersonatella* (LEMES et al., 2017). Finalmente, *Telchin Licus*, a broca gigante da cana-de-açúcar, além de ser uma importante praga da cana no Nordeste, também é praga da bananeira e do abacaxizeiro (PABÓN-VALVERDE; MICHAUD; VARGAS, 2022).

Ao se buscar soluções efetivas para o controle destas pragas, existem dois tipos de controle principais, o químico através do uso de inseticidas químicos para erradicação da praga causa danos graves ao meio ambiente e aos seres vivos (NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016) Além disso, a utilização desses inseticidas pode proporcionar uma seleção resistente de pragas (FU et al., 2019). Outro controle bastante utilizado é o controle biológico, sendo uma alternativa para diminuir o uso de inseticidas através da utilização de inseticidas microbianos, considerados seguros para o meio ambiente e seres humanos (GALZER; AZEVEDO FILHO, 2016; LOWE et al., 2019; NAWAZ et al., 2019)

A utilização de microrganismos entomopatogênicos têm demonstrado eficiência no combate contra essas pragas (ZAPPELINI et al 2020). Na utilização deste método somente o alvo é combatido, sendo assim, possui menos risco ao meio ambiente, além de não deixar substâncias prejudiciais no solo, na água e em alimentos. Ademais, não acarreta em populações de pragas mais resistentes, e nem ocasiona risco a humanos (GOMES & OLIVERIA, 2020). No

entanto, insetos possuem diversos mecanismos de defesa contra estes patógenos, dentre eles a imunidade humoral. Quando reconhecidos, os patógenos induzem a ativação das vias responsáveis pela transdução do sinal que resultará no combate às infecções. Dentre estas vias, três se destacam em insetos, a via de Imunodeficiência (Imd), a via Toll, e a via JAK/STAT. Todas desencadeiam como resposta, principalmente, a síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs), que vão combater o microrganismo invasor (HILLYER, 2016; LI *et al.*, 2022; MANNIELLO *et al.*, 2021). Os AMPs de artrópodes possuem estruturas únicas, sendo classificados em quatro grupos, peptídeos α -helicoidais (cecropina e moricina), peptídeos ricos em cisteína (defensina e drosomicina), peptídeos ricos em prolina (apidaecina, drosocina e lebecina) e proteínas ricas em glicina (atacina e gloverina) (YI *et al.*, 2014). Neste trabalho, exploraremos transcritomas das três principais espécies pragas da cana-de-açúcar no Nordeste, em busca de identificar e classificar os AMPs e de determinar suas relações filogenéticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, o cultivo dessa gramínea teve expansão mundial, especialmente em países tropicais e subtropicais (VILELA *et al.*, 2017). É utilizada como matéria prima para a produção de açúcar, açúcar mascavo, etanol, xarope e outros produtos (WANI *et al.*, 2023). O Brasil é o maior produtor dessa cultura, seguida da Índia, juntos esses países produzem aproximadamente 59% do total mundial de cana-de-açúcar. No Brasil, o Centro-Sul possui destaque na produção, com aproximadamente 90% da produção nacional (ZHENG *et al.*, 2022). Obstante, diferentes fatores contribuem para a redução da produtividade da cana, os insetos pragas são os principais responsáveis pela improdutividade da cultura em diferentes estágios de vida (IQBAL *et al.*, 2021). Entre as pragas, três possuem grande relevância, a *Diatraea saccharalis*, *Diatraea flavipennella* e *Telchin licus* (SANTO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018).

2.2. *Diatraea saccharalis*

A broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, possui destaque por ser uma das mais importantes pragas da cana e do milho. As regiões de mais incidências são a América do Sul e Central, Caribe e sul dos Estados Unidos. Uma das suas principais características é a dinâmica populacional, em que estudos recentes relatam que a *D. saccharalis* possui números significantes em relação a sua expansão (FRANCISCHINI et al., 2019). Presentes em regiões canavieiras do Brasil, a broca é responsável por causar danos diretos, ocasionando consequências irreparáveis para a planta, como a abertura de galerias no interior do colmo provocando perda de peso, morte da gema apical, e, como consequência, a má-germinação. Além disso, podem causar danos indiretos responsáveis pela contaminação de microrganismos (MAGANO et al., 2023). Como consequência do seu comportamento de perfuração e entrada dentro do colmo, a utilização de inseticidas químicos se torna ineficiente. Então, o controle biológico se torna a melhor estratégia a ser utilizada (REAGAN; MULCAHY, 2019). Uma das alternativas de contenção é a utilização de um parasitoide de ovos, *Trichogramma galloi* Zucchi (1988) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), e a *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), um parasitoide de larva (BORGES FILHO et al., 2018; MERLIN; CÔNSOLI, 2019).

2.3. *Diatraea impersonatella* (= *Diatraea flavipennella*)

A espécie *Diatraea flavipennella* (Box, 1931) foi reclassificada como *Diatraea impersonatella* (Walker, 1863), sendo que *D. flavipennella* agora é considerado sinônimo júnior (SOLIS; METZ, 2016). Ela está presente em diversas regiões do Brasil. Sendo uma das principais pragas da cana no Nordeste, seu modo de vida é semelhante ao de *D. saccharalis* (DA SILVA et al., 2022)

2.4. *Telchin licus*

A broca-gigante da cana-de-açúcar, como é conhecida a espécie *Telchin licus* (Drury), se encontra presente em toda América Central e do Sul (TRIANA et al., 2020). Possui destaque por ser uma das principais pragas que atingem a cana na região nordeste do país, causando aproximadamente danos a 65% da lavoura. O controle químico apresenta ineficiência na contenção da *T. Licus* (ROCHA et al., 2021). Uma alternativa ao controle químico seria o biológico

através de microrganismos endofíticos que podem promover o desenvolvimento da planta hospedeira sem causar danos (WANG *et al* 2019). Há exemplos de bactérias endofíticas que possuem grande potencial entomopatogênico, uma vez dentro dos tecidos vegetais não são afetadas por fatores externos capazes de promover sua ineficiência (BENSIDHOUM *et al* 2016, SCHELLENBERGER *et al* 2016, SUMAN *et al* 2016, ROCHA *et al* 2021). Entretanto, o controle mecânico por catação manual ainda é muito utilizado em diversas regiões produtoras do nordeste, em AL e PE.

Todavia, mesmo a utilização de agentes de controle biológico com parasitoides e microrganismos entomopatogênicos não causam 100% de mortalidade nos insetos. Isto porque os insetos possuem mecanismos de defesa inatos que respondem e tentam conter a ação de muitos parasitas e patógenos.

2.5. O sistema imune dos insetos

Os insetos estão expostos a inúmeros patógenos, muitos desses costumam invadir e colonizar os hospedeiros, atingindo sucesso na maioria das vezes. Para se proteger e reduzir os danos causados por esses patógenos, os insetos evolutivamente desenvolveram mecanismos de defesa (HILLYER, 2016). O sistema imunológico inato é uma das principais vias de defesa imunológica contra invasores, distribuída por todo o corpo desempenham papel importante na manutenção da homeostase e protege o hospedeiro de doenças e infecções (RIERA ROMO; PÉREZ-MARTÍNEZ; CASTILLO FERRER, 2016). O sistema imune inato em insetos possui respostas humorais e celulares. Os hemócitos são os grandes responsáveis pela resposta celular e agem sobre os patógenos através de processos como fagocitose, encapsulamento e coagulação. Por outro lado, a resposta humoral é composta por peptídeos antimicrobianos, cascatas proteolíticas e síntese de melanina (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são componentes importantes desse sistema (BULET *et al.*, 1999), possuindo grande capacidade antibacteriana, antifúngica e antiviral (ONGEY; PFLUGMACHER; NEUBAUER, 2018). As principais vias responsáveis pela síntese de AMPs nos insetos são a via de Imunodeficiência (Imd), Toll e JAK-STAT. A via Imd e Toll utiliza receptores para fazer o reconhecimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos,

leveduras, além de iniciar cascatas de sinalização. Já a via JAK-STAT é uma via de reconhecimento viral, mas também está envolvida na resposta celular (ZHANG *et al.*, 2017).

2.6. Via Toll

A via Toll, em insetos, é ativada por bactérias gram-positivas e fungos (LIMA *et al.*, 2021). Quando ocorre a infecção por patógenos, as proteínas de reconhecimento promovem a ativação da cascata de serina protease (SP) (YU *et al.*, 2020) que ativa a transdução de sinal para o interior da célula via um receptor transmembrânico denominado Toll. O reconhecimento desses componentes para bactérias Gram-positivas ocorre através das proteínas receptoras PGRP-AS, PGRP-SD, GNB3, bem como a proteína de ligação GNB-1 (HINO & GOTO 2016). A cascata SP através da enzima SPE cliva a proteína Spatzle (Spz), receptora da via Toll. O Spatzle se acopla com o dímero Toll, ativando a via de sinal Toll-Spätzle. (MOLLAH; AHMED; KIM, 2021). Como consequência ocorre o recrutamento das proteínas MyD88, Tube e Pelle. Em seguida, o complexo Spz-Toll se liga à proteína MyD88 através do domínio TIR intracelular. Logo após, MyD88, Tube e Pelle formam um complexo denominado de heterotrimérico, responsável pela degradação do I κ B, Cactus é fosforilada e degradado via proteossoma. Dorsal e Dif, fatores de transcrição, são liberados e se deslocam do citoplasma para o núcleo, desencadeando o aumento da transcrição de AMPs (LI *et al* 2017; ANTHONY; FOLDI; HIDALGO, 2018; CARDOSO *et al.*, 2017; SHAFEEQ; AHMED; KIM, 2018; YU *et al.*, 2020)

2.7. Via Imd

Como consequência da patogenicidade de bactérias Gram-negativas, ocorre a ativação da Via IMD, que também desencadeia a expressão de AMPs. O reconhecimento desses patógenos ocorre pelo receptor peptidoglicano PGRP-LC. Para ativação da via faz-se necessária a modificação do fator Relish aliado à sua translocação nuclear (CAI *et al.*, 2021). A molécula de DAP-PGN é liberada pela parede celular de microrganismos bacterianos durante a divisão celular ou morte bacteriana (KLEINO; SILVERMAN, 2019). Desta forma, PGN liga-se ao receptor PGRP-LC/PGRP-LE desencadeando o recrutamento de IMD, FADD e DREDD, um complexo de sinalização intracelular (BAI *et al.*, 2020).

Além desses complexos de sinalização, também estão envolvidos a Diap2, a dTAK1 e o complexo IKK. O Relish é ativado por clivagem, onde a porção N-terminal se translocam para o núcleo induzindo a transcrição de genes de AMPs (ZHAI; BOQUETE; LEMAITRE, 2018) Obtendo como resultado final a expressão de peptídeos antimicrobianos (ALEJANDRO et al., 2022).

2.8. Via JAK/STAT

Essa via é composta por três citocinas Unpaired (Upd), Upd2 e Upd3. Upd está relacionada com a matriz extracelular. Upd2 está relacionada com a resposta a danos teciduais. Upd3 está relacionado principalmente a indução de hemócitos após ação bacteriana. Upd2 e 3 são induzidas como consequências da patogenicidade viral, desencadeando múltiplos mecanismos reguladores, responsáveis pelo controle da sua expressão (AGAISSE *et al.*, 2003; KEMP *et al.*, 2013; WRIGHT *et al.*, 2011). Além disso, essa via conta com uma tirosina quinase, a JAK (Hopscotch/Hop), um receptor ativo Domeless (Dome) e o fator de transcrição STAT (Stat92E/Marelle) (MORIN-POULARD; VINCENT; CROZATIER, 2013). As enzimas JAK presentes no citoplasma sofrem dimerização de uma citocina, que se liga ao seu receptor. A partir disso, as JAKs são ativas e fosforilam os receptores de citocina desencadeando um ponto de ancoragem para as STATs que sofrem fosforilação das JAKs, formando dímeros. Os dímeros de STAT se translocam para o núcleo e se ligam a uma sequência palindrômica de DNA induzindo a transcrição de genes de resposta (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006; DE CARO MARTINS; PIMENTA DA COSTA VAL BICALHO -PROFESSORA ADJUNTA; MARTINS MELO, 2018; GENG *et al.*, 2016; LIONGUE; WARD, 2013; MYLLYMÄKI; RÄMET, 2014).

2.9. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os AMPs podem ser classificados de acordo com sua função ou estrutura em diferentes famílias. Em Lepidoptera eles são classificados como cecropinas, defensinas, lebecinas, gloverinas, atacinas e moricinas (BUONOCORE *et al.*, 2021; HEMMI *et al.*, 2002). As cecropinas são peptídeos que contêm de 31 a 39 aminoácidos e foram identificadas em lepidópteros, dípteros e coleópteros. Essas são ativas contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (YI *et al.*, 2014). Defensinas são pequenos peptídeos que variam de 28 a 44

aminoácidos, foi identificada nas ordens Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera, Odonata e Lepidoptera, possui atividades contra bactérias Gram-positivas, fungos e vírus (MYLONAKIS *et al.*, 2016; RICHARD *et al.*, 2002). Lebocinas, identificada na hemolinfa de *Bombyx mori*, um lepidóptero, possui aproximadamente 32 aminoácidos e é rica em prolina e O-glicosilado (BULET *et al.*, 1999). Isolada da hemolinfa de dois lepidópteros, a gloverina é rica em glicina, essa age contra bactérias Gram-negativas e leveduras (BULET *et al.*, 1999). Atacinas são ricas em glicina e possui aproximadamente 190 aminoácidos, foram identificadas na hemolinfa da mariposa gigante *Hyalophora cecropia*. Seis isolados foram encontrados e classificados em dois grupos, o grupo básico formado pelas atacinas A e D e um grupo ácido formado pelas atacinas E e F. Essa é responsável pela interação da membrana e atividade antimicrobiana (BUONOCORE *et al.*, 2021). Moricinas são compostas por 42 aminoácidos, isolada da hemolinfa da *Bombyx mori*, possuem ação antibacteriana tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas (HEMMI *et al.*, 2002). A seguir, cada AMP será descrito em mais detalhes.

2.9.1. Cecropinas

Descritas pela primeira vez na hemolinfa de *Hyalophora cecropia*, as cecropinas possuem destaque por serem uma classe de peptídeos antimicrobianos (AMP) amplamente estudados (RAMOS *et al.*, 2021). Possuem ausência de cisteínas, e conseqüentemente não formam pontes dissulfeto, além de apresentarem 34-39 resíduos compostos por alfa hélice N-terminal hidrofílica e uma C-terminal hidrofóbica, unidas por uma região de dobradiça (GARZÓN *et al* 2017, SEGÓVIA *et al* 2017, SHRESTHA *et al* 2019). As cecropinas são classificadas em subtipos de A a E, com cada tipo variando entre as espécies (PENG *et al.*, 2019). Em insetos, esses membros podem ser isolados da hemolinfa de lepidópteros e dípteros após uma infecção bacteriana (SHEEHAN *et al.*, 2018). Cecropinas demonstram eficiência contra ação de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (WANG *et al.*, 2018). Durante a infecção, os genes de cecropinas são expressos pelos corpos gordurosos em diferentes estágios de desenvolvimento (OUYANG *et al.*, 2015)

2.9.2. Atacinas

Semelhante às cecropinas, as atacinas foram descritas e caracterizadas através da hemolinfa da pupa de *Hyalophora cecropia*. (NESA et al., 2020). As atacinas são expressas de forma ácida e básica. As atacinas características ácidas possuem na sua composição ácido aspártico, arginina e isoleucina. Já as que possuem características básicas apresentam na sua composição lisina, ácido glutâmico e triptofano (ISLAM; BEZBARUAH; KALITA, 2016). O gene que codifica a isoforma ácida da atacina apresentou resposta rápida à infecção bacteriana (BUONOCORE et al., 2021). As atacinas possuem uma estrutura espiral aleatória em ambiente aquoso e, diferente de outros peptídeos, não sofre modificação da sua estrutura para forma helicoidal em meio anisotrópico. Essa característica é devido a abundância de glicina na sua composição aliada a falta de cisteína (BUONOCORE et al., 2021). Possuem domínios N-terminal e C-terminal com características filogenéticas diferentes entre táxons de insetos. O domínio C-terminal é mais comum em insetos holometábolos e nas ordens Orthoptera, Isoptera e Hymenoptera (SHELOMI et al., 2020). São, principalmente, ativas contra bactérias Gram-negativas, através de lipopolissacarídeos, alterando a estrutura e a permeabilidade da membrana externa. Além disso, inibe a síntese de purinas bacterianas, proteínas presentes na membrana externa (FELIPE et al., 2013; MANNIELLO et al., 2021).

2.9.3. Moricinas

Moricinas desempenham papel importante na defesa humoral de insetos. São importantes AMPs catiônicos alfa-helicoidais, inicialmente isoladas da hemolinfa de larvas de *Bombyx mori*, em seguida em *Galleria mellonella*, *Manduca sexta* e *Spodoptera litura* (XU et al., 2019a). Estes peptídeos apresentam atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando também atividade antifúngica. Moricina apresenta dois domínios, N terminal e C terminal, de extrema importância para sua atividade antibacteriana (HOEGGER; HARRIS, 2020). O papel da moricina no sistema imunológico permanece desconhecido, porém, esse peptídeo apresenta atividade bacteriana mais forte que as cecropinas (LI et al., 2019)

2.9.4. Defensinas

As defensinas são peptídeos catiônicos ricos em cisteína, e constituem uma família de genes diversos, podendo ser isolados de plantas, mamíferos e insetos (RAI et al., 2016). Esses peptídeos desenvolvem funções fundamentais na imunidade inata e adaptativa, as defensinas durante seu processo evolutivo se tornaram amplamente eficientes em suas atividades antimicrobianas a inúmeros patógenos (MACHADO; OTTOLINI, 2015). Sua estrutura é composta por uma alça flexível N-terminal, uma α -hélice central e uma folha β antiparalela C-terminal (LI et al., 2017). As defensinas possuem seis resíduos de cisteína conservados característicos de três pontes de dissulfeto conectadas em um padrão Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 e Cys3-Cys6 (ČEŘOVSKÝ; BÉM, 2014). As defensinas possuem atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e leveduras (CRAVA et al., 2015; LI et al., 2012).

2.9.5. Lebocinas

As lebocinas foram isoladas e caracterizadas a partir hemolinfa de *Bombyx mori*. São ricas em prolina e O-glicosiladas, o que aumenta sua capacidade antimicrobiana. Além disso, lebocinas tem um efeito sinérgico com cecropinas aumentando sua capacidade antibacteriana (ZHANG et al., 2019). As lebocinas são sintetizadas em forma de precursores inativos e precisam ser processadas proteoliticamente para gerar um peptídeo ativo (LU et al., 2017). A lebocina é regulada no intestino médio e participa de uma família multigênica (LI et al., 2022). Em *Bombyx mori*, lebocina possui características diferentes de outros peptídeos. Na via IMD é ativada por Relish e BmEts, um fator de transcrição relacionado à diapausa em *Bombyx mori*, como resposta a ação microbiana no corpo (MAI et al., 2017)

2.9.6. Gloverinas

Gloverinas são peptídeos estáveis ao calor, não possuem cisteína e possuem efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram-negativas. Foram encontradas e caracterizadas pela primeira vez em *Hyalophora gloveri* (WOJDA, 2017 WANG et al., 2019). Gloverinas são ricas em glicina e são encontradas em espécies de lepidópteros. Possuem conformação espiral aleatória porém após interação com lipopolissacarídeos modificam sua estrutura (HWANG; KIM, 2011). Esses peptídeos são sintetizados como pré-proteínas, sua região N-

terminal sofre modificação por enzimas semelhantes à furina, desencadeando a síntese de gloverinas maduras (YI *et al* 2014).

2.10. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a diversidade de AMPs das principais brocas da cana-de-açúcar

Objetivos Específicos

- Identificar os genes dos principais tipos de peptídeos antimicrobianos a partir de transcritomas de *Diatraea saccharalis*, *Diatraea impersonatella* e *Telchin licus*.
- Identificar os domínios conservados nos AMPs encontrados.
- Analisar as relações filogenéticas dos tipos diferentes de AMPs nas principais brocas da cana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Identificação de AMPs

As sequências de genes de AMPs foram identificadas na espécie modelo de Lepidoptera *Bombyx mori*, através do silkbase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Em seguida, foram identificadas, utilizando as sequências de *B. mori* como “iscas”, as sequências de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*, a partir do transcritoma do intestino de lagarta de 4º instar de cada espécie. Os contigs encontrados nos transcritomas foram verificados para saber se estão completos e a determinação das proteínas preditas através da predição das janelas de leitura (<https://web.expasy.org/translate/>). Os peptídeos sinal foram determinados

utilizando o algoritmo online Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) e confirmados no Signal P (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>). A massa molecular e o ponto isoelétrico teóricos, preditos a partir da sequência de aminoácidos forma determinados no algoritmo online “Compute pI/Mw tool” (https://web.expasy.org/compute_pi/).

3.2. Identificação dos domínios proteicos

Em seguida, foram mapeados os principais domínios proteicos de cada proteína predita utilizando os algoritmos HMMER (v. 3.1, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) e CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). As imagens dos domínios foram feitas com auxílio da ferramenta “PROSITE My Domains” (prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/).

3.3. Análises Filogenéticas

Para análise filogenética, além das sequências já encontradas, foram recuperadas as sequências de pelo menos 10 espécies diferentes de Lepidoptera a partir do banco nr do NCBI. Além disso, sequências da espécie modelo *Drosophila melanogaster*, ou de *Plutella xylostella* (lepidóptero com linhagem mais antiga) foram utilizadas como grupo externo. As sequências foram recuperadas utilizando sequências preditas de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* ou *T. Licus* utilizando o BlastP (BLOSUM62). O alinhamento foi conduzido no MEGA 7, utilizando o algoritmo MUSCLE. As análises filogenéticas, baseadas em sequências de aminoácidos, foram realizadas por Maximum likelihood (ML) usando o PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). O Smart Model Selection (SMS) foi utilizado para a escolha do modelo de substituição. As árvores foram representadas graficamente no programa Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos AMPs nos transcritomas de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *T. licus*.

Foram identificados diversos genes de AMPs nas três espécies de brocas da cana-de-açúcar. Ao todo foram encontrados seis tipos de AMPs: Atacinas, cecropinas, defensinas, gloverinas, lelocinas e moricinas.

No transcritoma de intestino de *D. saccharalis* foram identificadas no total 15 AMPs pertencentes as 6 classes encontradas (Tabela 1) com a maioria das sequências completas ou faltando poucos nucleotídeos. Já para *D. impersonatella* foram recuperadas 18 sequências (Tabela 2) pertencentes aos 6 tipos já descritos com a maioria das sequências completas ou quase completas. Por fim para *T. licus* foram encontradas 25 sequências (Tabela 3) de AMPs pertencentes as 6 classes já mencionadas, sendo a maioria completa ou quase completa, com apenas duas sequências parciais de genes de gloverina.

A maioria das proteínas preditas a partir dos genes identificados possuem peptídeo sinal, o que indica uma possível ação extracelular (Tabelas 1, 2 e 3), com exceção de um gene de atacina para cada espécie estudada. Provavelmente, esses genes são ortólogos entre si. Outra característica importante é que a maioria dos AMPs identificados possuem ponto isoelétrico teórico básico ou muito básico (>7). Apenas as defensinas e parte das gloverinas, além de uma cecropina de *T. licus* possuem pI teórico ácido.

Tabela 1. Identificação caracterização *in silico* de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de *Diatraea saccharalis*.

AMP	Contig(s)	ORF completa?	Tamanho da ORF (pb)	Proteína Predita (aa)	Peptídeo sinal?	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto isoelétrico predito
Attacin	5030_c1_g1_i1	SIM*	~599	~199	SIM	~19.13	~9.52
	5030_c4_g4_i1	SIM	612	203	SIM	19.96	9.7
	25529_c3_g1_i1 + 25529_c3_g4_i1	SIM	612	203	SIM	19.62	9.65
	15062_c0_g1_i2	SIM	596	193	NÃO	20.27	9.65
Cecropin	9003_c0_g1_i1	SIM	198	65	SIM	4.72	11.05
	9031_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4.86	8.43
	10150_c0_g2_i1	SIM	192	63	SIM	4.47	10.21
	22194_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.44	10.46
	22398_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.44	10.12
	40013_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4.82	8.38
Defensin	c338_c0_g1_i2	SIM	306	101	SIM	9.06	5.14
Gloverin	9917_c0_g3_i2	SIM*	~515	~171	SIM	~16.71	~9.47
	7828_c0_g2_i5 + c0_g1_i2	SIM	537	178	SIM	17.77	5.93
Lebocin	10179_c0_g1_i1	SIM	699	232	SIM	23.65	9.85
Moricin	c3963_c0_g1_i1	SIM	183	60	SIM	3.84	10.17

* Sequências quase completas faltando poucos nucleotídeos/aminoácidos em comparação com o primeiro hit no banco nr (NCBI) via BlastP.

Tabela 2. Identificação caracterização *in silico* de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de *Diatraea impernotella*.

AMP	Contig(s)	ORF completa?	Tamanho da ORF (pb)	Proteína Predita (aa)	Peptídeo sinal?	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto isoelétrico predito
Attacin	DN10632_c0_g1_i1	SIM	612	203	SIM	19.4	9.48
	DN10632_c0_g3_i1	SIM	612	203	SIM	19.62	9.65
	DN10632_c0_g2_i4	SIM	612	203	SIM	19.58	9.6
	DN10632_c0_g2_i5	SIM	621	206	SIM	19.54	9.44
	DN10632_c0_g2_i6	SIM*	~584	~194	SIM	~18.48	~8.22
	DN11424_c1_g1_i1	SIM	582	193	NÃO	20.22	9.35
Cecropin	DN13090_c1_g4_i1	SIM	198	65	SIM	4.72	11.05
	DN24339_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.4	10.12
	DN30886_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.47	10.21
	DN6973_c0_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.45	10.46
	DN26728_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4.87	8.43
	DN6628_c0_g1_i1	SIM	195	64	SIM	4.86	8.43
Defensin	DN3868_c0_g1_i1	SIM	306	101	SIM	9.03	5.14
Gloverin	DN7500_c0_g1_i1	SIM	537	178	SIM	17.86	5.93
	DN11105_c2_g1_i4	SIM	501	166	SIM	16.15	9.74
Lebocin	DN13690_c2_g1_i1	SIM	690	229	SIM	23.33	9.79
Moricin	DN756_c0_g1_i1	SIM	183	60	SIM	3.83	10.12
	DN18833_c0_g1_i1	SIM*	~186	~62	SIM	~4.03	~9.88

* Sequências quase completas faltando poucos nucleotídeos/aminoácidos em comparação com o primeiro hit no banco nr (NCBI) via BlastP.

Tabela 3. Identificação caracterização *in silico* de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de *Telchin licus*.

AMP	Contig(s)	ORF completa?	Tamanho da ORF (pb)	Proteína Predita (aa)	Peptídeo sinal?	Massa Molecular predita (kDa)	Ponto isoelétrico predito
Attacin	36814_c0_g2_i1	SIM*	~782	~260	SIM	~26.12	~9.4
	26482_c1_g1_i1	SIM	738	245	SIM	24.17	9.25
	44650_c1_g4_i1 + c1_g3_i1	SIM*	~704	~234	SIM	~22.51	~6.59
	34440_c0_g1_i1	SIM	594	197	NÃO	21.12	9.07
Cecropin	20504_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4.66	10.12
	36589_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4.77	10.28
	914_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4.62	10.46
	29261_c1_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.24	10.56
	22662_c0_g1_i1	SIM	204	67	SIM	4.82	8.07
	19818_c1_g1_i1	SIM	192	63	SIM	4.3	11.59
28783_c0_g1_i1	SIM	225	74	SIM	5.56	4.65	
Defensin	46333_c0_g1_i2	SIM	315	104	SIM	9.26	7.05
Gloverin	12527_c0_g1_i1	SIM	525	174	SIM	16.71	9.4
	36362_c0_g1_i1	NÃO	320 (parcial)	106 (parcial)	SIM	na	na
	17541_c0_g1_i2	SIM	525	174	SIM	17.72	8.21
	31627 c0_g1_i1	NÃO	383 (parcial)	127 (parcial)	SIM	na	na
Lebocin	46404_c1_g1_i1	SIM	711	236	SIM	24.74	10.62
	29451_c0_g2_i1	SIM	531	176	SIM	18.03	9.9
Morcin	17349_c0_g1_i1	SIM	204	67	SIM	4.7	11.36
	37241_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4.57	10.22
	25619_c0_g1_i1	SIM	201	66	SIM	4.54	10.18
	23166_c0_g2_i1	SIM	195	64	SIM	4.4	10.29
	5661_c0_g2_i1	SIM	186	61	SIM	3.77	10.12
	49626_c1_g1_i1	SIM	186	61	SIM	3.75	10.12
	32031_c0_g2_i1	SIM	186	61	SIM	3.88	10.38

* Sequências quase completas faltando poucos nucleotídeos/aminoácidos em comparação com o primeiro hit no banco nr (NCBI) via BlastP.

4.2. Análise dos domínios funcionais dos AMPs encontrados

Ao se analisar os domínios funcionais verificou-se que alguns AMPs possuem domínio conservado e outros não. Dos que possuem domínios conservados, nas atacinas, verificou-se dois tipos de perfil de domínios, um grupo composto pela maioria das atacinas onde estes possuem um domínio de atacina N-terminal e outro domínio C-terminal (Figura 1A). Já ou outro perfil é composto justamente pelos genes que não possuem peptídeo sinal (um em cada espécie). A proteína predita deste grupo é um pouco menor que as outras atacinas e possuem apenas o domínio C-terminal (Figura 1A). No que se refere as cecropinas, todas as proteínas identificadas possuem o domínio predito de cecropina (Figura 1B). Já para as gloverinas identificaram-se dois grupos, um com o domínio de gloverina maior e outro um pouco menor (Figura 1C). De forma interessante, pelo menos para *D. saccharalis* e *D. impersonatella* a proteína predita que possui o domínio maior também possui pl básico, já aquele que possui o domínio menor possui pl ácido. Para *Telchin* isto não se repetiu, embora a diferença dos tamanhos dos domínios nas duas proteínas nesta espécie seja bem menor quando comparada com as outras duas espécies.

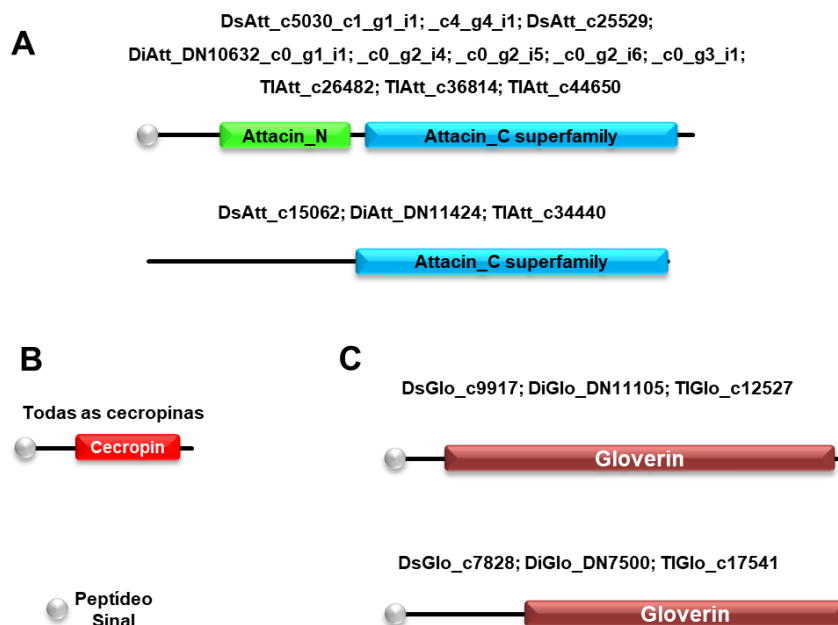


Figura 1. Análise de domínios conservados de Atacinas (A), Cecropinas (B) e Gloverinas (C), utilizando o banco de dados CDD (NCBI) e HMMER.

Nymphalidae, Papilionidae e Pieridae. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0 com bootstrap de 1000 repetições (valores acima de 70 são mostrados nos ramos). O nome das espécies abreviados estão descritos a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG; *Drosophila melanogaster*: Dmel (Diptera), *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

Para as sequências de cecropinas, mais uma vez vemos as sequências da família Crambidae formando um clado único, e novamente as sequências da população dos EUA de *D. saccharalis* mais distante das populações brasileiras de *D. saccharalis* e *D. impersonatella*. De forma interessante, as sequências de *T. licus* se agruparam em diferentes clados, com apenas um formando um clado único com as sequências de Crambidae (Figura 6).

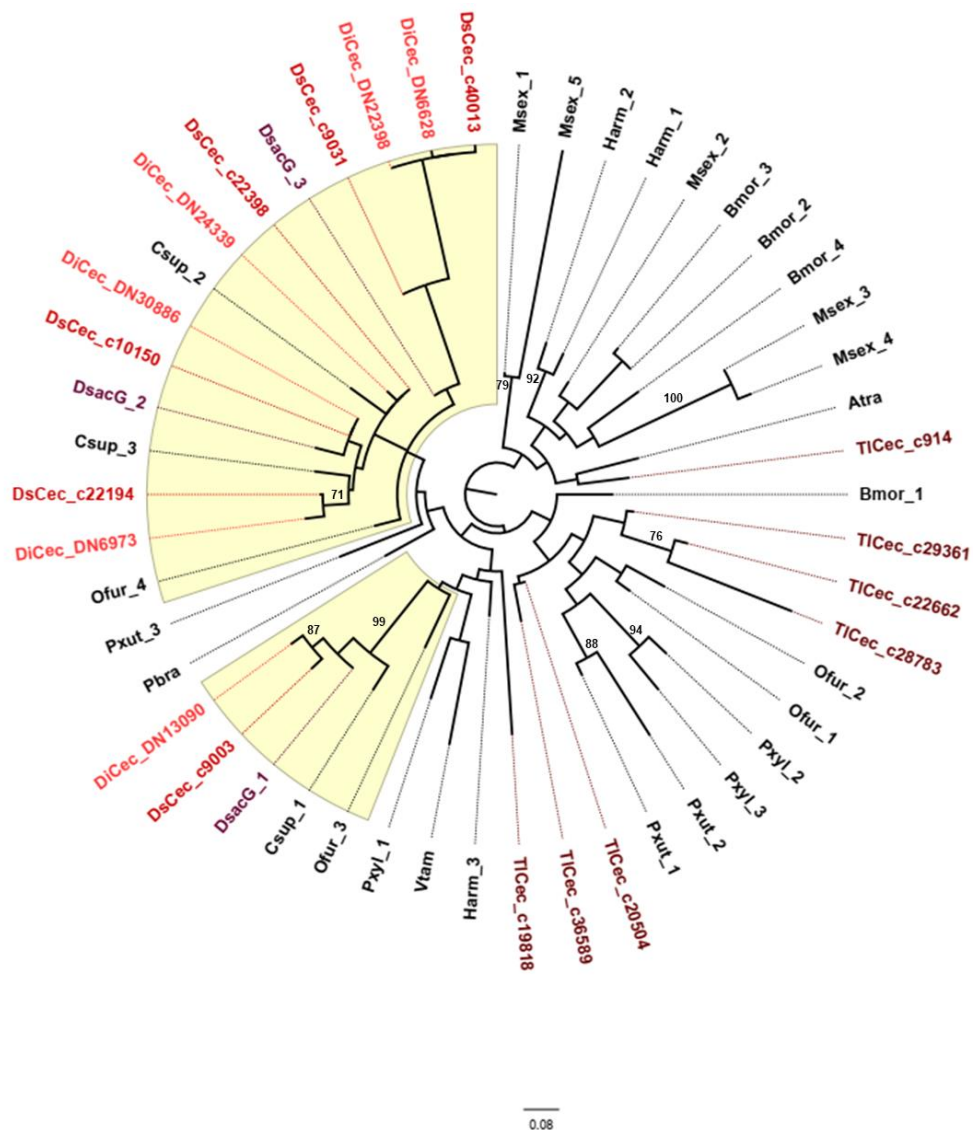


Figura 6. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Cecropinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o agrupamento da família Crambidae. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0 com bootstrap de 1000 repetições (valores acima de 70 são mostrados nos ramos). O nome das espécies abreviado estão descritos a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

As defensinas aparentemente são genes de cópia única em Lepidoptera, sendo *Plutella xylostella* a única exceção. Entretanto, os genes das espécies estudadas formaram um único clado, diferentemente dos outros AMPs, com a família Crambidae (destaque em amarelo) agrupando em conjunto (Figura 7). Mais uma vez as relações entre a população dos EUA de *Diatraea* e as populações brasileiras de *D. saccharalis* e *D. impersonatella* são idênticas aos outros grupos de AMPs.

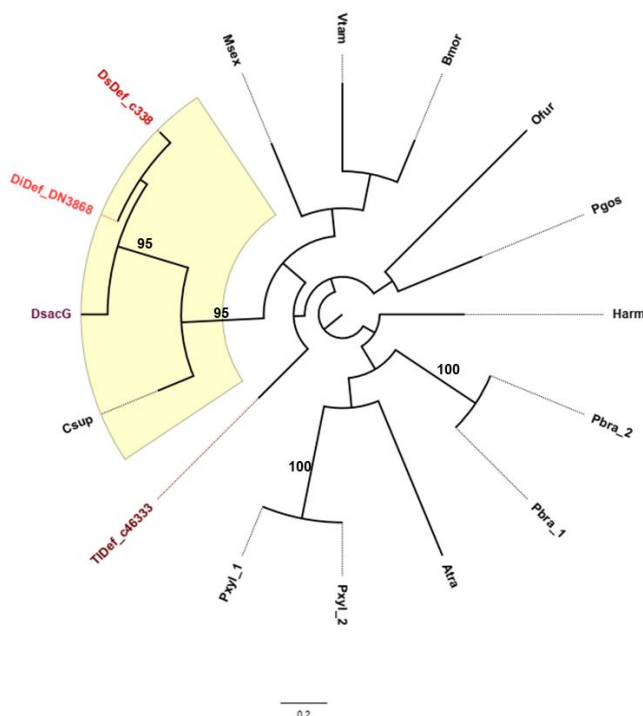


Figura 7. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Defensinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão

destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o agrupamento da família Crambidae. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0 com bootstrap de 1000 repetições (valores acima de 70 são mostrados nos ramos). O nome das espécies abreviado estão descritos a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG;, *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

No caso das gloverinas, os dois grupos já observados no tamanho do domínio e pelos valores de pl também se refletem nas relações filogenéticas onde formam dois clados distintos (Figura 8), inclusive as duas sequências de *T. licus*. Entretanto, as sequências de outros membros da família Crambidae como *C. suppressalis* e *O. Furnacalis*, se agrupam no mesmo clado. Novamente vemos as relações entre as populações do gênero *Diatraea* se repetindo como na análise dos outros AMPs.

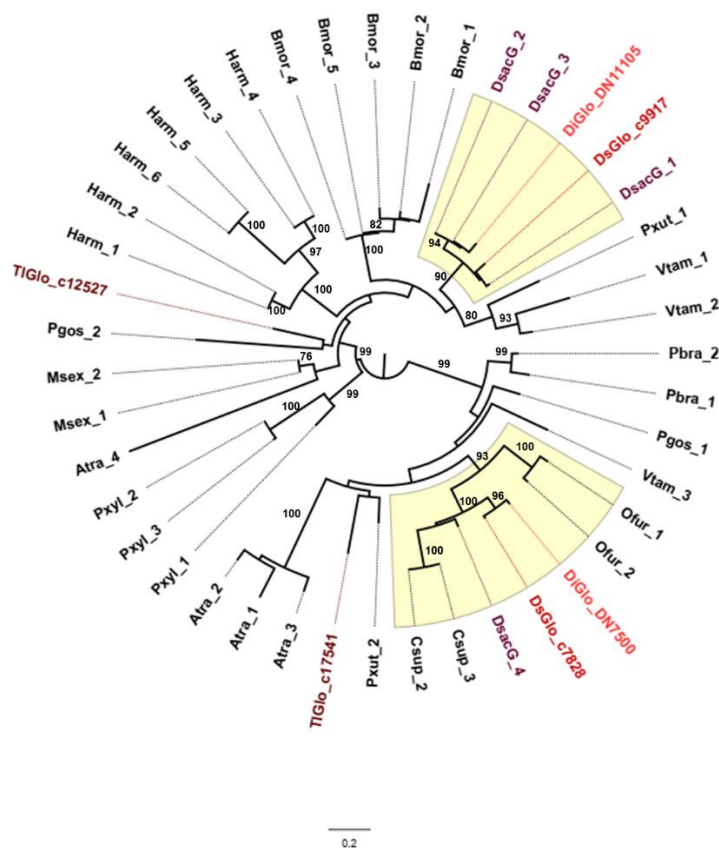


Figura 8. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Gloverinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão

destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o agrupamento da família Crambidae. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0 com bootstrap de 1000 repetições (valores acima de 70 são mostrados nos ramos). O nome das espécies abreviado estão descritos a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG; *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

Para as lebocinas, novamente as sequências de espécies da família Crambidae formaram um único clado, só que desta vez a população dos EUA de *Diatraea* ficou mais próxima de *D. saccharalis* do que de *D. impersonatella*. As sequências de *T. licus*, por sua vez, se agruparam em um clado distinto das espécies de borboletas, mas mais próximo de *P. xylostella* (Figura 9)

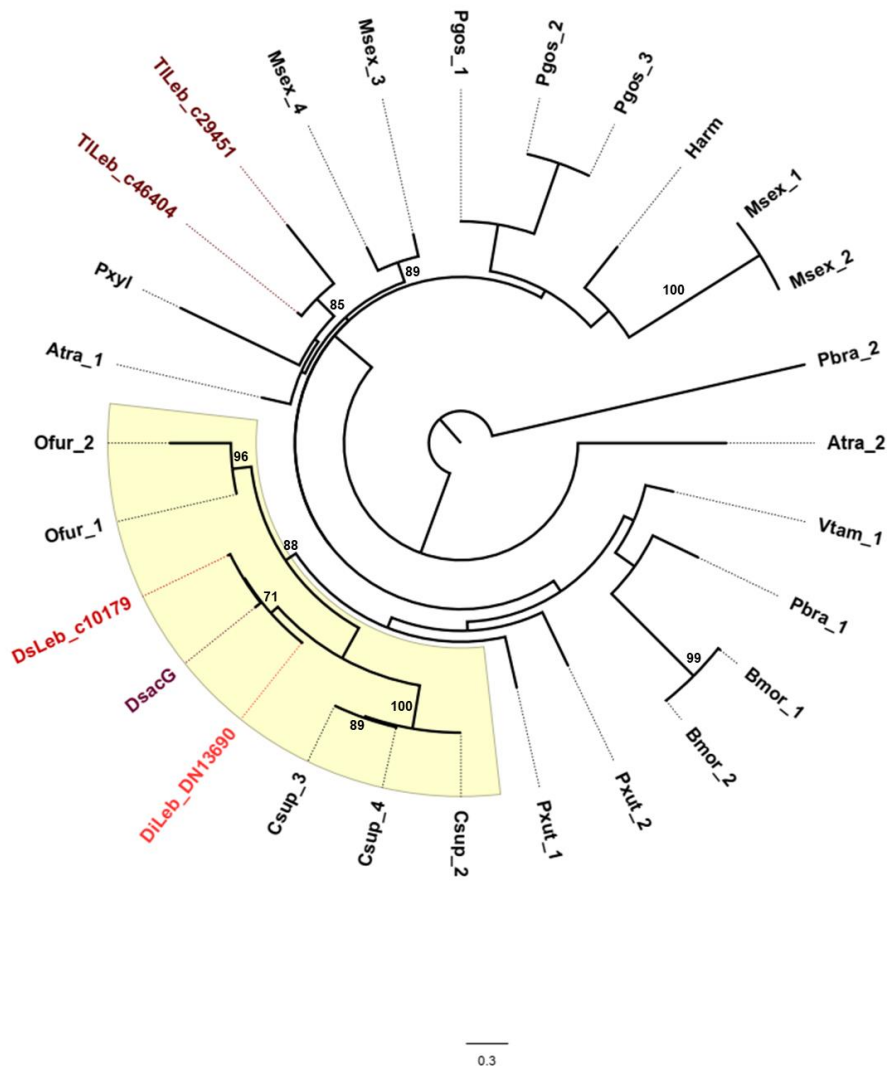


Figura 9. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Lebocinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em

diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o agrupamento da família Crambidae. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi construída no servidor PhyML 3.0 com bootstrap de 1000 repetições (valores acima de 70 são mostrados nos ramos). O nome das espécies abreviado estão descritos a seguir: *Amyelois transitella*: Atra, *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG;, *Helicoverpa armigera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Papilio xuthus*: Pxut; *Pieris brassicae*: Pbra; *Pectinophora gossypiella*: Pgos; *Plutella xylostella*: Pxyl; *Spodoptera frugiperda*: Sfru; *Vanessa tameamea*: Vtam.

E por fim, as sequencias de moricina não fugiram a norma dos outros AMPs, com a as sequências da família Crambidae se agrupando em um único clado. Parte das sequências de *T. licus* se agrupou em conjunto no mesmo clado da família Crambidae, e outra parte se agrupou em um clado diferente junto com outras família de Lepidoptera (Figura 10).

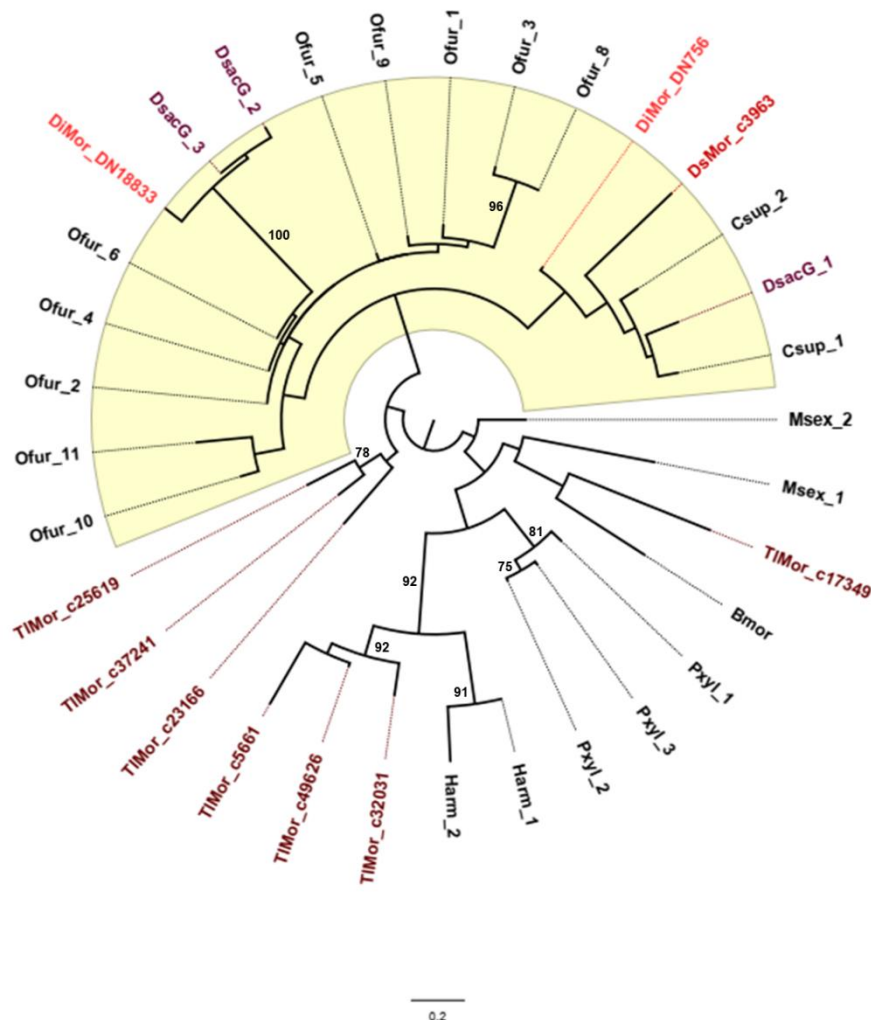


Figura 9. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança para Moricinas de diferentes espécies de Lepidoptera. As espécies-alvos deste estudo estão destacadas em diferentes tons de vermelho. Destaque em amarelo denota o agrupamento da família Crambidae. O alinhamento foi realizado no programa MEGA 7 utilizando o algoritmo MUSCLE e a árvore foi

construída no servidor PhyML 3.0 com bootstrap de 1000 repetições (valores acima de 70 são mostrados nos ramos). O nome das espécies abreviado estão descritos a seguir: *Bombyx mori*: Bmor, *Chilo suppressalis*: Csup; *Diatraea impersonatella*, Di, *Diatraea saccharalis*, Pop. Brasileira: Ds, população EUA: DsacG;, *Helicoverpa armígera*: Harm, *Manduca sexta*: Msex, *Ostrinia furnacalis*: Ofur; *Plutella xylostella*: Pxyl.

5. DISCUSSÃO

Os insetos apresentam um sistema imunológico eficiente contra o ataque de microrganismos patogênicos. Estes podem lidar diretamente com patógenos, eliminando o microrganismo invasor, suprimindo a síntese de toxinas e os fatores de virulência (ZHANG et al., 2021). Em insetos, a imunidade inata é dividida em duas, humoral e celular. A imunidade humoral está envolvida com a síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs são responsáveis por impedir a proliferação de micróbios infectantes e estão presentes em diversos organismos vivos (STANLEY; HAAS; KIM, 2023). Os AMPs de *Drosophila*, por exemplo, são bastante utilizados para monitorar atividades da via Toll e IMD (HANSON; LEMAITRE, 2020). Em um estudo com *Manduca sexta*, um lepidóptero praga de fumo, HE et al., (2015) identificou os mesmos peptídeos antimicrobianos. Além disso, os autores sugerem que se tratando de lepidópteros, os genes para Defensina, Moricina e Lobocina, também estão presentes como em *D. saccharalis*. Segundo XIA et al., (2015), os genes para Moricina e Gloverina são encontrados apenas em lepidópteros.

Neste estudo, foi observado que todas as sequências de Attacinas apresentaram domínios conservados de Attacin C e Attacin N, apenas uma em cada espécie estudada não apresentou o domínio de Attacin N terminal. Ambas possuem ação antibacteriana, são induzidas nos corpos gordurosos dos insetos e secretadas na hemolinfa atuando no combate contra microrganismos invasores (ANDO; NATORI, 1988; HOFFMANN, 1995). SUN et al., 1991 observaram em seus estudos com *Hyalophora cercropia*, dois genes funcionais de Attacina, uma atuando em meio ácido e o outro em meio básico. Além disso, SUDHA et al., (2015) também observou a presença de dois domínios funcionais de Attacina, corroborando com os domínios encontrados nas espécies estudadas neste trabalho. Bactérias e fungos desencadeiam a atividade antimicrobiana em *O. furnacalis* pela alta expressão de Attacina, porém, ainda

não se sabe ao certo como ocorre o processo de indução desse AMP (CHEN et al., 2021; SHAHRIARI et al., 2021) Quando expostos a fungos entomopatogênicos, as lagartas de *Chilo suppressalis* apresentaram expressão significativa de attacinas (SHAHRIARI et al 2021).

Vários genes de Cecropina também foram encontrados nas espécies estudadas. Estudos apontam que quando exposta a nematoides entomopatogênicos, *O. furnacalis* apresenta super-expressão deste peptídeo no corpo gorduroso e hemolinfa (HUOT et al., 2019). Cecropinas produzidas por *B. mori*, como a cecropina A (CeA) foram utilizadas em ensaios antifúngicos realizados com *Beauveria bassiana*, com alta atividade. Além de demonstrar uma expressiva atividade antibacteriana e antifúngica, as cecropinas apresentam capacidade anticancerígena em camundongos onde CeA tem capacidade inibitória células cancerígenas *in vivo* (LU et al., 2016; RAMOS-MARTÍN; HERRERA-LEÓN; D'AMELIO, 2022). Ao serem expostas ao parasitoide *Cotesia flavipes*, *D. saccharalis* demonstrou expressão alta de cecropina como resposta imunológica (MERLIN; CÔNSOLI, 2019). Uma característica interessante, é que em *Plutella xylostella*, a expressão de Cecropinas foi observada três vezes mais em relação a outros peptídeos antimicrobianos após a infecção de parasitoides (ETEBARI et al., 2011).

Diferente de outras ordens insetos da ordem Lepidoptera, especialmente da família Crambidae apresentaram apenas um gene de defensina. A expressão de defensina é regulada significativamente em *Chilo suppressalis* quando expostas ao parasita *Cotesia chilonis*. *Helicoverpa armigera* demonstrou expressão semelhante quando expostas a agentes microbianos de controle (SHAMAKHI et al., 2019).

As gloverinas são encontrados apenas em insetos da ordem Lepidoptera. *P. xylostella* desafiada com o fungo *Beauveria bassiana* apresentou um aumento significativo na expressão de gloverina, identificando uma possível ação antifúngica desse peptídeo (LIN et al., 2020). *Bombyx mori* também apresentou aumento da expressão de gloverinas quando exposto a *Bacillus thuringiensis* (Bt) (XIAO et al., 2023). Os domínios encontrados para as proteínas preditas de Gloverina neste trabalho apresentaram semelhanças com os domínios de

Galleria mellonella encontrados por ZITZMANN; WEIDNER; CZERMAK, (2017). Além disso, os autores destacam a identificação de gloverinas em várias espécies de lepidópteros, porém, as suas atividades antimicrobianas são pouco compreendidas, sabe-se que seu mecanismo de ação ocorre através do aumento da permeabilidade da membrana ou inibindo a formação da membrana externa bacteriana (ZITZMANN; WEIDNER; CZERMAK, 2017)

As lelocinas são AMPs ricos no aminoácido prolina. LU et al., (2017) identificaram cinco genes lelocina de *Bombyx mori*. Esses genes possuíam uma relação estrutural muito semelhante, podendo ter evoluído de um gene ancestral em comum. Estudos também revelaram que Ets, um fator de transcrição presente também em *B. mori* pode estar relacionada a diapausa desse inseto, ainda foi observado que BmEts aumenta a expressão de lelocina (TANAKA et al., 2012). RAO; XU; YU, (2012) observaram duas sequências de lelocinas.

Por fim, as moricinas foram caracterizados em várias espécies de lepidópteros como *Bombyx mori*, através da sua exposição a uma bactéria (XU et al., 2019b). Foi relatado recentemente que devido uma similaridade significativa, existe a hipótese de uma origem monofilética entre sequências de moricina (WANG et al., 2018). Análises filogenéticas demonstraram que moricinas de *P. xylostella* são homólogas às de *B. mori* (XIA et al., 2015). Quando lagartas de *O. furnacalis* foram desafiadas com bactérias, obteve-se um aumento expressivo de MyD88 e genes antimicrobianos, como a moricina (ALRADI et al., 2022). Ademais, podemos observar uma possível duplicação de alguns genes com alguns indivíduos de outras espécies de lepidópteros, enquanto outros se agrupam conforme a filogenia da espécie (VOGEL et al., 2011).

Um resultado interessante encontrado foi a maior quantidade de genes de AMPs em *T. licus* do que em *D. saccharalis* e *D. impersonatella*. Isso pode ser devido ao estilo de vida de *T. licus* onde as lagartas estão mais presentes na parte subterrânea da cana, entrando em contato com um maior número de microorganismos. Esta é uma hipótese que precisa ser testada. Finalmente, parece claro que a população dos EUA identificada como *Diatraea saccharalis* e que teve seu genoma sequenciado, não é a mesma espécie da população

brasileira. Estudo mais detalhados de taxonomia integrativa precisam confirmar se estas espécies são realmente diferentes.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram identificados vários peptídeos antimicrobianos nos transcritomas de *D. saccharalis*, *D. impersonatella* e *Telchin licus*, a maioria desses peptídeos apresentam domínio conservado. A partir da análise filogenética, pode-se observar que a maioria deles possuem homologia com outros AMPs da ordem Lepidoptera indicando que podem estar envolvidos no mecanismo de defesa dessas três espécies. Os dados gerados neste trabalho poderão servir de base para novos estudos focando na ação antimicrobiana dos AMPs e com essa ação pode ser usada para controlar estas pragas e podem ser utilizadas em estudos de outras áreas, como nas ciências biomédicas.

7. REFERÊNCIAS

AGAISSE, H. et al. Signaling Role of Hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury. **Developmental Cell**, v. 5, n. 3, p. 441–450, 1 set. 2003.

ALEJANDRO, A.-D. et al. The IMD and Toll canonical immune pathways of *Triatoma pallidipennis* are preferentially activated by Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, but cross-activation also occurs. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 256, 2022.

ALRADI, M. F. et al. Characterization and functional analysis of a myeloid differentiation factor 88 in *Ostrinia furnacalis* Guenée larvae infected by *Bacillus thuringiensis*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 135, p. 104489, 1 out. 2022.

ANDO, K.; NATORI, S. Molecular cloning, sequencing, and characterization of cDNA for sarcotoxin IIA, an inducible antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1715–1721, 8 mar. 1988.

ANTHONEY, N.; FOLDI, I.; HIDALGO, A. Toll and Toll-like receptor signalling in development. **Development**, v. 145, n. 9, p. dev156018, 2018.

ARBOUZOVA, N. I.; ZEIDLER, M. P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. **Development**, v. 133, n. 14, p. 2605–2616, 15 jul. 2006.

BAI, L. et al. Bacteria-induced IMD-Relish-AMPs pathway activation in Chinese mitten crab. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 106, p. 866–875, 1 nov. 2020.

BATISTA, K. A.; DE OLIVEIRA, C. M. Análise energética de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. **Revista Cogitare**, v. 3, n. 1, p. 68–84, 2020.

BENSIDHOUM, L. et al. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. **European Journal of Soil Biology**, v. 75, p. 38–46, 2016.

BORGES FILHO, R. D. C. et al. Importance of Sugar for the Development of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) on Artificial Diet. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 6, p. 2693–2698, 14 dez. 2018.

BULET, P. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 329–344, jun. 1999.

BUONOCORE, F. et al. Attacins: A promising class of insect antimicrobial peptides. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 212, 2021.

CAI, Q. et al. Theaflavin-regulated Imd condensates control *Drosophila*

intestinal homeostasis and aging. **iScience**, v. 24, n. 3, p. 102150, 19 mar. 2021.

CARDOSO, M. A. et al. A novel function for the I κ B inhibitor Cactus in promoting Dorsal nuclear localization and activity in the *Drosophila* embryo. **Development**, v. 144, n. 16, p. 2907–2913, 2017.

ČEŘOVSKÝ, V.; BÉM, R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 3, p. 251–264, 2014.

CHEN, K. et al. Characterization and functional analysis of a Relish gene from the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 108, n. 2, p. e21841, 2021.

CRAVA, C. M. et al. Dissimilar regulation of antimicrobial proteins in the midgut of *Spodoptera exigua* larvae challenged with *Bacillus thuringiensis* toxins or baculovirus. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0125991, 2015.

DA SILVA, J. F. et al. Influência de Dietas e Temperaturas na Biologia de *Diatraea Saccharalis* Fabricius 1794 e *Diatraea Flavipennella* Box 1931. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e145111637612–e145111637612, 2022a.

DA SILVA, L. C. D. et al. *Diatraea saccharalis* harbors microorganisms that can affect growth of sugarcane stalk-dwelling fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 255–265, 1 mar. 2022b.

DE ASSIS GOMES, J.; OLIVEIRA, A. L. EFICÁCIA PARA O COMBATE DA BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 1, p. 467–478, 2020.

DE CARO MARTINS, G.; PIMENTA DA COSTA VAL BICALHO - PROFESSORA ADJUNTA, A.; MARTINS MELO, M. Enzimas Janus Kinase (JAK): Funções e importância na dermatologia veterinária Janus Kinase Enzymes (JAK): Functions and importance in veterinary dermatology. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 48, p. 105–110, 2018.

ETEBARI, K. et al. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Diadegma semiclausum*. **BMC Genomics**, v. 12, 9 set. 2011.

FELIPE, R. T. A. et al. Reaction of sweet orange cultivars expressing the attacin A gene to 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' infection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1440–1448, 2013.

FRANCISCHINI, F. J. B. et al. *Diatraea saccharalis* history of colonization in the Americas. The case for human-mediated dispersal. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0220031, 2019.

FU, B. et al. Analysis of seasonal and annual field-evolved insecticide resistance in populations of Thrips hawaiiensis in banana orchards. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 1293–1307, 2019.

GALZER, E.; AZEVEDO FILHO, W. Utilização do Bacillus thuringiensis no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 1, n. 1, p. 13–16, 2016.

GENG, T. et al. JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (Bombyx mori) challenged by Beauveria bassiana. **Gene**, v. 595, n. 1, p. 69–76, 20 dez. 2016.

HANSON, M. A.; LEMAITRE, B. New insights on Drosophila antimicrobial peptide function in host defense and beyond. **Current Opinion in Immunology**, v. 62, p. 22–30, 1 fev. 2020.

HE, Y. et al. A genome-wide analysis of antimicrobial effector genes and their transcription patterns in Manduca sexta. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, p. 23–37, 1 jul. 2015.

HEMMI, H. et al. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm Bombyx mori. **FEBS Letters**, v. 518, n. 1, p. 33–38, 2002.

HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 58, p. 102–118, 1 maio 2016.

HOEGER, U.; HARRIS, J. R. **Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins**. [s.l.] Springer Nature, 2020. v. 94

HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 1, p. 4–10, 1 fev. 1995.

HUOT, L. et al. Spodoptera frugiperda transcriptional response to infestation by Steinernema carpocapsae. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

HWANG, J.; KIM, Y. RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, Spodoptera exigua, enhances susceptibility to Bacillus thuringiensis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, n. 3, p. 194–200, 1 nov. 2011.

IQBAL, A. et al. Genetic engineering approaches for enhanced insect pest resistance in sugarcane. **Molecular Biotechnology**, v. 63, n. 7, p. 557–568, 2021.

ISLAM, S. J.; BEZBARUAH, S.; KALITA, J. A review on antimicrobial peptides from Bombyx mori L and their application in plant and animal disease control. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2016.

KEMP, C. et al. Broad RNA interference–mediated antiviral immunity and virus-specific inducible responses in *Drosophila*. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 650–658, 2013.

KLEINO, A.; SILVERMAN, N. Regulation of the *Drosophila* Imd pathway by signaling amyloids. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 108, p. 16–23, 2019.

LEITE, M. R. et al. Sugarcane cutting work, risks, and health effects: a literature review. **Revista de saude publica**, v. 52, 2018.

LEMES, A. R. N. et al. Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ**, v. 2017, n. 1, 2017.

LI, J.; CHEN, C.; ZHA, X. Midgut and Head Transcriptomic Analysis of Silkworms Reveals the Physiological Effects of Artificial Diets. **Insects**, v. 13, n. 3, p. 291, 2022.

LI, S. et al. miR-958 inhibits Toll signaling and Drosomycin expression via direct targeting of Toll and Dif in *Drosophila melanogaster*. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 312, n. 2, p. C103–C110, 2017.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, 2012.

LI, Y. et al. Bioinformatic analysis and antiviral effect of *Periplaneta americana* defensins. **Virus Research**, v. 308, p. 198627, 2022.

LI, Z. et al. Antimicrobial peptides in silkworm. **Animal Biology**, v. 69, n. 4, p. 391–410, 2019.

LIMA, L. F. et al. Evolution of Toll, Spatzle and MyD88 in insects: the problem of the Diptera bias. **BMC genomics**, v. 22, p. 1–21, 2021.

LIN, J. et al. Immune responses to *Bacillus thuringiensis* in the midgut of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 107, p. 103661, 1 jun. 2020.

LIONGUE, C.; WARD, A. C. Evolution of the JAK-STAT pathway. **JAK-STAT**, v. 2, n. 1, p. e22756, jan. 2013.

LOWE, E. C. et al. Engaging urban stakeholders in the sustainable management of arthropod pests. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 987–1002, 2019.

LU, D. et al. Molecular cloning, bioinformatic analysis, and expression of *Bombyx mori* lebecin 5 gene related to *Beauveria bassiana* infection. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

MACHADO, L. R.; OTTOLINI, B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 115, 2015.

MAGANO, D. A. et al. Modelagem da distribuição espaço-temporal da broca da cana de açúcar (*Diatraea saccharalis*) em São Vicente do Sul-RS: Modeling the spatiotemporal distribution of the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in São Vicente do Sul-RS. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 11–19, 2023.

MAI, T. et al. 20-hydroxyecdysone positively regulates the transcription of the antimicrobial peptide, lebocin, via BmEts and BmBR-C Z4 in the midgut of *Bombyx mori* during metamorphosis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 74, p. 10–18, 2017.

MANNIELLO, M. D. et al. Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 9, p. 4259–4282, 2021.

MERLIN, B. L.; CÔNSOLI, F. L. Regulation of the Larval Transcriptome of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by Maternal and Other Factors of the Parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, 6 set. 2019.

MOLLAH, M. M. I.; AHMED, S.; KIM, Y. Immune mediation of HMG-like DSP1 via Toll-Spätzle pathway and its specific inhibition by salicylic acid analogs. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 3, p. e1009467, 2021.

MORIN-POULARD, I.; VINCENT, A.; CROZATIER, M. The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity. **JAK-STAT**, v. 2, n. 3, p. e25700, 15 jul. 2013.

MYLLYMÄKI, H.; VALANNE, S.; RÄMET, M. The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3455–3462, 15 abr. 2014.

MYLONAKIS, E. et al. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, p. 20150290, 2016.

NAWAZ, A. et al. Sustainable Management of Insect-Pests. Em: FAROOQ, M.; PISANTE, M. (Eds.). **Innovations in Sustainable Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 287–335.

NESA, J. et al. Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: a splendid immune defense response in silkworms. **RSC advances**, v. 10, n. 1, p. 512–523, 2020.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. et al. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in public health**, v. 4, p. 148, 2016.

OÑATE-GARZÓN, J. et al. The increase in positively charged residues in cecropin D-like *Galleria mellonella* favors its interaction with membrane models that imitate bacterial membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 629, p. 54–62, 1 set. 2017.

ONGEY, E. L.; PFLUGMACHER, S.; NEUBAUER, P. **Bioinspired designs, molecular premise and tools for evaluating the ecological importance of antimicrobial peptides**. **Pharmaceuticals** MDPI AG, , 10 jul. 2018.

OUYANG, L. et al. Cecropins from *Plutella xylostella* and Their Interaction with *Metarhizium anisopliae*. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142451, 2015.

PABÓN-VALVERDE, A. H.; MICHAUD, J. P.; VARGAS, G. Cultural Control of Giant Sugarcane Borer, *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae), by Soil Mounding to Impede Adult Emergence. **Florida Entomologist**, v. 105, n. 1, p. 22–26, 1 mar. 2022.

PENG, J. et al. Antimicrobial functional divergence of the cecropin antibacterial peptide gene family in *Musca domestica*. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1–10, 2019.

RAI, M. et al. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. **Journal of food science and technology**, v. 53, p. 3381–3394, 2016.

RAMOS, L. F. C. et al. Identification and recombinant expression of an antimicrobial peptide (cecropin B-like) from soybean pest *Anticarsia gemmatilis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, 2021.

RAMOS-MARTÍN, F.; HERRERA-LEÓN, C.; D'AMELIO, N. Molecular basis of the anticancer, apoptotic and antibacterial activities of *Bombyx mori* Cecropin A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 715, p. 109095, 15 jan. 2022.

RAO, X.-J.; XU, X.-X.; YU, X.-Q. Functional analysis of two lebocin-related proteins from *Manduca sexta*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 4, p. 231–239, 2012.

REAGAN, T. E.; MULCAHY, M. M. Interaction of cultural, biological, and varietal controls for management of stalk borers in Louisiana sugarcane. **Insects**, v. 10, n. 9, p. 305, 2019.

RICHARD, L. G. et al. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6, p. 823–831, 2002.

RIERA ROMO, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, D.; CASTILLO FERRER, C. Innate immunity in vertebrates: An overview. **Immunology**, v. 148, n. 2, p. 125–139,

1 jun. 2016.

ROCHA, F. Y. O. et al. Endophytic *Bacillus* bacteria living in sugarcane plant tissues and *Telchin licus licus* larvae (Drury)(Lepidoptera: Castniidae): the symbiosis that may open new paths in the biological control. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 659965, 2021.

SANTO, A. et al. Manejo da Broca-Gigante da Cana-de-Açúcar (*Telchin licus*) (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) no Nordeste do Brasil. **Embrapa**, v. 1, p. 50, dez. 2015.

SCHELLENBERGER, U. et al. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 634–637, 2016.

SHAFEEQ, T.; AHMED, S.; KIM, Y. Toll immune signal activates cellular immune response via eicosanoids. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 84, p. 408–419, 2018.

SHAHRIARI, M. et al. Immunological interactions of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) with the native entomopathogenic fungi. **Microbial Pathogenesis**, v. 154, p. 104858, 1 maio 2021.

SHAMAKHI, L. et al. Effect of thermal stress on the immune responses of *Chilo suppressalis* walker (Lepidoptera: Crambidae) to *Beauveria bassiana*. **Journal of Thermal Biology**, v. 84, p. 136–145, 1 ago. 2019.

SHEEHAN, G. et al. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1625–1639, 2018.

SHELOMI, M. et al. The unique antimicrobial peptide repertoire of stick insects. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 103, p. 103471, 2020.

SILVA, L. M. et al. Toxin Gene Contents and Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Against Two Sugarcane Borer Species, *Diatraea saccharalis* (F.) and *D. flavipennella* (Box). **Neotropical Entomology**, v. 47, n. 2, p. 292–301, 1 abr. 2018.

STANLEY, D.; HAAS, E.; KIM, Y. Beyond Cellular Immunity: On the Biological Significance of Insect Hemocytes. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 599, 2023.

SUDHA, R. et al. Open access Attacin gene sequence variations in different ecoraces of tasar silkworm *Antheraea mylitta*. **Bioinformatics**, v. 11, n. 10, p. 481, 2015.

SUMAN, A.; YADAV, A. N.; VERMA, P. Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: research perspectives**, p. 117–143, 2016.

SUN, S. -C et al. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry**, v. 196, n. 1, p. 247–254, 1991.

TANAKA, H. et al. BmEts upregulates promoter activity of leucocin in *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 7, p. 474–481, 1 jul. 2012.

TORO SEGOVIA, L. J. et al. Identification and characterization of novel cecropins from the *Oxysternon conspicillatum* neotropical dung beetle. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0187914, 2017.

TRIANA, M. F. et al. Morphological, chemical and electrophysiological investigations of *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae). **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, 1 abr. 2020.

VILELA, M. DE M. et al. Analysis of Three Sugarcane Homo/Homeologous Regions Suggests Independent Polyploidization Events of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 266–278, 1 fev. 2017.

VOGEL, H. et al. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2011.

WANG, J. et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. **PeerJ**, v. 6, p. e5369, 2018.

WANG, X. YANG et al. The regulation of cecropin-A and gloverin 2 by the silkworm Toll-like gene 18 wheeler in immune response. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 164, p. 49–58, 1 jun. 2019.

WANI, A. K. et al. Advances in safe processing of sugarcane and bagasse for the generation of biofuels and bioactive compounds. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 12, p. 100549, 2023.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect science**, v. 24, n. 3, p. 342–357, 2017.

WRIGHT, V. M. et al. Differential activities of the *Drosophila* JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 5, p. 920–927, 1 maio 2011.

XIA, X. et al. Genome-wide characterization and expression profiling of immune genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 9877, 2015.

XIAO, Z. et al. Involvement of an Enhanced Immunity Mechanism in the Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Lepidopteran Pests. **Insects**, v. 14, n.

2, p. 151, 2023.

XU, X. et al. Molecular identification of a moricin family antimicrobial peptide (px-mor) from *Plutella xylostella* with activities against the opportunistic human pathogen *Aureobasidium pullulans*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2211, 2019.

YAMAMOTO-HINO, M.; GOTO, S. Spätzle-processing enzyme-independent activation of the Toll pathway in *Drosophila* innate immunity. **Cell structure and function**, v. 41, n. 1, p. 55–60, 2016.

YI, H.-Y. et al. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 5807–5822, 2014.

YU, B. et al. A Toll-Spätzle pathway in the immune response of *Bombyx mori*. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 586, 2020.

ZAPPELINI, L. O. et al. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 75–82, 2020.

ZHAI, Z.; BOQUETE, J. P.; LEMAITRE, B. Cell-Specific Imd-NF- κ B Responses Enable Simultaneous Antibacterial Immunity and Intestinal Epithelial Cell Shedding upon Bacterial Infection. **Immunity**, v. 48, n. 5, p. 897- 910.e7, 15 maio 2018.

ZHANG, J. et al. Identification and function of a leucocin-like gene from the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 166, p. 107207, 1 set. 2019.

ZHANG, R. et al. Regulation of antimicrobial peptides in *Aedes aegypti* Aag2 Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. FEB, 3 fev. 2017.

ZHANG, W. et al. Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. **Cellular Signalling**, v. 83, p. 110003, 1 jul. 2021.

ZHENG, Y. et al. High-resolution map of sugarcane cultivation in Brazil using a phenology-based method. **Earth System Science Data**, v. 14, n. 4, p. 2065–2080, 2022.

ZITZMANN, J.; WEIDNER, T.; CZERMAK, P. Optimized expression of the antimicrobial protein Gloverin from *Galleria mellonella* using stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Cytotechnology**, v. 69, n. 2, p. 371–389, 1 abr. 2017.