

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

ALEX SANDRO GULARTE CHIARELLO

**Análise do perfil proteômico do tecido gorduroso de lagartas de
Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae) inoculadas com
nucleopolyhedrovirus (BmNPV)**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2015

ALEX SANDRO GULARTE CHIARELLO

**Análise do perfil proteômico do tecido gorduroso de lagartas de
Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae) inoculadas com
nucleopolyhedrovirus (BmNPV)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2014

Aos meus pais, Mariza Gularte e Antonio Chiarello.

À minha noiva, Polyanna Cristina Simão Saibert.

Aos meus amigos, pelo estímulo, o que tornou minha vida muito mais fácil e
divertida.

Por todo o carinho, incentivo e confiança, como amor e carinho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade de realização deste curso e trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), ao Corpo Docente do Programa e aos Funcionários.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À Orientadora, professora doutora Maria Aparecida Fernandez, pela confiança, orientação, disponibilidade, estímulo e dedicação.

Ao Coorientador, doutor José Luis da Conceição Silva, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela participação neste estudo, sobretudo pela amizade que a realização deste trabalho nos proporcionou.

À empresa Fiação de Seda Bratac, pela doação de lagartas de híbridos comerciais e pelo suporte técnico, em especial à colaboração dos Pesquisadores Shunsuke Mizuno e Willian Shigeaki Aita.

Aos colegas do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, pelas experiências trocadas. Especialmente aos membros do Grupo de Pesquisa com *Bombyx mori*, pesquisadores Roxelle Ethiene Munhoz, Naiara Climas, Cláudia Saez, Verônica Fascina, Fabiana dos Santos Rando, Alana Oro e Grazielle Pessini, pela preciosa ajuda na condução dos experimentos.

Enfim, agradeço a todos os que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ALEX SANDRO GULARTE CHIARELLO, filho de Antonio Chiarello e de Mariza Gularte, nasceu no dia 01 de setembro de 1988, na cidade de Capitão Leônidas Marques, estado do Paraná.

Iniciou os estudos no colégio Estadual Olinda Truffa de Carvalho, onde estudou até o segundo ano do Ensino Médio, concluindo esta etapa no Colégio Alfa Piazza, na cidade de Cascavel, estado do Paraná, no ano de 2005.

No ano de 2007, iniciou o Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, concluindo o Curso em dezembro de 2012.

No ano de 2012, iniciou o Curso de Pós-Graduação *lato sensu* em Licenciatura no Ensino Superior, na Faculdade Assis Gurgacz (FAG), finalizando-o no final de 2013.

Em março de 2013, iniciou o Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. <i>Bombyx mori</i>	5
2.2. História da sericicultura	7
2.3. Mercado da sericicultura internacional e nacional.....	8
2.4. Características do fio da seda.....	9
2.5. Doenças que afetam o <i>B. mori</i>	10
2.6. Baculovirus e <i>B. mori</i>	11
2.7. Métodos de detecção e genética do BmNPV.....	14
2.8. Imunidade inata em insetos e o modelo <i>B. mori</i>	15
2.9. Corpo gorduroso como o sítio de síntese de AMPs e proteínas antivirais	18
2.10. Métodos proteômicos	19
2.11. Proteína kin 17	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Manejo do <i>Bombyx mori</i>	22
3.2. Inoculação viral	22
3.3. Coleta do tecido gorduroso das lagartas.....	23
3.4. Extração proteica	23
3.5. Quantificação das proteínas e eletroforese em gel SDS-PAGE.....	24
3.6. Gel de eletroforese 1-DE.....	24
3.7. Precipitação das amostras para a eletroforese 2- DE	25
3.8. Hidratação das tiras IPG	25
3.9. Focalização isoeletrica	25
3.10. Equilíbrio das tiras.....	26
3.11. Eletroforese bidimensional (2-DE) e coloração dos Géis.....	26
3.12. Tripsinização e extração de spots do gel de poliacrilamida para MS/MS.....	27
3.13. Sequenciamento por espectrometria de massas	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

CHIARELLO, Alex Sandro Gularte, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2015. **Análise do perfil proteômico do tecido gorduroso de lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) inoculadas com nucleopolyhedrovirus (BmNPV)** Orientadora: Maria Aparecida Fernandez. Coorientadores: José Luis da Conceição Silva e Flavio Augusto Vicente Seixas.

Bombyx mori L. ou bicho-da-seda como é popularmente conhecido é um organismo de grande importância econômica para o homem desde a antiguidade. Trata-se de um organismo modelo, no qual foram identificados vários genes para proteínas de defesa com atividade antimicrobiana. A detecção e sequenciamento de proteínas de defesa contra patógenos, como o BmNPV, torna-se uma ferramenta para entendimento da biologia deste organismo e uma melhoria na criação e aumento do rendimento na produção de casulos, uma vez que inúmeros prejuízos estão ligados à infecção por agentes patogênicos. O BmNPV é o vírus causador dos maiores prejuízos para os sericultores, por alterar diversas características fisiológicas do animal ao longo da infecção. A presença do vírus desencadeia uma cascata de reações metabólicas, cuja finalidade é eliminar a multiplicação viral e a migração do vírus para tecidos adjacentes. O corpo gorduroso é o principal sítio de síntese de proteínas de defesa contra microrganismos nos insetos e, por isso, pesquisas, empregando ferramentas proteômicas em lagartas inoculadas com o BmNPV, podem revelar o estado da expressão gênica nas condições fisiológicas específicas durante o processo infeccioso no corpo gorduroso. No presente estudo, o objetivo foi identificar diferenças no padrão de expressão de proteínas em lagartas infectadas, do sétimo e oitavo dia do 5º instar e verificar se as mesmas estão relacionadas ao processo de autodefesa e também sequenciar a proteína kin 17, com base em referências bibliográficas sobre o ponto isoelétrico e o peso molecular. As proteínas totais extraídas do corpo gorduroso foram analisadas por eletroforese 2-DE e foi realizado o sequenciamento dos fragmentos trípticos por espectrometria de massas (MALDI/TOF-TOF) de alguns spots diferencialmente expressos. Os resultados obtidos apontam para uma diferença no padrão de expressão de proteínas de lagartas inoculadas com o BmNPV quando comparados a amostras do tecido gorduroso de lagartas controle, durante o desenvolvimento normal do lepidóptero.

Dos onze spots recortados do gel 2-DE e tripsinizados, somente três foram identificados: o spot número 6, amostra 7^o DPI, identificado como fator de alongação 1-alpha; o spot 8, amostra do oitavo dia controle, identificado como fator de crescimento disco imaginal; e o spot 11, amostra 8^o DPI, identificado como proteína não caracterizada de *B. mori*. As proteínas analisadas nesse trabalho, provavelmente, estão envolvidas em funções metabólicas nas células do corpo gorduroso. Entretanto, o envolvimento dessas proteínas no sistema imune de *Bombyx mori* não pode ser determinado.

Palavras-chave: Proteôma, resposta imune, nucleopolyhedrovirus.

ABSTRACT

CHIARELLO, Alex Sandro Gularte, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, March, 2015. **Analysis of proteomic profile of the fat tissue of *Bombyx mori* L. caterpillars (Lepidoptera: Bombycidae) inoculated with nucleopolyhedrovirus (BmNPV)** Adviser: Maria Aparecida Fernandez. Committee Members: Dr. José Luis da Conceição Silva and Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas.

The *Bombyx mori* L. or silkworm silk as it is popularly known is a body of great economic importance to man since antiquity. *B. mori* is a model organism in which several genes have been identified for defense proteins with antimicrobial activity. The detection and sequencing of proteins for defense against pathogens such as BmNPV becomes a tool for understanding the biology of the organism and an improvement in breeding and increased yields in cocoons, because many losses are associated with infection by pathogens. BmNPV is the virus of the biggest losses for sericultores to change various physiological characteristics of the animal throughout infection. The presence of the virus triggers a cascade of metabolic reactions that are intended to eliminate the virus multiplication and migration of the virus to adjacent tissue. The fat body is the main site of synthesis of defense against microorganism's proteins in insects, thus employing proteomic research tools crawlers inoculated with BmNPV can reveal the state of gene expression in specific physiological conditions during the infectious process in the fat body. This study aimed to identify differences in the pattern of protein expression in infected larvae of the seventh and eighth day of the 5th instar and verify that they are related to self-defense process and also sequence the protein kin 17 based on references on the isoelectric point and molecular weight. The extracted fat body total protein were analyzed by 2-DE and electrophoresis was carried sequencing of tryptic fragments by mass spectrometry (MALDI / TOF-TOF) of some differentially expressed spots. The results point to a difference in the expression pattern of larvae inoculated with BmNPV proteins when compared to the fat tissue samples of caterpillar control during normal lepidopteran development. Of the eleven cut spots in the gel 2-DE and trypsinized, only three were identified: number 6 spot sample 7^oDPI identified as elongation factor 1-alpha, the spot 8, the eighth day control sample identified factor imaginal disc growth and

the spot 11, sample 8 DPI identified a non-characterized protein of *B. mori*. Proteins analyzed in this study are probably involved in metabolic functions in the cells of the fat body, however, the involvement of these proteins in the immune system of *Bombyx mori* can not be determined.

Keywords: Proteome, immune response, nucleopolyhedrovirus.

1. INTRODUÇÃO

A criação do *Bombyx mori* L. é considerada uma atividade biotecnológica milenar. O bicho-da-seda, como é popularmente conhecido, é classificado como pertencente à classe Insecta, ordem Lepidoptera e família Bombycidae, descrito por Linnaeus em 1758. Pode ser também classificado de acordo com a sua distribuição geográfica e ser identificado como de origem japonesa, chinesa, europeia ou indiana (Krishnaswami et al., 1979).

O bicho-da-seda é holometabólico, ou seja, realiza metamorfose completa, passando por quatro estágios morfológicos distintos durante seu desenvolvimento: ovo, lagarta, pupa ou crisálida e adulto ou mariposa (Hanada e Watanabe, 1986; Nagaraju e Goldsmith, 2002). Sua alimentação no estágio larval é baseada em folhas frescas de amoreira (*Morus* sp.); no estágio adulto faz privação total de alimento, dedicando-se exclusivamente à reprodução. As mariposas do bicho-da-seda depositam cerca de 500 ovos, que eclodem em um período de 7 a 21 dias e seu ciclo de vida completo dura de 6 a 8 semanas.

Acredita-se que o *B. mori* tenha surgido com a domesticação da linhagem selvagem *Bombyx mandarina* Moore, por apresentar características morfológicas semelhantes e capacidade de acasalamento interespecífica (Goldsmith et al., 2005). Contudo, existem divergências bioquímicas e morfológicas que diferenciam as duas espécies, como, por exemplo, a capacidade de voar de *B. mandarina* e a produção de seda que é 10 a 20 vezes menor do que a do bicho-da-seda (Martinez et al., 2004).

O *B. mori*, juntamente com as abelhas, foi domesticado por interesses comerciais e, devido à domesticação, atualmente, não sobrevive na natureza sem auxílio do homem para se alimentar e por isso é considerado totalmente domesticado. As mariposas, por possuírem asas degeneradas, não podem mais voar. (Kellogg, 1910).

As atividades agroindustriais que cercam a produção em massa do bicho-da-seda tiveram início na China, há cerca de 5.000 anos, com o propósito de produzir vestimentas a partir dos fios (Brancahã, 2002), fios que já eram utilizados para realizar suturas.

É considerada uma das atividades agroindustriais mais antigas praticadas pelo homem, acompanhando a evolução das civilizações com outras atividades agroindustriais. A sericultura é empregada principalmente como agricultura familiar em pequenas propriedades rurais. Esta atividade é fruto da integração entre a iniciativa privada, responsável por fornecer ao produtor suporte técnico, e sericultores, responsáveis pelo cultivo da amoreira, produção, obtenção dos ovos e o cultivo das lagartas do bicho-da-seda no campo (Conab, 2006).

O Brasil possui clima favorável à produção do bicho-da-seda, bem como da amoreira, sendo a sericultura uma boa alternativa de cultura para o país, especialmente para os pequenos agricultores (Fernandez et al., 2005). Esta atividade é interessante porque, além de contribuir com a renda familiar, provoca baixo impacto ambiental, se comparada a outras práticas agrícolas e agropecuárias, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do país (Brancahã, 2002; Kurin, 2002).

Entre os lepidópteros que produzem seda, cerca de 500 espécies, somente oito são comercialmente cultivadas, das quais o *B. mori* se destaca como o responsável por 95% da produção de seda mundial (Dingle et al., 2005). As demais espécies pertencem à família *Saturniidae* e entre elas estão: *Antheraea pernyi* Guerin, *A. millita* Drury, *A. yamamai* Guerin, *A. assama* Helfer, *Atlacusricini* Boisduval (Goldsmith et al., 2002).

O bicho-da-seda é considerado um modelo biológico, devido ao fácil manuseio e criação, além da importância comercial atrelada ao organismo e, por isso, tem sido utilizado em várias áreas de pesquisa. Dentre os lepidópteros, foi o primeiro a ter seu genoma totalmente sequenciado, servindo como modelo para estudos na área de proteômica e genômica (Zhong et al., 2008). Na atualidade, tem sido utilizado na biotecnologia como biorreator para a produção de proteínas recombinantes, por meio de aplicação de técnicas de biologia molecular, como a produção de transgênicos (Zhou et al., 2008).

A fase larval passa por vários ínstares, sendo o quinto o mais importante, pois é nesse momento que o animal inicia a secreção do fio de seda para produção do casulo. O fio de seda, composto basicamente das proteínas fibroína, sericina e p25 na forma líquida, é produzido pela glândula sericígena, órgão que ocupa uma área significativa do corpo da lagarta. O casulo é a porção de maior interesse econômico, pois é a partir dele que se extrai a seda utilizada para inúmeros fins,

dentre eles na indústria têxtil, para a produção de biomateriais, por apresentar ótima biocompatibilidade com os tecidos vivos (Altman et al., 2003; Huang e Li, 2004; Servoli et al., 2005; Wang et al., 2007) e também na indústria farmacêutica.

A agroindústria nacional apresenta-se como uma atividade rentável, contribuindo com aspectos econômicos e sociais, além de possuir peso significativo no faturamento anual do país, em torno de US\$ 129 milhões, sendo a maior parte da produção destinada à exportação. O estado do Paraná se destaca como grande produtor de casulos verdes do país (Seab, 2009), responsável por 93% da produção desse artefato, seguido pelos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (Conab, 2013).

Os patógenos são responsáveis por grandes perdas na produção e pelos maiores prejuízos. Esses parasitas estão disseminados em quase todas as áreas de criação do mundo, dentre eles figuram protozoários, fungos e bactérias, outros insetos, agentes agroquímicos e os vírus, que podem afetar o organismo em diferentes estágios de desenvolvimento (Zanetti, 2005a).

Os vírus são os patógenos mais agressivos e que mais preocupam os pesquisadores e sericultores, devido à sua alta capacidade de infecção e virulência. Os efeitos associados aos vírus levam o inseto à drástica diminuição de produção de casulos e à morte em poucos dias, representando por isso um sério prejuízo para o mercado da sericultura mundial (Sengupta et al., 1990; Brancalhão, 2002).

Entre os vírus de maior impacto nas criações está o nucleopolyhedrovirus (BmNPV), da família dos Baculoviridae e do gênero *Alphabaculovirus*, que causa uma doença conhecida como a amarelidão. Estes vírus são constituídos por uma molécula de DNA associada a proteínas do capsídeo, formando-se o nucleocapsídeo (Murphy et al., 1995). Esses baculovírus possuem corpos de oclusão poliédrica, denominados poliedros, que contêm vários vírions e apresentam a poliedrina como a principal proteína, com peso molecular em torno de 30.000 Daltons (Summers et al., 1980), o que corresponde à cerca de 95% do seu conteúdo proteico (Maruniak, 1986).

Devido à importância econômica que o cultivo de *B. mori*, este organismo confere às famílias que o produzem e ao país, estudos com a finalidade de investigar possíveis problemas que possam comprometer sua produção são bem-vindos. Desta forma, entender o processo de defesa desencadeado pela infecção

do agente patogênico em nível molecular é importante e vêm sendo pesquisado com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na defesa do organismo. Este conhecimento pode gerar subsídios para que medidas preventivas sejam realizadas, diminuindo os efeitos prejudiciais ao setor agroindustrial.

A proteína kin17 atua no reparo do DNA e acredita-se que esta seja mais expressa em situações de estresse celular. A descoberta desta proteína foi em 1989, em células de rato, graças a anticorpos policlonais mono-específicos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989). Entre os eucariotos, o gene KIN17 é bem conservado filogeneticamente, indicando que esse gene é bem ativo e funcional em processos biológicos básicos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil proteômico das lagartas inoculadas e não inoculadas, para verificar o perfil de proteínas expressas durante a infecção com o BmNPV e a possível expressão de proteínas de defesa do organismo e sequenciamento da proteína kin 17, utilizando a técnica de espectrofotometria de massa MALDI-TOF/TOF, para sequenciar parcialmente fragmentos de proteínas diferencialmente expressas e detectadas nos géis 2-DE.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Bombyx mori*

O bicho-da-seda ou *Bombyx mori* L., pertencente ao filo Artrópoda, classe Insecta, ordem Lepidóptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx*, é uma larva que foi completamente domesticada pelo homem por interesse econômico. Ultimamente, as pesquisas com este organismo se tornaram muito importante, por apresentar características que facilitam o seu manuseio em laboratório, como, por exemplo, tamanho avantajado, ciclo de vida passando por vários estágios larvais, tamanho de seus cromossomos, entre outros fatores. Pesquisas na área de proteômica tiveram uma ascensão devido ao sequenciamento completo do genoma do inseto e também pela possibilidade de estudar um organismo que passa por diferentes estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida (Pakkianathan et al., 2012).

Apresenta o bicho-da-seda variações relacionadas a sua origem geográfica: provém da China, Japão, Europa, Índia, e Coréia; variações decorrentes do ciclo de vida; variação quanto ao número de criadas anuais ou voltismo; quanto ao número de ecdises e até mesmo quanto à cor do casulo. Quanto ao voltismo, pode ser classificado como monovoltinos, (mariposas de regiões frias com um ciclo anual), bivoltinas (mariposas com dois ciclos anuais e regiões subtropicais) e polivoltinos (mariposas com vários ciclos anuais de regiões tropicais). (Aruga, 1994).

Acredita-se que o *B. mori* tenha surgido com a domesticação da linhagem selvagem *Bombyx mandarina*, por apresentar características morfológicas semelhantes e capacidade de acasalamento interespecífica (Goldsmith et al., 2005), porém, existem divergências bioquímicas e morfológicas que diferenciam as duas espécies relacionadas. Um exemplo disso é a capacidade de voar de *Bombyx mandarina* e a produção de seda: 10 a 20 vezes menor do que a do *B. mori* (Matinez et al., 2004).

O *B. mori* passa por vários estágios distintos durante seu desenvolvimento. Realizando metamorfose completa, o indivíduo jovem apresenta características completamente distintas do adulto. O *B. mori* passa por quatro estágios morfológicos: ovo, larva, pupa ou crisálida e adulto ou mariposa. A larva avança por cinco estágios de crescimento denominados ínstar, (I ínstar: 3-4 dias de

crescimento, II ínstar: 2-3 dias, III ínstar: 3-4 dias, IV ínstar: 3-5 dias, V ínstar: 6-8 dias) (Pakkianathan et al., 2012).

Durante a fase de lagarta, ocorre um crescimento exponencial e o inseto passa por quatro ecdises. Esse aumento de tamanho expressivo é decorrente da alimentação intermitente das lagartas, que se restringe a folhas de amoreira (*Morus* sp.). No quinto ínstar a alimentação é interrompida e seu intestino reabsorvido por apoptose, o organismo passa então a tecer um casulo em torno de si a partir de fios de seda. Dentro desse compartimento, transforma-se em pupa e, posteriormente, mariposa, nesta fase, é possível verificar um dimorfismo sexual entre os organismos, sendo a fêmea significativamente maior que o macho. Todo o processo de transformação dura de trinta a quarenta dias (Hanada e Watanabe, 1986; Zanetti, 2005b).

As pesquisas com o *B. mori* iniciaram antes dos anos de 1900, patrocinados pela indústria da seda, e, na década de trinta, vários estudos já tinham sido apresentados. Por meio desses estudos se descobriu que a espécie possui 28 grupos de ligação, 56 cromossomos e recursos genéticos bem desenvolvidos, com cerca de 500 mutantes para diferentes características de interesse comercial (Munhoz, 2010).

Por se tratar de um organismo de fácil manipulação em laboratório, o bicho da seda, juntamente com a *Drosophila melanogaster* Meigen, destaca-se como modelo em pesquisas moleculares, sendo o *B. mori* o primeiro lepidóptero a ter seu genoma totalmente sequenciado, o que significou um importante avanço para a ciência, devido à quantidade de seu material genético, impulsionando as pesquisas na área de proteômica e genômica animal (Munhoz, 2010).

Devido ao grande potencial econômico, oito espécies de duas famílias distintas foram manipuladas, com objetivo de aumentar a produção do fio de seda, sendo a mais importante *B. mori* (Bombycidae), que responde por mais de 95 % da seda produzida em todo o mundo. As demais espécies são *Antheraea pernyi* Guerin, *A. millita* Drury, *A. yamamai* Guerin, *A. assama* Helfer e *Atacus ricini* Boisduval (Saturniidae), entre outras (Goldsmith et al., 2002).

Em decorrência da ampla utilização em pesquisas e de um longo processo de domesticação, o *B. mori* perdeu a capacidade de sobreviver sozinho no meio ambiente, visto que suas asas e o aparelho de mastigação foram degenerados.

Hoje, para a realização completa de seu ciclo de vida, é necessário que o ser humano forneça alimento regularmente e ambiente propício (Kellogg, 1910).

O casulo é delicadamente construído ao redor da lagarta, por meio da deposição do fio de seda, expelido pelas glândulas sericígenas que possuem abertura na região bucal. Se desenrolado, o casulo pode ter até 1000 metros de comprimento, material composto basicamente das proteínas fibroína, sericína e a p25 ou fibrohexamerina. As cadeias de proteínas fibrosas formadas pela fibroína se associam com a sericína e a fibrohexamerina formando o fio de seda (Corradello, 1987). Outras categorias de proteínas são denominadas seroína 1 e seroína 2, responsáveis pela proteção dos casulos contra agentes microbianos, como bactérias, fungos e vírus (Zurovec et al., 1998).

2.2. História da sericultura

Os primeiros relatos da utilização do bicho da seda pela civilização humana foram escritos por Confúcio na China no século V a.C. Ele descreveu a criação doméstica do bicho-da-seda nos palácios da imperatriz Siling-Chi, ano 2700 a. C., época em que o fio de seda já era utilizado para suturas de feridas e para a confecção de tecidos (Álvarez e López, 2003).

Com o passar do tempo, a seda começou a ser produzida em grande escala e comercializada na cidade de Changan, na China, e sua popularização entre os povos foi aumentando, chegando à Coréia e ao Japão, e formando a maior rede comercial do Mundo Antigo. Para abastecer esse novo mercado, foram criadas várias “Rotas da Seda” que ligavam a Ásia e a Europa, conexões muito importantes para as civilizações do Egito Antigo, Mesopotâmia, China, Pérsia, Índia e Roma, civilizações que deram origem ao mundo moderno (Elisseeff, 1998).

Por trás do sofisticado fio de seda, utilizado para tantos fins, existe um longo e trabalhoso processo, conhecido como sericultura, que envolve a criação e o cultivo da amoreira (*Morus sp.*) e a criação do *B. mori*, até a obtenção final de fios de seda pelas indústrias. Nessas atividades estão envolvidos agricultores, produtores e grandes estabelecimentos industriais (Conab, 2013).

O clima brasileiro permite a sericultura em diferentes regiões, pois é favorável tanto à produção de amoreira quanto à criação do bicho da seda, o que permite a expansão da prática no país (Fernandez et al., 2005). No ano de 1848,

essa atividade teve início no Brasil, no estado do Rio de Janeiro, estendendo-se para Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Seab, 2010). Na cidade de Campinas, em 1992, foi criada a primeira indústria de seda, a Seda Nacional S.A. (Hanada e Watanabe, 1986).

No estado do Paraná, a produção foi iniciada em 1932 na cidade de Cambará, onde foi criada a primeira fábrica paranaense. Desde então, incentivada por alguns empresários, a sericicultura começou a ganhar espaço no estado, passando a fazer parte de outros municípios, como é o caso do município de Cornélio Procopio, onde se instalou a Kanebo Silk do Brasil – Indústria da Seda, no ano de 1972. Na década de 80, tornou-se parte de um projeto da cooperativa dos cafeicultores e agropecuaristas de Maringá (COCAMAR) e desde então passou a ser o principal estado produtor de casulos verdes do país (Silva, 2008).

2.3. Mercado da sericicultura internacional e nacional

No cenário mundial da cadeia de produção de seda, a China é o maior produtor, seguido pela Índia, Tailândia, pelo Uzbequistão, Irã e Brasil. Devido a medidas impostas pelo governo da Índia dificultando a sua produção de casulos, o Brasil vem se destacando e caminhando para ocupar o posto de quarto maior produtor mundial de casulos e de fios de seda (Conab, 2013).

A safra de 2013/2014 registrou 2.376 toneladas de casulos, enquanto a safra anterior (2012/2013) registrou 2.811 toneladas, número 15,38% menor, queda essa provocada pela evasão dos sericultores para outras atividades, estimulada, principalmente, pelo aumento de custos na produção (Conab, 2013), conforme Figura 1.

Desde a inicialização da agroindústria brasileira de sericicultura, a destinação da produção tem sido essencialmente para exportação. Os maiores importadores da produção nacional brasileira são França, Japão, China e Itália, que juntos consomem 96% de toda a produção nacional. Em 2012, 408.8 toneladas foram exportadas para esses países, gerando um montante de US\$ 26,08 milhões para a economia brasileira (Seab, 2013).

Entre os estados brasileiros, o Paraná destaca-se na produção de seda, especialmente a região norte que concentra aproximadamente 1.985 criadores, com 2.210 barracões ativos e área de 4.446 ha com amoreiras. O município de nova

esperança é o maior produtor no estado e possui 199 sericultores, algo em torno de 10% do total do estado, em 303 barracões (13%), em uma área de 730 ha (Seab, 2013). Na safra de 2012/2013, o estado paranaense foi responsável por 89% da produção de seda nacional e na safra de 2013/14 responde por 93% da produção de casulos, totalizado 2.376 toneladas (Conab, 2013).

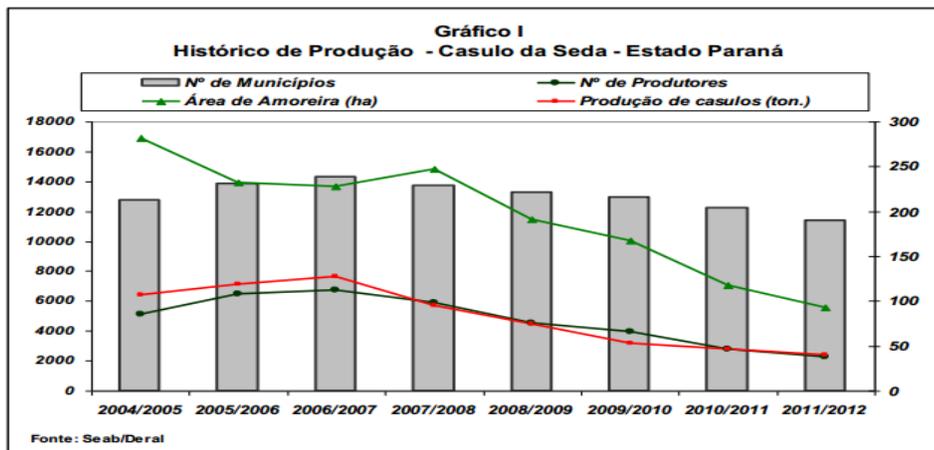


Figura 1 - Histórico de produção de seda (Fonte, Conab, 2013).

A produção brasileira é toda destinada à Fiação de Seda Bratac S/A, que é responsável por 100% da matéria prima e fabricação dos fios de seda, além de prestar suporte técnico aos produtores, incluindo também o fornecimento dos insetos aos agricultores para produção de casulos (Conab, 2013).

2.4. Características do fio da seda

A seda produzida pelo *B. mori* para a confecção do casulo é constituída basicamente das proteínas fibroína, sericína e p25 ou fibrohexamerina. As cadeias de fibroína, que são proteínas fibrosas, formam filamentos rígidos, juntamente com a sericína e a fibrohexamerina, constituindo os fios de seda (Corradello, 1987). Outras categorias de proteínas foram caracterizadas nos lepidópteros: *Galleria mellonella* e *B. mori*, sendo denominadas seroína 1 e seroína 2, que atuam como antimicrobianos e protegem o casulo de fungos e bactérias (Zurovec et al., 1998).

Para obter o fio de seda a partir do casulo de *B. mori*, é necessário, em primeira instância, impedir que a pupa se transforme em mariposa, uma vez que o inseto adulto produz um líquido alcalino que tem a função de furar o casulo para permitir a saída da mariposa. Com intuito de atrapalhar esse processo, os casulos ficam em repouso por duas semanas para a estabilização da sericígena e depois ocorre a limpeza do casulo. Em seguida, são cozidos para amolecer a goma de sericína e possibilitar melhores condições para que a fibra possa ser processada durante a fiação. Ao final, obtém-se o fio de seda (Seab, 2010).

A fibra produzida pelo cultivo do bicho da seda é, sem dúvida, um dos mais nobres materiais têxteis que o homem já utilizou para a fabricação de tecidos. Seu brilho, aspecto e toque são exclusivos são bem vistos pela indústria têxtil, outras características ainda podem ser úteis na biomedicina, propriedade como a biocompatibilidade impulsionam as pesquisas com a seda para a produção de biomateriais (Silva, 2008).

2.5. Doenças que afetam o *B. mori*

Alguns patógenos, como protozoários, bactérias, fungos, vírus e outros insetos interferem de forma significativa na produção dos casulos, bem como no ciclo de vida do animal, afetando seu desenvolvimento e produção de casulos (Zanetti, 2005a).

Quando contaminado por protozoários, o bicho-da-seda, geralmente, desenvolve a flâcherie e a pebrina. A primeira é conhecida como diarréia do bicho-da-seda; a segunda é uma doença infecciosa caracterizada pelo aparecimento de manchas negras no tegumento da lagarta. O agente etiológico dessas moléstias é o microsporídio *Nosema bombycis* e a contaminação se dá pela ingestão de folhas de amoreira contaminadas com ovos (Zanetti, 2005b).

As doenças causadas por fungos também são comuns na produção e as que apresentam maior incidência são a calcinose branca, causada pelo agente *Beauveria bassiana*, e a calcinose preta, causada por *Metarhizium anisopliae* (Habib e Andrade, 1998b). Essas doenças são transmitidas por folhas de amoreira contaminadas e, entre os insetos, esta infecção pode ser agravada, pois as condições ideais para o desenvolvimento dos fungos estão diretamente relacionadas às do desenvolvimento do inseto (Zanetti, 2005b).

Outros insetos também podem prejudicar a sericicultura, como a mosca kyojo (*Sturmia sericariae*), a mosca tachina (*Tricholyga sorbillans*), a mosca uzi (*Tricholyga bombycis*), o ácaro da sarna da palha (*Pediculoides ventricosus*), o besouro do casulo, as formigas e as abelhas (Zanetti, 2005b, Hanada e Watanabe, 1986). No entanto, os vírus, cuja contaminação ocorre pela ingestão de folhas de amoreira contaminadas, são os parasitas que mais preocupam os trabalhadores do setor. Estão divididos em quatro tipos: poliedrose nuclear (baculovírus), poliedrose citoplasmática (cypovírus), flacidez infecciosa (vírus F) e densovirose (parvovírus) (Watanabe, 2002).

O nucleopolyhedrovirus (NPV) é um dos grupos mais agressivos para *B. mori* e sua proliferação na população de lagartas pode ocorrer através da hemolinfa, fezes e regurgito das lagartas, que uma vez infectadas transmitem o vírus às outras lagartas. Também pode ser de forma vertical, de inseto para inseto, ou por intermédio de sua progênie (Khurad et al., 2004).

Brancahã (2002) fez a primeira descrição do BmNPV como um subgrupo múltiplo de *B. mori*. Desde então fomentam pesquisas para estabelecimento de técnicas de detecção e combate do vírus para auxiliar no controle da praga.

2.6. Baculovirus e *B. mori*

A descoberta ao baculovírus está diretamente relacionada ao desenvolvimento da indústria da seda, que se iniciou na china a cerca de 5.000. Como em outras atividades agroindustriais, a diminuição na produção era observada e atribuída a uma variedade de doenças ligadas a alguns patógenos e este problema precisava ser enfrentado para que a indústria da seda viesse a se expandir. Neste contexto, uma variedade de patógeno foi descrita e alguns métodos de combate a essas doenças foram desenvolvidos (Rohrmann, 2011).

Com o advento da microscopia de luz, alguns patógenos foram descritos. Uma das características proeminentes de um dos tipos de doenças foi a presença de corpos de oclusão encontrados em insetos infectados, comumente na forma de poliedros, e que levou à nomeação das doenças associadas a essas estruturas como “polyhedroses” em meados de 1800 (Rohrmann, 2011).

Os baculovírus, pertencente à família Baculoviridae, compreende um grande e diverso grupo que infecta insetos da ordem Lepidoptera, Hemiptera e Díptera

(Braconi, 2013). Quando associados ao controle de pragas, os baculovírus representam uma boa alternativa. No Brasil, alguns baculovírus são explorados para a eliminação de insetos-pragas, como no caso de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV), (Brancahão et al., 2002), que infecta os invertebrados e é específico aos seus hospedeiros (Moscardi, 1999). É encontrado em mais de 700 espécies de hospedeiros, em sua maioria Lepidópteros (Tanada e Kaya, 1993).

Inicialmente os baculovírus foram divididos em dois gêneros, nucleopolyhedrovirus (vírus de poliedrose nuclear - NPV) e Granulovirus (vírus de granulose - GV), classificação esta devido à morfologia encontrada nos corpos de oclusão. Porém desde 2008, a comunidade internacional divide a família Baculoviridae em quatro gêneros: os *Alphabaculovirus*, (NPVs específicos de lepidópteros), os *Betabaculovirus* (GVs específicos de lepidópteros), os *Gamabaculovirus* (NPVs específicos de hemípteras) e os *Deltabaculovirus*, que infectam dípteros (Braconi, 2013).

A forma infectante do vírus é o nucleocapsídeo. O genoma do baculovírus é constituído de DNA circular, rodeado por capsídeo proteico na forma de bastonete (Gomi et al., 1999). Os vírions, durante o ciclo de infecção, podem assumir duas formas diferentes. A primeira é responsável pela transmissão horizontal entre hospedeiros e pela infecção das células colunares do intestino médio da larva de insetos (Granados et al., 1986). A segunda, o vírus broto (não ocluso), é responsável pela propagação sistêmica da infecção, infectando inicialmente os hemócitos na hemolinfa e subseqüentemente espalhando a infecção para os demais tecidos do hospedeiro. O gênero *Alphabaculovirus* possui vírus com corpos de oclusão poliédrica e contém vários vírions. A proteína denominada poliedrina responde por aproximadamente 95% do seu conteúdo proteico (Maruniak, 1986) e apresenta peso molecular de 30.000 daltons (Summers et al., 1980).

Os corpos de oclusão representam uma forma de proteção, permitindo que os vírus desse gênero resistam a condições ambientais fora do hospedeiro. Até ocorrer a dispersão para a superfície das folhas de amoreira por meio da ação do vento, chuva ou outros artrópodes, podem permanecer em solos ácidos ou neutros por meses ou até anos. Em uma matriz proteica, a oclusão dos vírus garante a proteção de partículas infectantes, que são responsáveis pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a forma não ocluída possui a função de transmitir de célula para célula (Blissard e Rohrmann, 1990). Os genes responsáveis pela codificação

das proteínas de oclusão são bem conservados entre os baculovírus do mesmo gênero (Santos et al., 2010).

A infecção inicia quando o vírus, na forma de poliedros, chega ao intestino do inseto, por meio da ingestão de folhas de amoreira infectada. No lúmen do intestino, o vírus é submetido a um pH alcalino (pH 11) que por sua vez dissolve a poliedrina, liberando os vírions no trato digestivo. Os nucleocapsídeos penetram nas células epiteliais do intestino médio, via fusão de membrana (Horton e Burand, 1993), e são transportados ao núcleo, no qual perdem o envoltório proteico e, desta forma, ocorre a liberação do DNA durante o período de uma hora após a infecção.

A propagação do vírus para outros tecidos do hospedeiro inicia quando ocorre a replicação do genoma do vírus, que resulta na produção de vírus broto. Para isso, o vírus se utiliza do sistema traqueal, sistema este que apresenta contato direto com células epiteliais e outros tecidos, espalhando-se pelo corpo do inseto e tornando a infecção sistêmica (Engelhard et al., 1994).

A sintomatologia nos lepidópteros afetados, geralmente observada logo depois da ingestão de poliedros, consiste em mudanças morfológicas e comportamentais, podendo levar à morte do inseto (Kamita et al., 2005). Entre o segundo e o terceiro dia pós-infecção, os insetos diminuem a alimentação, o que freia seu crescimento. Prosseguindo o processo infeccioso, o inseto fica flácido e acaba morrendo. O exame do inseto morto revela hemolinfa leitosa e com a morte seu tegumento se rompe facilmente, liberando grande quantidade de poliedros no ambiente e infectando novos hospedeiros (Granados e Williams, 1986; Volkman e Keddie, 1990).

Algumas proteínas produzidas pelos baculovírus auxiliam no processo infeccioso. Na fase tardia é produzida a quitinase e a cisteína-protease, que atuam na dissolução dos tecidos do inseto, rompendo a cutícula larval e liberando os poliedros (Hawtin et al., 1997).

O BmNPV é o principal agente infeccioso em *B. mori*, representando uma ameaça à sericicultura. Ainda não é conhecido nenhum agente terapêutico para controlar a disseminação do vírus, sendo a única arma a prevenção, ou seja, organismos que apresentarem a infecção devem ser descartados o mais rápido possível para que não ocorra a propagação do vírus entre as lagartas de *B. mori* (Brancahã, 2002).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido reportados na busca de mecanismos para auxiliar no controle e detecção do BmNPV. Brancalhão (2002) trabalhou no desenvolvimento de uma técnica para detecção rápida e segura do vírus em microscópio óptico. Yao et al. (2003), amparado por características de resistência do *B. mori*, que são controladas por genes dominantes, propôs a utilização de marcadores moleculares para investigar estas características. Desta forma, a seleção assistida por meio destes marcadores poderia identificar genes relacionados à resistência. Khurad et al. (2004), em seus estudos, procurou determinar a transmissibilidade de BmNPV dos pais para progênie, indicando que a transmissão vertical ocorre, sendo desfavorável o uso de lagartas sobreviventes à infecção pelo nucleopolyhedrovirus para produção de ovos para comercialização.

2.7. Métodos de detecção e genética do BmNPV

A detecção do nucleopolyhedrovirus pode ser feita por diversos métodos. Brancalhão et al (1998) adaptou a técnica desenvolvida por Hamm, em 1966, para detecção rápida de BmNPV, a partir da hemolinfa do inóculo ou do filtrado obtido dos insetos. Outros métodos têm sido desenvolvidos, entre eles via microscopia, que permite a visualização de corpos de oclusão. Técnica bastante sensível e que apresenta bons resultados para a detecção da doença é o teste imunoenzimático (ELISA). Este método é capaz de detectar baixas concentrações do vírus por meio da mudança de cor, que indica a presença ou ausência de BmNPV (Vanapruk et al., 1992). A imunofluorescência também tem dado bons resultados. Neste método, um anticorpo fluorescente é utilizado e uma fluorescência é detectada no citoplasma de células infectadas, o que sugere que as proteínas do corpo de oclusão estão sintetizadas no citoplasma (Krywienczyk, 1963). A técnica de PCR com adaptações é também bastante utilizada para detecção do DNA viral em vários insetos infectados (Burand et al., 1992; Faktor e Raviv, 1996; Otta et al., 2003; Ikuno et al., 2004; Khumnoi, 2007; Galal, 2009).

Os baculovírus se apresentam como um grupo muito diverso de vírus. Seu genoma é composto de uma molécula de DNA circular dupla fita covalentemente fechada que varia de 80 a 180 Kb e codifica de 90 a 180 proteínas (Granados et al., 1986). Destes genes, um conjunto comum de cerca de 30 genes homólogos foram identificados e existem provavelmente outros que não puderam ser reconhecidos

por causa do grau de alterações incorporadas ao longo do tempo (Rohrmann, 2011).

Nos baculovírus melhor caracterizados, os vírions apresentam-se de duas formas: vírions oclusos e vírions enxertados. Embora estes dois tipos de vírions apresentem semelhanças na estrutura do nucleocapsídeo, eles diferem na origem e composição dos seus envelopes e as suas funções no ciclo de vida do vírus (Rohrmann, 2011).

Os membros da família Baculoviridae são caracterizados pela sua presença em corpos de oclusão, chamados poliedros para NPVs e grânulos ou cápsulas para GVs. Nos NPVs, os Polyhedros correspondem a cerca de 0.6 - 2 μM do NPV de diâmetro, enquanto os grânulos nos GVs, cerca de 0.2-0.4 μM , apresentando forma oval (Akerman e Smimoff, 1983).

A linhagem T3 vírus do NPV que infecta especificamente o *B. mori* foi totalmente sequenciado. Seu genoma é composto de 128.413 nucleotídeos e 40 % dos nucleotídeos correspondem à guanina e à citosina e apresentam 136 quadros de leitura abertos (ORFs). O material genético destes vírus está envolto por um capsídeo proteico (nucleocapsídeo) em forma de bastonete que forma o vírion e que caracteriza a partícula infectante (Summers e Smith, 1980).

2.8. Imunidade inata em insetos e o modelo *B. mori*

O grande sucesso dos insetos nos mais variados ambientes até mesmo repletos de competidores se dá pelo sistema imunológico de defesa inato. O sistema imunológico inato representa uma defesa contra partículas e/ou organismos estranhos, combatidos com mecanismos ou barreiras estruturais e fisiológicas (Bulet et al., 1999; Lavine e Strand, 2002). Mecanismos químicos, físicos ou biológicos representam a primeira linha de defesa dos insetos contra patógenos (Ikeda et al., 2013).

Existem barreiras de proteção muito eficientes nos insetos como a cutícula (exoesqueleto), o canal alimentar e o sistema respiratório (Bulet et al., 1999). Quando estas barreiras fisiológicas são rompidas, os micro-organismos atingem a hemocele, desencadeando outros mecanismos complexos ativados, a fim de combater a entrada de um patógeno. Estes mecanismos alternativos são conhecidos como celular e humoral (Ai et al., 2013).

As respostas celulares envolvem fagocitose, nodulação, encapsulação e citotoxicidade, guiadas por hemócitos celulares livres circulantes na hemolinfa (Silva, 2002), e a eficiência desta defesa é diretamente proporcional ao número e ao tipo de hemócitos relacionados a este mecanismo (Russo et al., 2001). Essa resposta pode ser direta por encapsulação ou fagocitose ou ainda indireta, envolvendo uma cascata complexa de serino-proteases e vias de sinalização intracelular imune que conduzem os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que podem ser as lisozimas (Ferrendon et al., 2007; Warr et al., 2008).

A resposta humoral é efetivada por AMPs produzidos pelo corpo gorduroso da larva e liberados na hemolinfa, ativando uma complexa cascata proteolítica que leva à coagulação e à mineralização da hemolinfa (Bogdan et al., 2000; Vass e Nappi, 2001; Lavine e Strand, 2002). Os peptídeos antimicrobianos são amplamente distribuídos nos organismos vivos desde os procariotos até os eucariontes superiores (Bulet et al., 2004), sendo classificados como peptídeos de baixo peso molecular, pois possuem massa entre 2 a 5 kDa, ativados contra micro-organismos (gram-positivos, gram-negativos e fungos) que invadem a hemolinfa (Kajhuria et al., 2011)

Estudos têm sido realizados a fim de mostrar a eficiência dos AMPs frente aos corpos estranhos presentes na hemolinfa, pois esta alternativa se torna uma ferramenta no combate a micro-organismos resistentes a antimicrobianos (Daffre et al., 2001; Marshall e Arenas, 2003). Atualmente, sabe-se que os micro-organismos demoram um tempo maior para desenvolverem resistência aos AMPs, levando a crer que estas moléculas são candidatas a antibiótico natural (Conlon et al., 2004). No modelo biológico *Drosophila melanogaster*, os mecanismos dos patógenos e ativação de vias de sinalização e regulação da expressão dos peptídeos de defesa são bem conhecidos (Kounatidis e Ligoxygakis, 2012).

Nos fluídos corpóreos dos insetos, existe uma variedade de fatores de defesa humoral, naturais ou induzíveis, sendo as defesas naturais constituídas por aglutininas, lisozimas, outras lisinas, bactericidas, enzimas lisossomais e fatores de imobilização. Após poucas horas da injeção de antígeno, os fatores induzíveis são verificados e tais fatores estão envolvidos no reconhecimento de partículas estranhas. Logo que há o reconhecimento de algum patógeno, as respostas de defesa são ativadas a fim de garantir a morte dos micro-organismos e a homeostase do sistema (Gotz e Boman, 1985; Ratacliff et al., 1985).

Lipídios na epicutícula no *Bombyx mori* atuam inibindo a invasão de fungos como *Beauveria bassiana* (Saito e Aoki, 1983). Danos na cutícula estimulam a síntese de peptídeos antibacterianos pelas células epidérmicas (Brey et al., 1993).

O conhecimento das respostas imunológicas desencadeadas pelos insetos pode fornecer informações valiosas para o delineamento de novas formas de controle biológico. O entendimento sobre a organização e regulação do sistema imune dos insetos tem sido ampliado, sobretudo devido a estudos relacionados à caracterização e à purificação de peptídeos antimicrobianos produzidos em resposta a infecções causadas por bactéria ou fungos em várias espécies de insetos, como as lagartas *Manduca sexta* (Russell e Dunn, 1996) e *Galleria mellonella* (Dunphy e Halwani, 1997) e o mosquito *Aedes aegypti* (Lowenberger et al., 1999), juntamente com as informações genéticas sobre *Drosophila melanogaster* (Han et al., 1998). Estas informações levaram ao reconhecimento de que os insetos possuem um sistema capaz de reconhecer um patógeno e ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e, a partir de sinais gerado por este processo, coordenar a expressão de vários genes ou reprimir a expressão de alguns genes (Franc e White, 2000).

Em alguns representantes da ordem Lepidóptera, o sistema imune é bem caracterizado, principalmente em *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Galleria mellonella* e *Spodoptera frugiperada*. Para essas espécies, foram descritos AMPs de todas as classes e os sistemas de ativação das vias imunes estão bem compreendidos em nível molecular (Kajhuria et al., 2011).

A grande maioria dos trabalhos envolvendo a imunidade inata dos insetos tem se concentrado em infecções bacteriana ou fúngicas (Ferrendon et al., 2007; Kanost et al., 2004). Mais recentemente, os estudos têm avançando sobre o mecanismo de defesas de insetos contra vírus de RNA (Lemaitre e Hoffmann, 2007; Steinert e Lavashina, 2011). A principal resposta conhecida nos insetos é mediada por RNA de interferência (RNAi) que, por meio do sistema enzimático Dicer2/R2D2, produz siRNAs que inibem a replicação viral (Kingsolver et al., 2013). Adicionalmente, a análise de expressão de genes relacionados à resistência ao BmNPV em linhagens resistentes de *B. mori* apontam para proteínas que poderiam estar envolvidas no mecanismo de defesa contra o vírus. Contudo, o mecanismo permanece ainda não esclarecido (Cheng et al., 2014).

2.9. Corpo gorduroso como o sítio de síntese de AMPs e proteínas antivirais

O tecido adiposo ou corpo gorduroso é um tecido de armazenamento e um importante órgão que participa da atividade metabólica dos insetos, produzindo e liberando proteínas, lipídios e carboidratos para a hemolinfa. Essas moléculas atuam como precursores para o metabolismo em outros tecidos (Keeley, 1985).

A estrutura e a organização do tecido gorduroso apresentam formas variáveis entre os diferentes grupos de insetos, sendo elas o tecido adiposo periférico ou subcuticular e o tecido adiposo visceral (Hauerland e Shirk, 1995). Ambos os tecidos realizam diferentes funções, tendo o tecido periférico a responsabilidade de armazenar nutrientes, enquanto o tecido adiposo visceral parece ser biossinteticamente mais ativo, o que, aliado à proximidade deste tecido com a hemolinfa, permite a intensa movimentação de moléculas necessárias aos processos metabólicos corporais (Dean e Lucke, 1985).

Entre as várias atividades metabólicas que o tecido adiposo desempenha está o metabolismo intermediário que, na hemolinfa, atua como um regulador, garantindo a homeostase do tecido. Também desempenha atividades específicas durante os estágios de desenvolvimento que envolve a produção, armazenamento e a liberação de nutrientes e metabólitos para atender às exigências nutricionais ou aos eventos metamórficos do inseto. (Hauerland e Shirk, 1995).

Possivelmente, devido às suas funções no metabolismo intermediário e no armazenamento de nutrientes, o tecido gorduroso é alvo preferencial na infecção pelo BmNPV (Granados, 1986; Bilimoria, 1991), representando um local rico em substratos e energia necessária à replicação viral (Chapman, 2012). Este tecido é o centro de origem de diversas proteínas importantes para os insetos, como as que estão envolvidas na reprodução (vitelogeninas), no controle hormonal (esterases), que degradam o hormônio juvenil, e também na resposta imunológica (lisozimas) (Keeley, 1985).

Recentemente, Ai et al. (2013) demonstraram que a larva de *Musca domestica* produz uma fração proteica denominada PEF (Fração enriquecida de proteínas) que tem atividade antiviral contra nucleopolyhedrovirus multicapsídeo.

Os insetos da ordem Lepidóptera também produzem proteínas com função antiviral, mas existem poucos relatos de trabalhos de proteínas com esta atividade em lepidópteros. O trabalho pioneiro foi desenvolvido por Hayashiya e Nishida

(1968); Hayashiya e Matsubara (1971). Nestes trabalhos, foi relatada a presença das proteínas vermelhas fluorescentes (RFP) em fluidos intestinais em *B. mori*, mas trabalhos com proteínas isoladas de corpo gorduroso do bicho-da-seda não existem. Ultimamente, em *B. mori*, foi relatada a proteína Sprouty que está envolvida na inibição da replicação do BmNPV (Jin et al., 2014).

2.10. Métodos proteômicos

Inicialmente, os métodos proteômicos realizados a partir de amostras biológicas mapeavam e determinavam o perfil proteico das proteínas existentes nesses materiais por meio de géis bidimensionais (Klose e O'farrell, 1975). Porém, devido a limitações tecnológicas da época, não era possível a identificação destas proteínas (Graves e Haystead, 2002). O sequenciamento foi possível devido a uma metodologia proposta por Edman, que possibilitou o sequenciamento de proteínas de amostras separadas por meio da técnica de gel bidimensional e criando um banco de dados de proteínas (Edman, 1949; Aebersold et al., 1987; Aebersold et al., 1988).

Com o avanço das técnicas proteômicas na década de 90, o método da espectrometria de massas substituiu o método de Edman. Este novo procedimento permite identificar a massa molecular por meio de correlação entre massa/carga de uma proteína e os peptídeos oriundos de sua fragmentação em um tempo muito curto e com excelente desempenho, dando confiabilidade aos resultados obtidos (Steen e Mann, 2004). Possibilitou, ainda, várias aplicações, como caracterizar proteínas expressas em um sistema, identificar todas suas isoformas e modificações pós-traducionais, as interações proteína-proteína entre outros (Wiese et al., 2007).

O espectrômetro de massa copensiste em uma fonte de íons, um analisador de massa, um detector e um sistema de aquisição de dados (Cantú et al., 2008), sendo MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) e ESI (Electrospray) as duas fontes de ionização mais utilizadas em um espectrômetro (Karas e Hillenkamp, 1988; Cantú et al., 2008).

Os peptídeos digeridos dos géis 2-DE são eluídos em ordem de hidrofobicidade e injetados no espectrômetro de massas. Em seguida, são ionizados com um alto potencial elétrico, de forma a preservar a estrutura polipeptídica, e os peptídeos ionizados transferidas para fase gasosa (Cantú et al., 2008; Steen e

Mann, 2004). Os peptídeos são vaporizados e conduzidos para um sistema de vácuo e posteriormente encaminhados para análise de massas: íon-traps, time-of-flight (TOF) (Aebersold e Mann, 2003; Cantú et al., 2008). O analisador de massa pode, ainda, ser acoplado em sequência, possibilitando que os íons separados pela relação massa/carga sejam fragmentados na próxima etapa e os íons, com maior intensidade e conseqüentemente mais informativos, são submetidos à dissociação por colisão (CID) de gás inerte (argônio, nitrogênio ou Hélio). O espectro final (MS/MS) então é detectado (Braconi, 2013).

Os espectros informativos contendo a relação massa/carga e a sequência do peptídeo são utilizados na busca em um banco de dados pelos programas Mascot, Masslynx, PptideSearch ou Sequest (Cantú et al., 2008). O software Mascot confronta os dados obtidos com uma biblioteca de dados de fragmentos teóricos já depositados no sistema (Braconi, 2013). Para tal identificação, o sistema do software promove um cálculo que envolve a probabilidade das massas/cargas de um fragmento prático e teórico coincidir de maneira aleatória, expresso como o negativo do logaritmo deste número, que é representado em score (Braconi, 2013).

Para a condução desse trabalho, os métodos proteômicos foram utilizados a fim de sequenciar spots de proteínas presentes nos géis bidimensionais de lagartas de *B. mori* desafiadas pelo vírus BmNPV. Apesar do grande impacto causado por este na produção de casulos de seda, poucos são os estudos aplicando ferramentas proteômicas em lagartas inoculadas com o BmNPV e estes dados obtidos poderiam auxiliar na detecção de proteínas envolvidas no combate ao BMNPV neste lepidóptero.

2.11. Proteína kin 17

A proteína kin17 foi descoberta em 1989 em células de ratos, utilizando anticorpos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Ângulo et al., 1989). Entre outras funções, a kin17 participa no reparo do DNA, de maneira que a mudança de uma ou mais bases seja amenizada ou silenciada, diminuindo danos que poderiam ser causados caso esse erro não fosse corrigido. Também em estudos posteriores, foi verificado que, além de reparo do DNA, essa proteína está relacionada ao processo de replicação do DNA (Despras et al., 2003; Mazin et al., 1994).

O gene da proteína kin17 é altamente conservado filogeneticamente entre os eucariontes, o que aponta para um importante papel dessa proteína para os organismos, sobretudo para o *B. mori*. Publicações recentes apontam genes ortólogos da kin17 em humanos, camundongo, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Brugia malayi* e *Schizosaccharomyces pombe* (Despras et al., 2003).

Técnicas de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica indicam que a proteína kin17 esta associada à cromatina, formando focos de replicação por toda extensão do nucleoplasma, parecido com o observado com outras proteínas envolvidas no processo de splicing de RNA, na replicação e no reparo do DNA. Uma hipótese relacionada à kin17 é de que ela possa participar como um fator na replicação do DNA, criando uma ponte entre a replicação e o reparo do DNA, mediada por complexos proteicos de alto peso molecular (Mazin et al., 1994; Kannouche et al., 2000; Despras et al., 2003; Masson et al., 2003; Miccoli et al., 2003).

Nos humanos, os genes da Kin17 estão localizados no cromossomo 10 (Ângulo et al., 1991), com aproximadamente 393 aminoácidos e massa molecular de 47 kDa, com um ponto isoelétrico de 9,3 (Kannouche et al., 2000). Quanto a sua distribuição nuclear, apresenta alterações dinâmicas entre a estrutura da cromatina e a matriz nuclear (Miccoli et al., 2003) e foi constatado que esta proteína está associada ao complexo multiprotéico de replicação do DNA, em conjunto com outras proteínas, como a RPA70, PCNA e DNA polimerase α . Complexos multiprotéicos isolados de células em cultura capazes de realizar replicação do DNA *in vitro* apresentam atividade reduzida quando a kin17 é inibida por imunodepleção.

Atualmente, essa proteína vem sendo estudada através de imunodeteção com anticorpos monoclonais, revelando em *B. mori* duas isoformas com peso molecular de 40 e 47 kDa, expressas em vários tecidos larvais e em células *Bm5* (Rando, 2013). Análises aplicando ferramentas proteômicas poderiam mostrar de forma clara a sequência da proteína e contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares que levaram ao surgimento das isoformas em *B. mori*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manejo do *Bombyx mori*

Os experimentos foram realizados no laboratório LORF da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em parceria com a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando híbridos comerciais de *B. mori* da empresa de Fiação de Seda - BRATAC S.A., localizada na cidade de Bastos, São Paulo. As lagartas foram criadas em condições de sanidade, em temperatura e umidade controlada. A temperatura das salas de criação foi ajustada a $28^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ de umidade relativa para a criação de lagartas do 1º ínstar, enquanto as lagartas do 2º ínstar foram mantidas a $27^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e com $85\% \pm 5\%$ de umidade relativa. As lagartas de *B. mori* do 3º, 4º e 5º ínstar foram criadas em $26^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ e com umidade relativa de $70\% \pm 5\%$. Iluminação artificial branca foi utilizada nas salas de criação para expor as lagartas de *B. mori* a 14 horas diárias de fotoperíodo com 10 horas de escuro.

Folhas de amoreira (*Morus* sp.) foram imersas em solução contendo (BmNPV) e outro grupo de lagartas foi alimentado com folhas de amoreira fresca. Antes e após o desafio, as lagartas foram tratadas com folhas não infectadas de amoreira. As caixas foram limpas diariamente, sendo que os restos de folhas e fezes foram retirados para melhoria das condições sanitárias da criação, dificultando assim a proliferação de doenças.

3.2. Inoculação viral

O inóculo do BmNPV foi obtido de lagartas de *B. mori* anteriormente infectadas (Brancahã et al., 2000). A suspensão viral do inóculo foi de $4,5 \times 10^7$ COPs/mL (COPs= corpos de oclusão poliédricos por mililitro). A inoculação foi realizada em lagartas de 5º ínstar, 24 horas após a ecdise, que se encontrava em jejum. As lagartas foram alimentadas com discos foliares de amoreira (2 cm de diâmetro), previamente pulverizados com 10 μL da suspensão viral de BmNPV, enquanto as pertencentes ao grupo controle foram alimentadas com discos foliares pulverizadas com água filtrada.

Terminada a alimentação, as lagartas, foram transferidas para caixas devidamente identificadas e mantidas em sala climatizada, onde permaneceram até o final do experimento, recebendo, diariamente, folhas de amoreira isentas de BmNPV.

3.3. Coleta do tecido gorduroso das lagartas

O corpo gorduroso das lagartas de *B. mori* foi dissecado no sétimo e oitavo dia do 5º ínstar após a infecção (DPI) e separados em 4 tubos, contendo PBS (4,3 mM, NaHPO₄ x 7 H₂O, 1.4 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl e 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.2) gelado. As amostras identificadas com os seguintes códigos: CGBMC7DPI (amostra do sétimo dia controle), CGBMI7DPI, (amostra do sétimo dia infectada), CGBMC8DPI (amostra do oitavo dia controle) e CGBMI8DPI (amostra do oitavo dia infectado). O mesmo foi feito com as lagartas não infectadas com o NPV, utilizadas como grupo controle. Os dias estabelecidos para a coleta do tecido gorduroso representam o auge da infecção.

O tecido foi lavado com PBS gelado, para completa remoção da hemolinfa e homogeneizado com pistilo em tubo eppendorf em 250 µL de PBS. Em seguida, o tecido foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4º C, durante 10 minutos. A separação das fases foi observada e a solução abaixo da camada lipídica foi coletada e armazenada em freezer - 80º C (Rando et. al., 2011; Brancalhão, 2002).

3.4. Extração proteica

Lipídios e contaminantes foram removidos do extrato proteico, de acordo com o protocolo de Wessel e Fugge (1984), com modificações, 250 µL do extrato proteico foi tratado com 1 ml de metanol 100%, 250 µL de clorofórmio e 750 µL de água milli Q, submetido a vortex por 30 segundos e centrifugado (11.000 rpm, 5 minutos, 4º C), formando um *pellet* de proteína. O sobrenadante da solução aquosa foi descartado, adicionado 1 ml de metanol para uma nova lavagem e posterior submissão a vortex por 30 segundos, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, por 5 minutos, a 4º C. O *pellet* resultante foi seco em capela, com fluxo ligado durante 40 minutos, e re-solubilizado em 300 µL de tampão de lise Buffer (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% CHAPS, 1% DTT). Para solubilização, estas amostras foram

submetidas a banho de ultrassom (Fisher Scientific), em amplitude de 50%, 60% durante 3 minutos respectivamente.

3.5. Quantificação das proteínas e eletroforese em gel SDS-PAGE

A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50mL de etanol 95% e, em seguida, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85%. A solução assim obtida foi avolumada para 1L com água deionizada. Após filtração em papel de filtro quantitativo (Whatman nº1), a solução foi mantida em geladeira. Utilizando soroalbumina bovina (BSA) para a construção da curva de calibração. Para determinar a concentração das amostras, utilizamos o leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384), com 50 µL de amostra por poço e adicionou-se 150 µL de Reagente de Bradford (composição). Após a solução ficou em repouso a temperatura ambiente durante 10 minutos, a leitura foi feita em comprimento de onda de 595nm.

3.6. Gel de eletroforese 1-DE

Eletroforese em gel de poli(acrilamida) unidimensional (SDS-PAGE) foi utilizado para a separação das proteínas, seguindo o método de Laemmli (1970), utilizando aparatos da BIO RAD para eletroforese. Para a preparação dos géis, foi utilizada uma solução de acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1. O gel de empilhamento a uma concentração de 4% (0,125 M de Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% de SDS) e o gel de separação a 12% (0,375M de Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% de SDS) em sistema de eletroforese Mini-Protein III (Bio Rad). O tampão de eletroforese foi Tris-glicina 1X (0,025 M Tris Base, 0,192 M de Glicina e 0,1 % de SDS). As amostras foram incubadas a 100° C, por 4min, e aplicadas ao gel. A separação eletroforética foi realizada a 100 volts. A realização da corrida com gel 1D teve a finalidade de verificar a integridade das proteínas no extrato proteico e a concentração das proteínas.

Após a eletroforese, o gel de poli(acrilamida) preparado foi mantido em solução de Coomassie brilliant blue (Sigma Aldrich), por no mínimo 1 hora, e depois

descolorado em solução de descoloração (contendo 50 ml de álcool absoluto, 10 ml de ácido acético glacial e 40 ml de água destilada) por 30 minutos.

3.7. Precipitação das amostras para a eletroforese 2- DE

O extrato proteico foi precipitado com acetona, com a finalidade de eliminar possíveis substâncias estranhas que pudessem interferir na exatidão dos resultados. O método consiste em adicionar acetona gelada a - 20° C, cerca de 4 X o volume da amostra, submeter a amostra a vortex por 30 segundos e deixar por 1 hora em freezer a - 20° C. Decorrido o tempo, a amostra foi centrifugada a 11.500 rpm, durante 10 minutos, ocorrendo sedimentação da amostra. O sobrenadante foi descartado, ficando somente o pellet no fundo do tubo de ensaio. A amostra ficou durante 40 minutos em capela de exaustão com o fluxo ligado para eliminar os resíduos de acetona do frasco.

3.8. Hidratação das tiras IPG

As tiras foram hidratadas, utilizando o produto da precipitação, ao qual foi adicionando 250 µL de Destreak solution Rehydration, 1.25 µL de IPG Buffer (pH 3 - 10) e 1.0 µL DTT 1M. A solução foi aplicada na canaleta do reswelling tray (Amershan), mergulhando a tira de IPG (pH 3 a 10) de 13 cm, com a face do gel voltada para baixo. O tempo de hidratação foi de 12 horas, para que a tira contendo o gel pudesse absorver toda a solução de hidratação com a amostra.

3.9. Focalização isoeletrica

As amostras foram separadas em quatro, contendo aproximadamente 500 µg de proteína total cada e aplicadas em tiras Immobiline Dry Strip pH 3-10, 13 cm (GE Healthcare). O software utilizado IPG Phor II para a focalização isoeletrica foi programado com 5 etapas, mantendo temperatura de 20° C e corrente máxima por tira de 50µA/ strip. Etapa 1: 200 V, 200Vhr; Etapa 2: 500 V, 500 Vhr; Etapa 3: Gradiente 1000 V, 8000 Vhr; Etapa 4 gradiente 8000 V, 11300 Vhr; Etapa 5: step 8000 V, 12000 Vhr. A voltagem acumulada foi de 24.800 volts.

3.10. Equilíbrio das tiras

Para equilibrar as tiras, foi utilizado tampão de equilíbrio (54,075 g de uréia, 7,5 ml de Tris HCL, 51,75 ml de glicerol, 3 gramas de SDS, 300 uL de Bromofenol para 100 ml de água). A solução resultante foi separada em dois tubos denominados de estoque 1 e 2. O primeiro tubo, estoque 1, foi adicionado 200 mg de DTT e 5 ml desta solução foram adicionados para cada tira, deixando esta solução em contato com a amostra durante 30 minutos, com agitação frequente. Decorrido o tempo, a solução com DTT foi descartada e, no tubo estoque, 2 foram adicionados 700 mg de iodocetamida e 5 ml desta solução foram adicionados a cada tira, durante 30 minutos, com agitação.

3.11. Eletroforese bidimensional (2-DE) e coloração dos Géis

A segunda dimensão foi realizada com a cuba RUBY (Amersham Biosciences) em Gel de Poliacrilamida 12,5 % em dois ciclos, a uma temperatura de 12° C. O primeiro ciclo consistiu em uma corrida de 40 minutos, com 150 Volts/gel, e uma amperagem de 15 mA/gel e a segunda etapa por 4 horas, com 150 V/gel e amperagem de 30 mA/gel. Após a eletroforese, todos os géis foram fixados por no mínimo uma hora. Os géis foram corados com Coomassie Coloidal G-250, de acordo com a descrição do fabricante, e a eletroforese foi feita em 4 géis simultaneamente.

Os géis foram escaneados pelo Image Scanner (Amersham Biosciences), visualizados no software Image Scanner (Amersham Biosciences) e analisados com o software ImageMaster 2D Platinum.

O corante com comassie coloidal foi feito segundo Neuhoff et al. (1988). Os géis foram imersos em 250 ml de solução, contendo 10% de sulfato de amônio, 2% de ácido fosfórico, 0,1% de comassie G-250 e 20% de metanol, nessa ordem, e deixados sob agitação de um dia para outro. Neste procedimento, as bandas (spots) devem aparecer sem a necessidade de descorante e somente foi feita a lavagem do gel em água para retirar o fundo azul do gel e adicionando ao final 1% de ácido acético para preservação do gel.

3.12. Tripsinização e extração de spots do gel de poliacrilamida para MS/MS

A retirada dos spots e a tripsinização das amostras foram realizadas conforme o protocolo estabelecido no laboratório de proteôma da Universidade Estadual de Cascavel (Unioeste). Os spots foram excisados do gel com micropipeta de 1 mL, cerca de 1 mm cúbico (1x1x1 mm) ou menores (mini gel). Os fragmentos do gel foram transferidos para um tubo de microcentrifuga, contendo 400 uL de acetonitrila 50% em 25mM de bicarbonato de amônio pH 8.0, deixado o gel em contato com essa solução por 15 minutos. Na sequência, foi removido o excesso de líquido com uma micropipeta e o mini gel foi lavado por mais duas vezes com 400 uL da mesma solução, totalizando 3 lavagens, até a descoloração completa dos spots.

Na sequência, foi acrescentado acetonitrila 100% em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel e, durante 5 minutos, decorrido o tempo, às amostras foram secas em capela de exaustão com fluxo ligado por 30 minutos. As amostras foram re-hidratadas com solução de tripsina (grau MS, 10ug/ml em 25mM bicarbonato de amônio, pH 8,0) e encubadas a 37° C, em banho seco, por 24 horas. Após a digestão, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante, contendo os peptídeos foi enviado para o laboratório de proteôma da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde o sequenciamento descrito abaixo foi realizado em colaboração com o professor Dr. Luciano Fernandes Huergo.

3.13. Sequenciamento por espectrometria de massas

A identificação dos aminoácidos da proteína foi realizada com auxílio de espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry) de acordo com Henzel et al. (1993). As amostras produzidas foram preparadas para análise de MALDI-TOF/TOF (Matrix assisted Laser Desorption ionized Time of Flight-timo of Flight) em um aparelho UltraFlex II MALDI-TOF/TOF. Cerca de 2 microlitros (ul) de amostra foram diluídos em solução de acetonitrila/ácido trifluoracético (TFA) 1:1 V/V. Em seguida, a solução foi homogeneizada em vortex e 0,5 uL foi aplicado no UltraFlex II (Bruker Datonics). As amostras foram secadas em temperatura ambiente e o espectro foi gerado em modo refletido, para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela tripsina, e em modo Lift, para re-fragmentação de íons para novo sequenciamento. Os íons

das amostras foram submetidos à irradiação automatizada, com o laser operando com potência modulada (de baixa para alta) e 200 tiros aleatórios, utilizando um método de procura hexagonal. Os espectros resultantes foram armazenados para posterior análise. Esta técnica analisa a massa dos fragmentos trípticos por meio do tempo de voo dos íons no espectrômetro e o padrão de massas obtido (Peptides Mass Fingerprint) é comparado em banco de dados para a identificação das proteínas.

As massas moleculares de peptídeos resultantes da digestão foram comparadas com perfis proteolíticos teóricos obtidos de sequência das bases de dados da internet, com programas específicos que permitem identificar proteínas idênticas ou altamente homologas. Os bancos de dados utilizados para identificação de proteínas são encontrados em servidores domésticos, mantidos e atualizados regularmente. Pesquisas em bancos de dados são executadas on-line ou localmente em réplicas de servidores privados. Os bancos são acessados por meio de servidores de consulta, como: Protein prospector, Prowl, peptide Serch, Mowse, Mascot, entre outros. Além da lista de massas dos peptídeos obtidos na impressão digital de proteínas, foram fornecidos outros parâmetros, como o agente de clivagem – tripsina, o estado de carga dos peptídeos, a forma de expressão das massas medidas e a tolerância de erro de ± 1 Da.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos recentes têm mostrado o perfil de proteínas expressas na hemolinfa e corpo gorduroso de *B. mori* em lagartas não desafiadas por vírus ou outros agentes entomopatogênicos (Pakkianathan et al., 2012).

Com o objetivo de visualizar as alterações na expressão das proteínas do tecido gorduroso de *Bombyx mori* inoculadas com BmNPV, análises proteômicas foram realizadas a partir de amostras coletadas de lagartas controle e inoculadas, no sétimo e oitavo dia do quinto ínstar. Esses períodos foram escolhidos por representarem o auge da infecção pelo patógeno e os sintomas encontrados nesse período já foram previamente descritos (Granados e Willians, 1986). O gel 1-DE (Figura 2) mostra a integridade das amostras de proteína total coletadas do corpo gorduroso das lagartas no 5º ínstar de desenvolvimento, as quais foram utilizadas nos experimentos 2-DE.

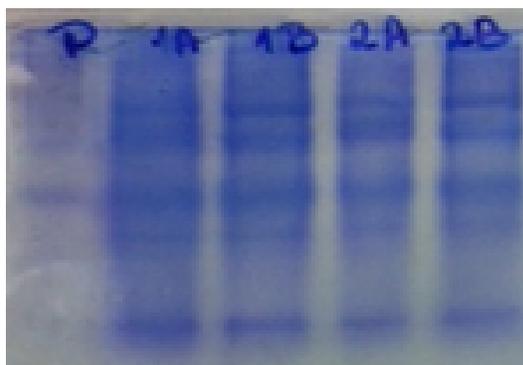


Figura 2 - Gel 1-De, P, padrão de peso molecular, 1 A, amostra sétimo dia controle, 1 B, amostra sétimo dia infectada com BmNPV, 2 A, amostra oitavo dia controle, 2 B, amostra oitavo dia infectada com BmNPV.

Inicialmente, os géis (gel 2-DE, das 4 amostras) foram escaneados e as imagens analisadas com auxílio do software imageMaster (Amershan Biosciences), para verificar a diferenciação no padrão de spots. Esse software permite delimitar nos géis, regiões onde se pode adicionar o ponto isoelétrico (pI) e padrão de peso molecular adicionado na corrida. Como resultados, foram identificadas diferenciações no padrão de proteínas que podem estar relacionadas a proteínas antimicrobianas ou antivirais envolvidas no processo de defesa do inseto.

O resultado obtido a partir do ImageMaster aponta para a amostra do sétimo dia infectada (Figura 3), como a amostra que apresenta maior diferenciação no padrão de expressão proteica. Este resultado é reforçado quando comparado com a amostra do sétimo dia controle evidenciado na Figura 4, o que poderia ser relacionado com a condição fisiológica imposta pela infecção do BmNPV. Desta forma, alguns spots identificados na Figura 3 abaixo foram selecionados para a sequenciamento, uma vez que o número de spots separados neste gel 2-DE foi elevado.

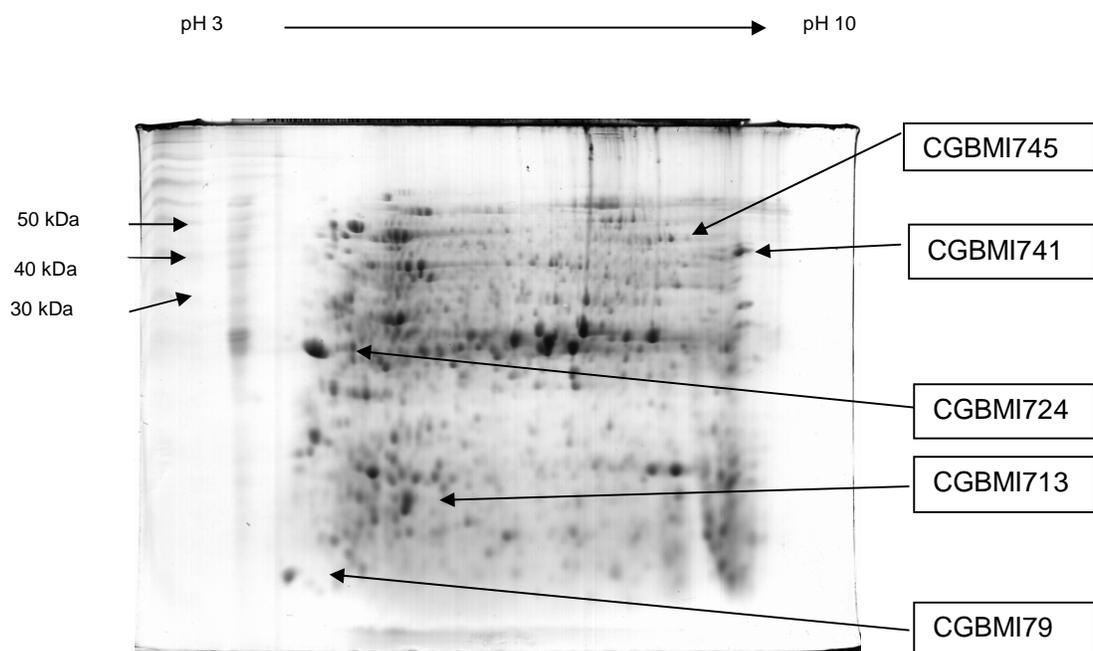


Figura 3 - Gel 2-DE, poliacrilamida 12.5 %, de lagartas do sétimo dia após a infecção com o vírus BmNPV. Padrão de peso molecular ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa). Spot CGBMI79 peso molecular 9 kDa, pI 3.76, spot CGBMI713, peso molecular 13 kDa, pI 5.13, spot CGBMI724, peso molecular 24 kDa, pI 4.11, spot CGBMI741, peso molecular 41 kDa, pI 9.60, spot CGBMI745 peso molecular 45 kDa, pI 8.63.

Outro fator que implicou na seleção dos spots foi a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI), que estavam também próximos do pI e da massa molecular da proteína kin17, proteína envolvida na replicação e reparo do DNA, nas células infectadas do *B. mori* (Kannouche et al., 2000).

A proteína kin17 é altamente conservada nos eucariontes, o que indica uma atividade funcional em processos biológicos básicos, atuando no reparo e em focos de replicação do DNA. Acredita-se que a expressão desta proteína esteja relacionada ao estresse celular, o que pode incluir a infecção por algum agente patógeno. Esta proteína foi descoberta em 1989 em células de ratos, graças a anticorpos policlonais monoespecíficos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Ângulo et al., 1989). Os spots CGBMC746 (amostra do sétimo dia controle) (Figura 4) e CGBMI745 (7ºDPI) (Figura 3) apresentam ponto isoelétrico e massa bem próximos e foram selecionados por estarem próximos da massa molecular e pl da kin17.

Os spots CGBMI724, CGBMI713, CGBMI79 da amostra do 7ºDPI indicados na Figura 3 não são encontrados no gel da amostra do sétimo dia controle (Figura 4). Desta maneira, por estarem presentes na amostra infectada, estas proteínas podem estar envolvidas no processo de imunidade do inseto, atuando como proteínas de defesa, apesar de não terem sido caracterizadas como tal, mas pelo fato de estarem sendo expressas nas lagartas infectadas.

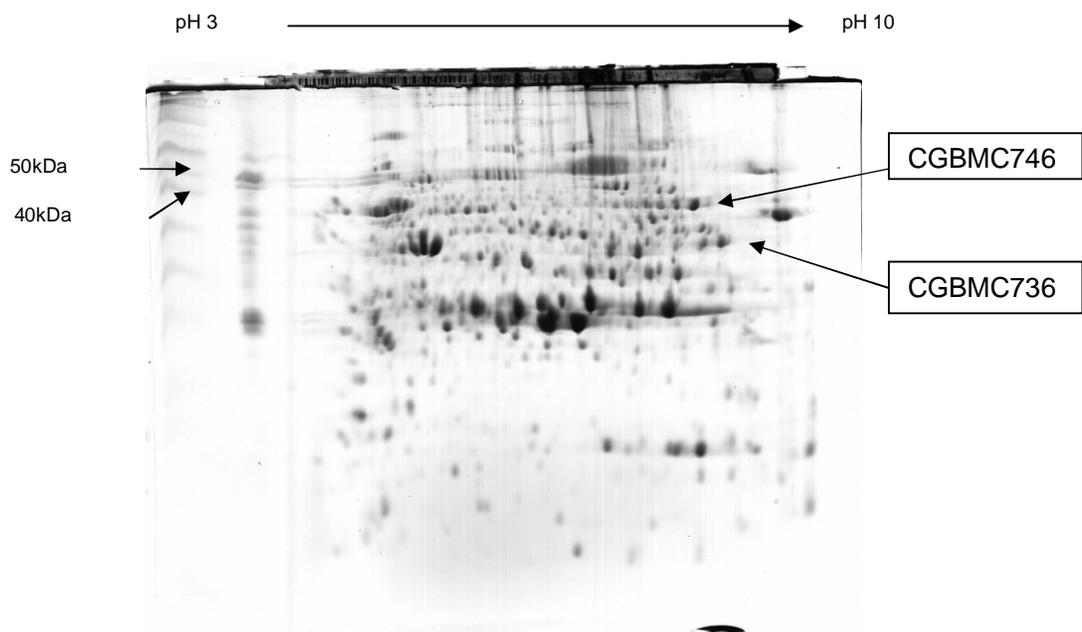


Figura 4 - Gel 2-DE, poliacrilamida 12.5 %, de lagartas do sétimo dia, controle. Padrão de peso molecular Color Plus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa). Spot CGBMC736 Peso molecular 36 kDa, pI 9.17, spot CGBMC746, peso molecular 46 kDa, pI 8.84.

Os géis 2-DE das Figuras 5 e 6 não apresentaram diferenças significativas no número de spots e na diferenciação de spots. Isso pode ser explicado pelo fato de que, no 8º dia, as lagartas que restaram, número bem inferior ao do início da análise, podem estar se recuperando ou podem ser resistentes ao vírus. Ainda nas Figuras 5 e 6, por não apresentarem uma diferenciação tão expressiva nos spots, foram selecionados os spots CGBMC846 e CGBMC844 (Figura 5), spot CGBMI844 e CGBMI841, com tamanho e pI próximos da kin17.

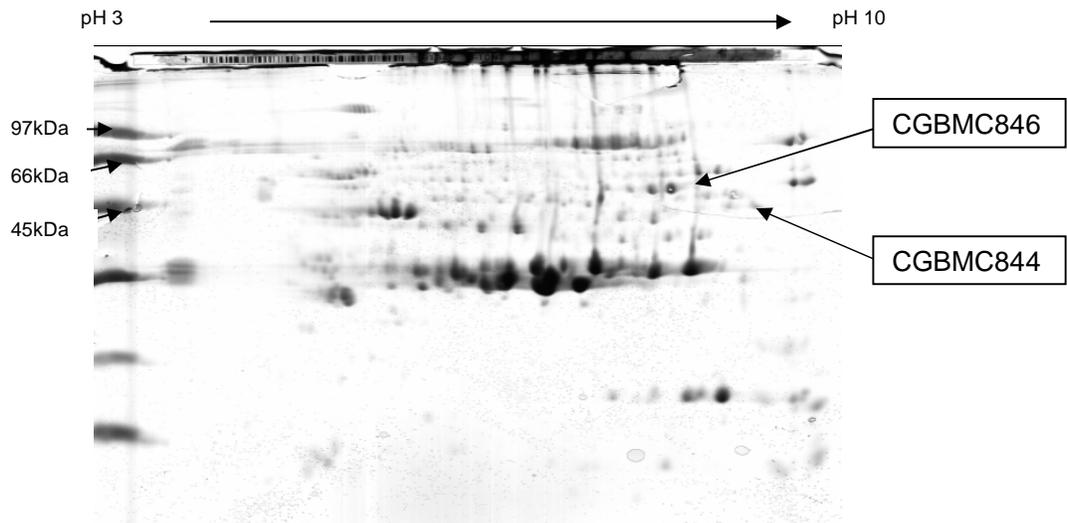


Figura 5 - Gel 2-DE, poliacrilamida 12.5%, de lagartas do oitavo dia, controle. Marcador de massa molecular LMW (GE lifesciences): (14,4-97 kDa). Spot CGBMC844, peso molecular 44 kDa, pI 8.61, spot CGBMC846, peso molecular 46 kDa, pI 9,30.

Destes spots, o CGBMI841 (8ºDPI) (Figura 6), gerou uma identificação de proteína não caracterizada e com função desconhecida pela busca na base de dados. Esta proteína tem peso molecular de 41 kDa e ponto isoelétrico de 9.60, números próximos da proteína kin17. Contudo, permanece ainda sem identificação experimental de sua atividade biológica.

Para averiguar se essas proteínas visualizadas nos géis 2-DE estavam relacionadas a proteínas antivirais ou se havia outras proteínas possivelmente relacionadas ao stress provocado pelo BmNPV, as amostras tripsinizadas foram enviadas à Universidade Federal do Paraná para realização do sequenciamento por

meio da técnica de MALDI TOF/TOF. O Quadro 1 apresenta os spots selecionados a partir dos géis 2-DE e seus respectivos números de identificação.

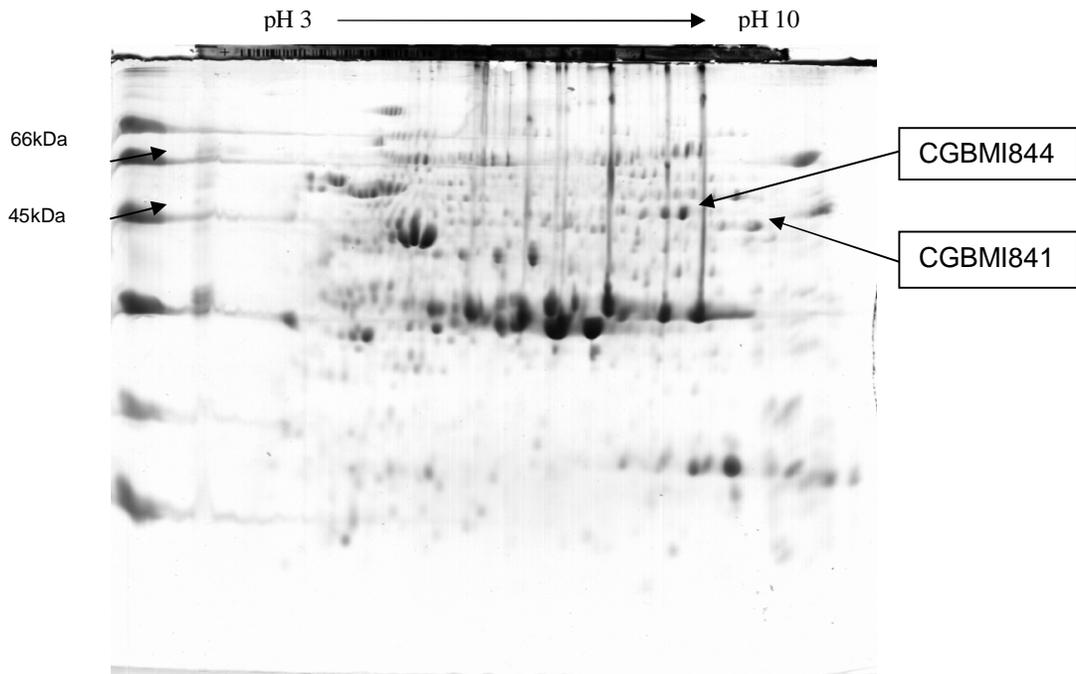


Figura 6 - Gel 2-DE, poliacrilamida 12.5 %, de lagartas do oitavo dia após a infecção com o vírus BmNPV. Marcador de massa molecular LMW (GE lifesciences): (14,4-97 kDa). Spot CGBMI841, peso molecular 41 kDa, pI 9.60, spot CGBMI844, peso molecular 44 kDa, pI 8.73.

O sequenciamento mostrou que apenas três spots geraram identificação: amostra CGBMI741 (spot 6 *), do sétimo dia pós-infecção (7^oDPI), CGBMC844 (spot 8*), do oitavo dia controle, e a amostra CGBMI841 (spot 11*), do oitavo dia pós-infecção (8^oDPI).

O spot CGBMI741 (7^o DPI) (6*) foi identificado como fator de alongação 1-alpha (Elongation factor 1-alpha), que promove a ligação de aminoacil-RNA_t aos ribossomas durante a biossíntese de proteínas dependentes de GTP. Este spot foi identificado com a ferramenta Mascot, como mostra a Figura 7, e identificadas no ID UNIPROT e no NCBI.

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: gi|299152244

elongation factor 1-alpha [Bombyx mori]

Database: NCBIInr
 Score: 121
 Expect: 4.2e-05
 Nominal mass (M_r): 36617
 Calculated pI: 8.22
 Taxonomy: [Bombyx mori](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|299152244 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: peaklist.xml
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Mass values searched: 17
 Mass values matched: 8

Protein sequence coverage: 37%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 KEAQEMGKGS FRYAWVLDKL KAERERGIII DIALWKFETS KYVVTIIDAP
51 GHRDFIRNMI TGTSQADCAV LIVAAAGTGEF EAGISEKNGQT REHALLAFTL
101 GVKQLIVGVN KMDSTPEPPYS EPRFEEIKKE VSSYIRKIGY NPAAVAFVPI
151 SGWHGDNMLE PSTKMPWFKG WQVERKEGKA DGKCLIEALD AILPPARPTD
201 KPLRLPLQDV YKIGGIGTVP VGRVETGVLK PGTIIVVEAPA NITTEVKSVE
251 MHHEALQEAV PGDNVGFNVK NVSVKELRRG YVAGDSKNNP PRGAADFTAQ
301 VIVLNHPGQI SNGYTPVLDC HTAHIACKFA EIKEK
  
```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
45 - 54	1067.6510	1066.6437	1066.5672	72	0	K.VHPAFANVGR.T
55 - 62	930.6063	929.5990	929.5083	98	0	R.TAGVQIWR.I
71 - 83	1673.7998	1672.7925	1672.8110	-11	0	R.NNLSWDIHWIGR.E
84 - 112	2943.5308	2942.5235	2942.4370	29	1	R.ESTQDESGAAAILTVGLDDKFGGAAVQHR.E
248 - 264	1908.7880	1907.7807	1907.8021	-11	0	K.DLVPDESTGGDDQEFER.N
316 - 325	1249.6840	1248.6767	1248.6251	41	0	K.NYPSWVQVTR.V
337 - 343	1047.5900	1046.5827	1046.4974	81	0	K.QYFETWR.D

No match to: 1837.8977, 2029.0818, 2717.1572

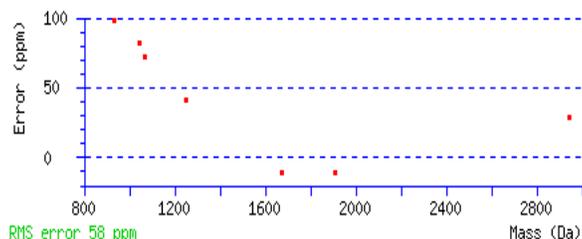


Figura 7 - Resultado do software Mascot a partir do spot CGBMI741 (6*). Os resíduos de aminoácidos mostrados em vermelho deram homologia significativa com a proteína fator de elongação 1-alfa o espectro dos fragmentos obtidos no Mascot.

O spot CGBMC844 (oitavo dia controle) (8*) foi identificado pelo ID UNIPROT como proteína não caracterizada de *B. mori* (Uncharacterized protein OS=*Bombyx mori*) e no NCBI como fator de crescimento disco imaginal (imaginal disk growth factor [*Bombyx mori*]) (Figura 8).

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: gi|152061158

imaginal disk growth factor [*Bombyx mori*]

Database: NCBIInr
 Score: 98
 Expect: 0.0092
 Nominal mass (M_r): 48134
 Calculated pI: 7.64
 Taxonomy: [Bombyx mori](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|152061158 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: peaklist.xml
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Mass values searched: 14
 Mass values matched: 7

Protein sequence coverage: 24%

Matched peptides shown in **bold red**.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
71 - 82	1400.8773	1399.8700	1399.7307	99.6	0	K.LVSLNENLDIDR.T
163 - 173	1271.7308	1270.7236	1270.6459	61.2	0	R.STWGSLWHGIK.K
253 - 266	1638.9326	1637.9253	1637.7685	95.8	0	K.EADYTAPIYTPQNR.N
267 - 288	2332.3550	2331.3477	2331.1495	85.0	0	R.NPLQNADAAVTYWLTSGAPSQK.I
289 - 298	1076.7510	1075.7437	1075.6390	97.4	0	K.IVLSIATFGR.T
371 - 393	2463.2542	2462.2469	2462.0874	64.8	0	R.LPDDNGEGGIWVSYEDPDTAGQK.A
401 - 416	1704.0599	1703.0527	1702.8890	96.1	0	K.NLGGVAIVDLSLDDFR.G

No match to: 861.5208, 1075.5874, 1392.8737, 1732.9891, 2187.3037, 2605.5483, 3020.9111

Error: try setting browser cache to automatic.

Figura 8 - Resultado do software Mascot a partir do spot CGBMC844 (8*). Os resíduos de aminoácidos mostrados em vermelho deram homologia significativa com a proteína fator de crescimento disco imaginal o espectro dos fragmentos obtidos no Mascot.

Quadro 1- Amostras de corpo gorduroso de *B. mori*, relação dos spots, peso molecular e ponto isoelétrico dos spots das amostras de tecido gorduroso do sétimo e oitavo dia infectada e controle

Número dos spots	Número das tiras	Ponto isoelétrico estimado	Peso molecular (kDa) estimado
CGBMC746 (1)	81851	8,84	46
CGBMC736 (2)		9,17	36
CGBMI79 (3)		3,76	9
CGBMI713 (4)		5,13	13
CGBMI724 (5)	97394	4,11	24
CGBMI741 (6) *		9,50	41
CGBMI745 (7)		8,63	45
CGBMC844 (8) *	81849	8,61	44
CGBMC846 (9)		9,30	46
CGBMI844 (10)	818550	8,73	44
CGBMI841 (11) *		9,60	41

O spot CGBMI841(8ºDPI) (11*) também foi identificado como uma proteína não caracterizada de *B. mori* (Uncharacterized protein OS=*Bombyx mori*) por meio do UNIPROT. N NCBI não gerou identificação, como também observado na Figura 9.

A literatura mostra que estudos têm sido realizados na tentativa de buscar métodos profiláticos contra patógenos que acometem o *B. mori*. Um método utilizado procurou mostrar a ação do extrato aquoso de *Mirabilis jalapa* sobre o controle do vírus da poliedrose (BmNPV), conferindo 100% de proteção ao inseto (Porto et al., 2005). Recentemente, outros trabalhos têm sido reportados no mesmo sentido, como o trabalho desenvolvido por Brancalhão et al. (2013), no qual foi testada a utilização de formulado de sódio a fim de avaliar a ação antiviral deste frente ao BmNPV.

Uma maneira mais eficiente no combate contra agentes patogênicos talvez seja entender como ocorre o processo de defesa do organismo contra esses patógenos. Nesse sentido, poucos são os estudos relacionados a proteínas de defesa ou antivirais.

Em um recente trabalho publicado por Ai et al. (2013), envolvendo proteínas antivirais, os resultados obtidos a partir de extrato de proteínas enriquecidas da lagarta de *Musca domestica* L mostraram bioatividade deste extrato contra os vírus da gripe aviária H9N2, nucleopolyhedrovirus em *M. domestica* (AcMNPV) e nucleopolyhedrovirus em *B. mori* (BmNPV). Este extrato apresenta um grande

potencial para ser um antiviral natural, imunomodulador e um agente antioxidante para explorar no futuro.

{MATRIX} Mascot Search Results

Protein View

Match to: [tr|H9IWX2|H9IWX2_BOMMO](#) Score: 105 Expect: 6.1e-007
 Uncharacterized protein OS=*Bombyx mori* PE=4 SV=1
 Found in search of peaklist.xml

Nominal mass (M_z): 39352; Calculated pI value: 7.81

NCBI BLAST search of [tr|H9IWX2|H9IWX2_BOMMO](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: 10
 Number of mass values matched: 7
 Sequence Coverage: 26%

Matched peptides shown in **Red**

```

1 MKIIFSCLLF VLLGSVWART ATKPQEISGP ITSLSDKNAR DKAKVHPAFA
51 NVGRTAGVQI WRIQTSDNR NNLSWDIHYW IGRESTQDES GAAAILTVGL
101 DDKFGGAAVQ HRETMGHESA LFLSYFQTPL NYLEGGNPSG FNHVVTNAGA
151 QKRMFQVKGK RDVVRVQVDP QIASMNKGDV FVLDDLNDIY VEVGEKAKNV
201 EKLKAISFAN QVRDQDHHGR GRVDIVDKYS SDVDVQKFFT ALGSGVKDLV
251 PDESTGGDDQ EFERNEASN ILSEVSDATG KIKVTPLSKP FKQENLSPQE
301 KSQAMTKAQE LLNAKNYPSW VQVTRVLQNT EPAAFKQYFF TWRDFGMSHS
351 RVI
  
```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
45 - 54	1067.6510	1066.6437	1066.5672	72	0 K.VHPAFANVGR.T
55 - 62	930.6063	929.5990	929.5083	98	0 R.TAGVQIWR.I
71 - 83	1673.7998	1672.7925	1672.8110	-11	0 R.NNLSWDIHYWIGR.E
84 - 112	2943.5308	2942.5235	2942.4370	29	1 R.ESTQDESAAAAILTVGLDDKFGGAAVQHR.E
248 - 264	1908.7880	1907.7807	1907.8021	-11	0 K.DLVPDESTGGDDQEFER.N
316 - 325	1249.6840	1248.6767	1248.6251	41	0 K.NYPSWVQVTR.V
337 - 343	1047.5900	1046.5827	1046.4974	81	0 K.QYFFTR.D

No match to: 1837.8977, 2029.0818, 2717.1572

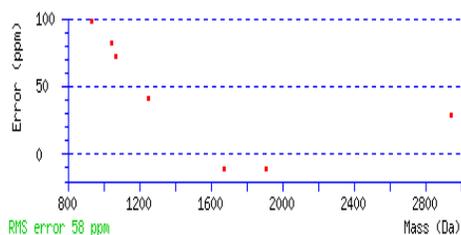


Figura 9 - Resultado do software Mascot a partir do spot CGBMI841 (11*). Os resíduos de aminoácidos mostrados em vermelho deram homologia significativa com uma proteína não caracterizada de *B. mori* o espectro dos fragmentos obtidos no Mascot.

A caracterização de proteínas com esse potencial ativo poderia servir para auxiliar no combate a doenças causadas por vírus, por exemplo, na construção de um híbrido comercial que poderia expressar esta proteína em maior quantidade e, desta forma, atuar de maneira mais incisiva no processo de defesa do organismo, diminuindo a mortalidade. Mais do que diminuir ou eliminar o parasitismo em *B. Mori*, estes dados poderiam auxiliar a ciência na criação de novos agentes microbianos, como foi o caso da penicilina e de outros agentes antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

A disseminação do BmNPV em populações cultivadas de *B. mori* tem causado enormes perdas na produção de casulos do bicho-da-seda e conseqüentemente grandes prejuízos para a indústria da seda. O combate contra esses agentes patogênicos se torna uma ferramenta para diminuir os prejuízos. No entanto, existem poucos métodos disponíveis, sendo o descarte dos indivíduos o método mais eficiente utilizado no combate ao vírus (BmNPV).

Sabe-se que os insetos se utilizam de vários mecanismos de defesa, dificultando a entrada de micro-organismos. Para isso, apresentam uma série de barreiras físicas muito eficientes, embora estas barreiras possam ser rompidas e os vírus atingirem a hemocele, desencadeando outros mecanismos de defesa como resposta humoral, guiando proteínas antivirais para atuar contra a sistematização da infecção.

Entender mecanismos de defesa utilizados pelo organismo para combater certas doenças é muito importante. Por isso, este estudo se concentrou em detectar proteínas do sistema imune ou proteínas com potencial antiviral, ou seja, proteínas que estejam diretamente envolvidas ou que aumentam a expressão durante o processo de infecção. Estas proteínas poderiam ser caracterizadas oferecendo base de dados para novos estudos.

Em nosso estudo, utilizamos gel 2-DE para amostra de lagartas contaminadas com o vírus BmNPV e controle, do sétimo e oitavo dia de infecção. Essas amostras foram comparadas com as amostras controle. Os resultados mais significativos foram visualizados na amostra infectada 7ºDPI. Os spots foram retirados do gel por meio da técnica de tripsinização, mas não revelaram nenhuma proteína com característica antiviral por meio do sequenciamento dos peptídeos.

Além dos spots retirados da amostra do sétimo dia infectado e sétimo dia controle, foram retirados spots das outras amostras do oitavo dia infectada e controle. O padrão de proteínas expressas no oitavo dia foi quase o mesmo, comparando infectada e controle. Ainda no oitavo dia, restaram poucas lagartas vivas. Esses insetos restantes, apesar de não apresentarem tantas diferenças no perfil de proteínas podem ser resistentes ao vírus, apesar de estarem ainda bem doentes neste mesmo dia.

Neste trabalho, apesar de ter sido realizada a padronização da análise proteômica do tecido, não foram obtidos resultados satisfatórios no que se refere a proteínas antivirais ou proteínas do sistema imune inato e que poderiam estar envolvidas na resposta ao vírus BmNPV. A proteína Kin17, que seria um dos alvos do estudo, não foi evidenciada. As hipóteses prováveis sinalizam para o fato de ou anticorpo comercial disponível não apresentar reatividade com essa proteína em *B. mori*, ou, o mais provável, em insetos, a kin17 não se expressar em quantidades consideráveis, conforme evidenciado para *Drosophila melanogaster* (D.V.B. Freitas, comunicação pessoal). Ainda assim, o foco deste estudo foi a identificação das proteínas com massa molecular e pI próximos da Kin 17 e também em proteínas que foram diferencialmente expressas.

O tempo de análise dos spots não foi o suficiente, pois, além dos spots retirados dos géis, ficaram alguns candidatos nos próprios géis para sequenciamento na Universidade Federal do Paraná para detecção de novas proteínas. Por fim, são necessárias análises adicionais, assim como aperfeiçoar a técnica de proteômica empregada para a detecção de prováveis proteínas envolvidas na resposta do tecido gorduroso ao BmNPV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.H.; LEAVITT, J.; SAAVEDRA, R.A.; HOOD, L.E.; KENT, S.B. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, 84:6970-6974, 1987.

AEBERSOLD, R.H.; PIPES, G.; HOOD, L.E.; KENT, S.B. N-terminal and internal sequence determination of microgram amounts of proteins separated by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, 9:520-530, 1988.

AEBERSOLD, R.H.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422:198-207, 2003.

AI, H.; WANG, F.; ZHANG, N.; ZHANG, L.; LEI, C. Antiviral, immunomodulatory, and free radical scavenging activities of a protein-enriched fraction from the larvae of the housefly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Science**,13:112, 2013.

AKERMANN, H.W.; SMIRNOFF, W.A. A morphological investigation of 23 baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, 41:269-280, 1983.

ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, 24:401-416, 2003.

ÁLVAREZ, F.A.; LÓPEZ, A.E.C. **Sericicultura**. Madri: Ediciones Díaz de Santos, 2003. 231p.

ANGULO, J.F.; MOREAU, P.L.; MAUNOURY, R.; LAPORTE, J.; HILL, A.M.; BERTOLOTTI, R.; DEVORET, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. **Mutation Research**, 217:123-134, 1989.

ARUGA, H. **Silkworm and its Strains**. Oxford: CRC Press, 1994. 367p.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, INC, 1991. p. 72.

BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.P. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, 35:127-155, 1990.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion Immunology**, 12:64-76, 2000.

BRACONI, C.T. **Proteoma do baculovírus *Anticarsia gemmatilis* múltiplo nucleopolihedrovirus em linhagens celulares distintas e comparação da proteína de envelope GP64 em variantes geográficas**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. 119p. Tese (Doutorado em Ciências).

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

BRANCALHÃO, R.M.C. **Nucleopolyhedrovirus em *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), no Estado do Paraná**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná NOME DA INSTITUIÇÃO, 1998. 99p. (Doutorado em Ciências Biológicas).

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. Taxonomia e citopatologia causada por nucleopolyhedrovirus em células de *Bombyx mori*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002.

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C.; TORQUATO, E.F.B.; FERNANDEZ, M.A.; MUNHOZ, R.E.F.; COLOMBELLI, K.T.; COSTA, T.R.G. Avaliação antiviral do formulado de sódio dicloroisocianurato contra o nucleopoliedrovírus do bicho-da-seda. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80:233-235, 2013.

BREY, P.T.; LEE, W.J.; YAMAKAWA, M.; KOIZUMI, Y.; PERROT, S.; FRANÇOIS, M. ASHIDA, M. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction o cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90:6275-6279, 1993.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative immunology**, 23:329-344, 1999.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, 198:169-184, 2004.

BURAND, J.P.; HORTON, H.M.; RETNASANI, S.; ELKINTON, J.S. The use of polymerase chain reaction and shortwave UV irradiation to detect baculovirus DNA on the surface of gypsy moth eggs. **Journal of Virological Methods**, 36:141-150, 1992.

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

CHAPMAN, R.F.; SIMPSON, S.J.; DOUGLAS, A.E. **The insect structure and function**. New York: Cambridge University Press, 2012. 929p.

CHENG, Y.; WANG, X.Y.; DU, C.; GAO, J.; XU, J.P. Expression analysis of several antiviral related genes to BmNPV in different resistant strains of silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Science**, 14:76, 2014.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Casulo de seda: proposta de preço mínimo safra 2006/2007**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/bbda844ec2556cb34cfe42fefe06b502..pdf>. p.128-131. Acesso em: 20, dezembro, 2014.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Casulo de seda: Proposta de preço mínimo safra 2013/2014**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_inverno_13_14.pdf. p.33-77. Acesso em: 15, dezembro, 2014a.

CONLON, J.M.; SEIDEL, B.; NIELSEN, P.F. An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog *Rana dalmatina*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology e Pharmacology**, 137:191-196, 2004.

CORRADELLO, E.F.A. **Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio a trama de um segredo milenar**. São Paulo: Icone, 1987. 101p.

DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M.; BULET, P.; SILVA JUNIOR, P.; MACHADO, A.; FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; PEREIRA, L.S.; FÁZIO, M.A.; ESTEVES, E.; BURGIERMAN, M.R. Peptídeos Antibióticos. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**. 2001. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio17/17_pa.pdf. Acesso em: 14, dezembro, 2014.

DAIMON, T.; KATSUMA, S.; SHIMADA, T. Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, 124:168-175, 2007.

DEAN, R.L.; LOCKE, M.; COLLINS, J.V. Structure of the fat body. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. p. 155-210.

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CRÉMINON, C. Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research**, 159:748–758, 2003.

DINGLE, J.G.; HASSAN, E.; GUPTA, M.; GEORGE, D.; ANOTA, L.; BEGUM, H. **Silk production in Australia**. Gatton: RIRDC Contact Details. 2005. 105 p. Disponível em: <https://rirdc.infoservices.com.au/items/05-145>. Acesso em: 10, Janeiro, 2015.

DUNPHY, G.B.; HALWANI, A. Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Journal of Insect Physiology**, 43:383-391, 1997.

EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. **Arch biochem**, 22:475, 1949.

ELIESEEFF, V. Approaches old and new to the silk roads. In: **The silk roads: highways of culture and commerce**. Paris: UNESCO, 1998. p. 1-127.

ENGELHARD, E.K.; KAM-MORGAN, L.N.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, 91:3224-3227, 1994.

FAKTOR, O.; RAVIV, D. A polymerase chain reaction for the detection of nucleopolyhedroviruses in infected insects: the fate of the *Spodoptera litoralis* virus in *Locusta migratoria*. **Journal of Virological Methods**, 61:95-101, 1996.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: Miller, L.K. (ed.). **The Baculoviruses**. New York:Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.F.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B, GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. Utilização da biotecnologia na sericultura brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35:56-61, 2005.

FERRENDON, D.; IMLER, J.L.; HETRU, C.; HOFFANN, J.A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews immunology**, 7:862-874, 2007.

FRANC, N.C.; WHITE, K. Innate recognition in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. Special issue: Innate recognition systems in host defense. **Microbes and Infection**, 2:243-250, 2000.

GALAL, F.H. Universal primer for early and rapid detection of nucleopolyhedroviruses of multiple species using polymerase chain reaction **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, 1:57-64, 2009.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annual Review of Entomology**, 50:71-100, 2005.

GOLDSMITH, S.K.; PELLMAR, T.C.; KLEINMAN, A.M.; BUNNEY, W.E. **Reducing suicide: a national imperative**. Washington: National Academy Press, 2002. 496p.

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, 80:1323-1337, 1999.

GÖTZ, P.; BOMAN, H.G. Insect immunity. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Great Britain: Pergamon Press, 1985. p. 453-485.

GRANADOS, R.R. **The biology of baculoviruses**: Practical application for insect control. Florida: CRC Press, 1986. 276p.

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. p. 89-108.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and molecular biology reviews**, 66:39-63, 2002.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (eds.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

HAMM, J.J. A modified Azan staining technique for inclusion body viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, 8:125-126, 1966.

HAN, Z.S.; ENSLEN, H.; HU, X.D.; MENG, X.J.; WU, I.H.; BARRETT, T.; DAVIS, R.J.; IP, Y.T. A conserved p38 mitogenactivated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. **Molecular and Cellular Biology**, 18:3527-3539, 1998.

HANADA, Y.; WATANABE, J.K. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Curitiba: Cocamar, 1986. 224p.

HAUNERLAND, N.H.; SHIRK, P.D. Regional and functional differentiation in the insect fat body. **Annual Review of Entomology**, 40:121-145, 1995.

HAWTIN, R.E.; ZARKOWSKA, T.; AMOLD, K.; THOMAS, C.J.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, 238:243-253, 1997.

HAYASHIYA, K.; MATSUBARA, F. Comparative experiments with the silkworm larvae reared on mulberry leaves and artificial diets: comparison of antiviral activities

in the digestive juice of larvae reared on natural and artificial diets. **Text Scientific**, 6:87-100, 1971.

HAYASHIYA, K.; NISHIDA, J. Inactivation of nuclear polyhedrosis virus in the digestive of larvae reared on natural and artificial diets. **Journal Applied Entomology and Zoology**, 12:189-193, 1968.

HENZEL, W.J.; BILLECI, T.M.; STULTS, J.T.; WONG, S.C.; GRIMLEY, C.; WATANABE, C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90:5011-5015, 1993.

HORTON, M.H.; BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, 67:1860-1868, 1993.

HUANG, J.K.; LI, M. Silk protein fiber biomaterials and tissue engineering. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, 18:127-130, 2004.

IKEDA, M.; YAMADA, H.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. **Virology**, 435:1-13, 2013.

IKUNO, A.A.; MARGATHO, L.F.F.; HARAKAVA, R.; AKAMATSU, M.A.; MARTINS, E.M.F.; PORTO, A.J.; FERREIRA, V.C.A. Direct application of the new PCR protocol for evaluation and monitoring of *Bombyx mori* infection by nucleopolyhedrovirus. **Arquivos do Instituto Biológico**, 71:309-315, 2004.

JIN, S.; CHENG, T.; JIANG L.; LIN, P.; YANG, Q.; YANG, X.; TAKAHIRO, K.; QINGYOU, X. Identification of a New Sprouty Protein Responsible for the Inhibition of the *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus Reproduction, **PLoS One**, 9(6):e99200, 2014.

KAMITA, S.G.; NAGASAKA, K.; CHUA, J.W.; SHIMADA, T.; MITA, K.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S.; HAMMOCKM, B.D. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host.

Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 102:2584-2589, 2005.

KANNOUCHE, P.; MAUFFREY, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MATTEI, M.G.; SARASIN, A.; DAYA-GROSJEAN L.; ANGULO, J.F. Molecular cloning and characterization of the human kin17 cDNA encoding a component of the UVC 48 response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis**, 21:1701-1710, 2000.

KANOST, M.R.; JIANG, H.; YU, X.Q. Innate immune responses of a lepidopteran Insect *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**, 198:97-105, 2004.

KARAS, M.; HILLENKAMP, P. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, 60:299-2301, 1988.

KEELEY, L.L. Physiology and biochemistry of the fat body. In: KERKUT, G.A.J.; GILBERT, L.I. (eds.) **Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. p. 211-248.

KELLOGG, V. Insect Breeding. **Journal of Heredity**. 1:133-135, 1910.

KHAJURIA, C.; BUSCHMAN, L.; CHEN, M.; ZUREK, L.; ZHU, K.Y. Characterization of six antibacterial response genes from the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larval gut and their expression in response to bacterial challenge. **Journal of Insect Physiology**, 57:345-355, 2011.

KHUMNOI, S. **Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in Thai mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)**. Bangkok: Kasetsartv University, 2007. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

KHURAD, A.M.; MAHULIDAR, A.; RATHOD, M.K.; RAI, M.M.; KANGINAKUDRU, S.; NAGARAJU, J. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, 87:8-15, 2004.

KINGSOLVER, M.B.; HUANG, Z.; RICHARD, W.H. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. **Journal molecular biology**, 425:4921-4936, 2013.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, 26:231-243, 1975.

KOUNATIDIS, I.; LIGOXYGAKIS, P. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. **Open Biology**, 2:120075, 2012.

KRISHNASWAMI, S.; NARASIMHANNA, M.N. **Sericulture manual 2- silkworm rearing**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1979. 131p.

KRYWIENCZYK, J. Demonstration of nuclear polyhedrosis in *Bombyx mori* L by fluorescent antibody technique. **Journal of Invertebrate Pathology**, 5:309-317, 1963.

KURIN, R. The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. **Smithsonian Institution**, 21:1-24, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.

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

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review Immunology**, 25:697-743, 2007.

LOWENBERGER, C.A.; SMART, C.T.; BULET, P.; FERDIG, M.T.; SEVERSON, D.W.; HOFFMANN, J.A.; CHRISTENSEN, B.M. Insect immunity: molecular cloning, expression and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, 8:107-118, 1999.

MARSHALL, S.H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, 6:271-284, 2003.

MARTINEZ, L.; ALMAGRO, J.C.; COLL, J.L.; HERRERA, R.J. Sequence variability

in the fibroin-H intron of domesticated and wild silk moths. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34:343-352, 2004.

MARUNIAK, J.E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (eds.). **The biology of baculoviruses**. Flórida: CRC Press, 1986. p. 129-146.

MASSON, C.; MENAA, F.; PINON-LATAILLADE, G.; FROBERT, Y. Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1:616-620, 2003.

MAZIN, A.; MILOT, E.; DEVORET, R.; CHARTRAND, P.; Kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. **Molecular Genetics & Genomics**, 244:435-438, 1994.

MICCOLI, L.; BIARD, D.S.F.; FROUIN, I. Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. **Nucleic Acids Research**, 31:4162-4175, 2003.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review entomology**, 44:257-89, 1999.

MUNHOZ, R.E.F. **Variabilidade genética em raças e híbridos simples de *Bombyx mori* L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 106p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. **Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses**. Philadelphia: Raven Publishers, 1995. 586p.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics - progress and prospects. **Current Science**, 83:411-425, 2002.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear

background at nanogram sensitivity using Commassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, 9:255-262, 1988.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal Biology chemistry**, 250:4007-4021, 1975.

OOMENS, A.G.; BLISSARD, G.W. Requirement for GP64 to drive efficient budding of autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Virology**, 254:297-34, 1999.

OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNSAGAR, I. Detection of monodon baculovirus and whites pot syndrome virus in apparently healthy *Penaeus monodon* post larvae from India by polymerase chain raction. **Aquaculture**, 220:59-67, 2003.

PAKKIANATHAN, B.C.; SINGH, N.K.; KRISHAN, M.; KONIG, 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*. **BMC Biochemistry**, 13:5, 2012.

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, VC.A.; MARGATHO, L.F.F. Avaliação biológica e produtiva do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com folhas de amoreira pulverizadas com extrato de *Mirabilis jalapa*. **Arquivo do Instituto de biologia**, 72:445-453, 2005.

RANDO, F.S.; ANDRADE, T.L.S.M.; PASSOS, K.J.R.; GASPARGAS, V.P.; PATTARO JUNIOR, J.; CANEZIN, P.H.; FERNANDEZ, M.A. Kin17 stress protein detection in *Bombyx mori* L. larval tissues. In: XL ANNUAL MEETING OF BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY. Foz do Iguaçu: 2011. **XL Annual Meeting of SBBQ 2011**. São Paulo: The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011. p. 44-44.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGEALD, S.W.; RHODES, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**, 97:183-279, 1985.

ROHRMANN, G.F. **Baculovirus molecular biology**. Corvallis: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2011. 188p.

RUSSELL, V.; DUNN, P.E. Antibacterial proteins in the mid gut of *Manduca sexta* during metamorphosis. **Journal of Insect Physiology**, 42:41-52, 1996.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Hemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, 47:167-172, 2001.

SABIN, L.R.; HANNA, S.L.; CHERRY, S. Innate antiviral immunity in *Drosophila*. **Current Opinion Immunology**, 22:4–9. 2010.

SAITO, T.; AOKI, J. Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces of two lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) (Deuteromycetes: Moniliales). **Applied Entomology and Zoology**, 2:225-233, 1983.

SANTOS, S.A.; SILVA, J.L.C.; BALANI, V.A.; SEIXAS, F.A.V.; FERNANDEZ, M.A. Conserved baculoviral ORFs 10 and 14 from *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 1:457-470, 2010.

SEAB. SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANA. **Análise da conjuntura agropecuária - Safra 2009/2010**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/file/florestais/textos_tecnicos/produtosflorestais_2009_10.pdf. Acesso em: 18, dezembro, 2014.

SEAB. SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANA. **Sericicultura no estado do Paraná: Safra 2012/13 - Relatório Takii**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Sericicultura_2012_13.pdf. Acesso em: 12, dezembro, 2014.

SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M. **Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm**. Bangkok: Unescap, 1990. 88p.

SERVOLI, E.; MANIGLIO, D.; MOTTA, A.; PREDAZZER, R.; MIGLIARESI, C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. **Macromolecular Bioscience**, 5:1175-1183, 2005.

SILVA, C.C.A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, 4:68-72, 2002.

SILVA, D.O. **Transformações no espaço rural do Norte pioneiro paranaense: estratégias de resistência e/ou permanência dos agricultores familiares no município de Jacarezinho/PR**. Presidente Prudente: Universidade Estadual Paulista, 2008. 284p. Tese (Doutorado em Geografia).

SINGH, C.P.; VAISHNA, R.L.; KAKKAR, A.; ARUNKUMAR, K.P.; NAGARAJU, J. Characterization of antiviral and antibacterial activity of *Bombyx mori* seroin proteins. **Cellular Microbiology**, 16:1354–1365, 2014.

SOUZA, M.L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 21:8-31, 2001.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nature reviews molecular cell biology**, 5:699-711, 2004.

STEINERT, S.; LEVASHINA, E.A. Intracellular immunity responses of Dipteran insects. **Immunological Review**, 240:129–140, 2011.

SUMMERS, M.D.; SMITH, G.E.; KNELL, J.D.; BURAND, J.P. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **Journal of Virology**, 34:694-703, 1980.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect Pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. 666p.

TORQUATO, E.F.B.; MIRANDA NETO, M.H.; BRANCALHÃO, R.M.C.; VALDENI, S.F. Nucleopolyhedrovirus: scanning electron microscopy technique. **Neotropical Entomology**, 35:787-790, 2006.

VANAPRUK, P.; ATTATHOM, T.; SANBATSIRI, K.; ATTATHOM, S. Comparison of methods for the detection of nuclear polyhedrosis virus in silkworm, *Bombyx mori* Linn. In: 30th KASETSART UNIVERSITY ANNUAL CONFERENCE. Bangkok, 1992. **Proceedings**. Bangkok: Kasetsart University, 1992. p. 237-243.

VASS, E.; NAPPI, A.J. Fruit fly immunity. **BioEssays**, 51:529-535, 2001.

VOLKMAN, L.E.; KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, 1:249-256, 1990.

WANG, X.; HU, X.; DALEY, A.; RABOTYAGOVA, O.; CEBE, P.; KAPLAN, D.L. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release. **Journal of Controlled Release**, 121:190-199, 2007.

WANG, Y.; KIM, H.J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. **Biomaterials and Stem Cells**. 27:6064-6082, 2006.

WARR, E.S.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. The gram-negative bacteria binding protein gene family: its role in the innate immune system of *Anopheles gambiae* and in anti-plasmodium defense. **Insect Molecular Biology**, 17:39-51, 2008.

WATANABE, H. Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. **Current Science**, 83:493-446, 2002.

WEISE, S.; REIDEGELD, K.A.; MEYER, H.E.; WARSCHEID, B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. **Proteomics**, 7:340-350, 2007.

WESSEL, D.; FUGGE, U. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Analytical Biochemistry**, 138:141-143, 1984.

YAO, Q.; LI, M.W.; WANG, Y.; WANG, W.B.; LU, J.; DONG, Y.; CHEN, K.P. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). **Journal of Applied Entomology**, 127:134-136, 2003.

ZANETTI, R. **Bicho-da-seda, notas de aula de ENT 100 – Sericicultura**. Disponível em: <http://www.den.ufla.br/professores/ronald/disciplinas/notas%20<aula/sericicultura%20bichodaseda.pdf>. DEN/UFLA, 2005a. Acesso em: 16, dezembro, 2014.

ZANETTI, R. **Doenças e pragas do bicho-da-seda, notas de aula de ENT 100 – Sericicultura**. Disponível em: <http://www.den.ufla.br/professores/ronald/disciplinas/>

notas%20aula/sericultura%20doencasbicho.pdf. 2005b. Acesso em: 21, dezembro, 2014.

ZHONG, W.Y.; HOGAN, R.J.; HAIGH, J.D. Three-dimensional radiative transfer in mid latitude cirrus clouds. **Quarterly Journal of Meteorological Society Real**, 134:199-215, 2008.

ZHOU, C.; RAO, Y.; RAO, YI. A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. **Nature Neuroscience**, 11:1059-1067, 2008.

ZUROVEC, M.; YANG, C.; KODRIK, D.; SEHNAL, F. Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. **The Journal of Biological Chemistry**, 25:15423-15428, 1998.