**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Regulação do hospedeiro *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera:
Noctuidae) pelo parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead)
(Hymenoptera: Ichneumonidae): abordagens transcritômica e proteômica**

Bruna Laís Merlin

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

Bruna Laís Merlin
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Regulação do hospedeiro *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)
pelo parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae):
abordagens transcritômica e proteômica**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Merlin, Bruna Laís

Regulação do hospedeiro *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)
pelo parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae):
abordagens transcritômica e proteômica / Bruna Laís Merlin. - - Piracicaba, 2013.
86 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Controle Biológico 2. Fisiologia de insetos 3. Ichnovirus 4. Regulação hospedeira
I. Título

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Salete e Sérgio, que me incentivam e estão sempre ao meu lado, e ao meu irmão Bruno, por ser também um de meus melhores amigos;

Aos meus queridos avós, vó Nair, nono Tone e nono Tista, que do céu iluminam meus passos, e a minha vó Nene, que há de me ver realizar muitos sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fazer acreditar em mim e me dar força e coragem para nunca desistir.

Aos meus pais, que são o exemplo que sigo e a quem eu quero dar meu melhor. Espero que eu nunca os decepcione e continue melhorando e dando alegrias.

Ao Prof. Dr. Fernando L. Cônsoli, que me ensinou muito do que sei hoje. A cada reunião, me sentia mais desafiada a aprender e a cada problema que encontrei para a realização deste trabalho, pude contar com o apoio e a paciência de meu orientador. Muito obrigada.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, pelas ótimas aulas e ajuda em momentos importantes, especialmente ao professor Dr. José R.P. Parra.

A todos os meus colegas, com os quais frequentei aulas, realizei trabalhos e me diverti um pouco também. A Pós-Graduação não seria a mesma sem a companhia de vocês.

Ao meu colega Rogério, com o qual dividi as angústias de se trabalhar com RNA-Seq e qPCR e com o qual construí uma grande amizade. Obrigada por se tornar meu amigo e ouvir o chororô diário!

Aos meus colegas de laboratório que estiveram presentes diariamente nestes dois anos. Em especial ao Dr. Guilherme D. Rossi, que teve uma paciência gigante para me ensinar todo o procedimento de análise proteica, e à Dra. Lígia H. Arruda, que passou horas a fio me explicando e discutindo a melhor forma de realizar meus experimentos com a qPCR.

As minhas queridas amigas que fiz durante o mestrado: Aline S. Guidolin, Aline Peruchi e Fernanda A. Müller. Obrigada pelos momentos divertidos, pelos almoços e caminhadas engraçadas, pelos fins de semana animados, pela amizade sincera. E ao meu amigo Felipe A. Domingues, que conheço desde o primeiro dia de estágio na Entomologia e com o qual passei bons momentos diários. Obrigada, vocês são muito especiais para mim.

As minhas amigas de graduação, Aline M. von Hertwig, Cecília K. de Assis, Gabriela H. da Silva, Laura I. Dalloca e Marília H. Reichert, por todos os momentos de diversão, intrigas (por que não?) e amizade, em especial à Xili, por ser mais que uma amiga e compartilhar comigo a vida piracicabana.

As minhas “roommates” Débora R. de Godói e Andréia A. Erdmann, por me suportarem nos bons e maus dias, além de compartilhar comigo as gordices noturnas.

Aos meus amigos conchenses, Natália R. Franckim, Laura M. L. de Oliveira, Mariana Ribeiro, André Amaro, Paulo H. Milanezi, e Tarsila Franckin, que são excepcionais amigos. Perdoem-me se estive ausente nos últimos tempos.

A todos que me ajudaram na realização deste trabalho e que, por ventura, não mencionei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos concedida (Processo: 2012/13703-7).

EPÍGRAFE

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquentada e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem...”
(Guimarães Rosa)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Interação parasitoide-hospedeiro	21
2.2 Regulação hospedeira	22
2.3 Ação de fatores maternos na regulação da expressão gênica do hospedeiro.....	24
2.4 Utilização de técnicas de sequenciamento de nova geração.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Criação e manutenção de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Campoletis flavicincta</i>	29
3.2 Parasitismo de <i>S. frugiperda</i> por <i>C. flavicincta</i>	29
3.3 Efeitos do parasitismo no proteoma da hemolinfa de <i>S. frugiperda</i>	29
3.3.1 Coleta de hemolinfa.....	29
3.3.2 Análise das alterações quantitativas de proteínas na hemolinfa de <i>S. frugiperda</i>	30
3.3.3 Análise das alterações qualitativas no padrão proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em meio desnaturante	30
3.4 Análise dos efeitos do parasitismo no transcrito de <i>S. frugiperda</i> via RNA-Seq.....	31
3.4.1 Coleta e extração de RNA de <i>S. frugiperda</i>	31
3.4.2 Enriquecimento do conteúdo de mRNA da amostra	32
3.4.3 Expressão gênica diferencial do hospedeiro durante o início do desenvolvimento do parasitoide.....	32
3.4.3.1 Análise das sequências e da expressão diferencial.....	33
3.4.3.1.1 Processamento das sequências obtidas para análise de RNA-Seq	33
3.4.3.1.2 Construção de transcrito <i>de novo</i>	34
3.4.3.1.3 Expressão diferencial de transcritos	34
3.4.4 PCR quantitativa de transcritos selecionados da análise de RNA-Seq	35
3.4.4.1 Desenvolvimento de iniciadores específicos.....	35
3.4.4.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	35

3.4.4.3 PCR quantitativa em tempo real	36
3.4.5 Identificação de transcritos virais expressos durante o início do desenvolvimento do parasitoide <i>C. flavicincta</i> no hospedeiro <i>S. frugiperda</i>	37
3.4.5.1 Construção de transcrito <i>de novo</i>	37
3.4.5.2 Identificação de transcritos virais	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Efeito do parasitismo no proteoma da hemolinfa de <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
4.1.1 Análise quantitativa	39
4.1.2 Análise qualitativa - SDS-PAGE	40
4.2 Efeitos do parasitismo no transcrito de <i>S. frugiperda</i>	42
4.2.1 Processamento dos dados de sequenciamento	42
4.2.2 Construção de transcrito <i>de novo</i>	43
4.2.3 Análise da expressão diferencial de transcritos dos tecidos do hospedeiro durante o desenvolvimento inicial do parasitoide	43
4.2.4 Confirmação da expressão gênica diferencial de transcritos selecionados do hospedeiro durante o desenvolvimento inicial do parasitoide por PCR quantitativa em tempo real	60
4.2.5 Identificação e expressão diferencial de transcritos virais no transcrito de lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas por <i>C. flavicincta</i>	62
5 DISCUSSÃO	67
5.1 Efeitos do parasitismo de <i>S. frugiperda</i> por <i>C. flavicincta</i> no proteoma do hospedeiro ...	67
5.2 Efeitos do parasitismo de <i>S. frugiperda</i> por <i>C. flavicincta</i> no transcrito do hospedeiro	70
5.3 Identificação de genes virais	72
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Regulação do hospedeiro *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) pelo parasitoide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae): abordagens transcritômica e proteômica

Parasitoides cenobiontes manipulam o crescimento e o desenvolvimento de seus hospedeiros visando colonizá-los e adequá-los nutricionalmente as suas próprias exigências nutricionais. Nesse processo de manipulação, parasitoides interferem com o funcionamento molecular e celular de seus hospedeiros, alterando inúmeros processos fisiológicos. Assim, este projeto buscou avaliar o efeito do parasitismo por *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) na atividade de transcrição gênica e de síntese de proteínas em larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes estágios de desenvolvimento do parasitoide. O estudo envolveu a análise comparativa do transcrito de lagartas de *S. frugiperda* via sequenciamento de nova geração (RNASeq – Illumina) e a validação dos resultados obtidos por PCR em tempo real (qPCR), além de incluir análise da composição quantitativa e qualitativa de proteínas disponíveis na hemolinfa do hospedeiro via análise em SDS-PAGE. Análises das alterações proteicas na hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* induzidas pelo parasitismo por *C. flavicincta* foi realizada após 1, 3, 5, 7, e 9 dias do parasitismo (DAP). Foi verificado aumento significativo na concentração de proteínas na hemolinfa de lagartas parasitadas 3, 5 e 9 DAP, a síntese precoce de proteínas de 180 kDa e 75 kDa e sua manutenção até o final do desenvolvimento do parasitoide. Porém, não foi possível a visualização de proteínas específicas do parasitismo. As análises de expressão gênica diferencial foram concentradas nos estágios iniciais do parasitismo (06, 24 e 72 h após o parasitismo) e resultou na identificação de 1.189 transcritos expressos diferencialmente, dos quais 72,7% foram inibidos pelo parasitismo, sendo encontrados transcritos em quatro grupos funcionais importantes ao desenvolvimento do parasitoide: *i*) metabolismo de carboidratos; *ii*) proteínas de armazenamento, *iii*) síntese e degradação de hormônios e *iv*) respostas imunológicas. A expressão diferencial encontrada pela análise de RNA-Seq foi validada pela análise por qPCR de transcritos selecionados. Análises adicionais de montagens de transcrito *de novo* também permitiram a identificação de 22 transcritos associados ao vírus de poli-DNA simbiote associado a *C. flavicincta*, os quais representavam quatro famílias gênicas virais: “*anquirina viral*”, “*elemento repetido*”, “*motivo-cisteína*” e “*família-N*”. Esses transcritos apresentaram padrão específico de expressão temporal, sendo os transcritos de anquirina virais e de proteínas de motivo-cisteína os mais abundantes.

Palavras-chave: Controle Biológico; Fisiologia de insetos; Ichnovirus; Regulação hospedeira

ABSTRACT

Regulation of the host *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) by the parasitoid *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae): transcriptomic and proteomic approach

Koinobiont parasitoids regulate the growth and development of their hosts in order to colonize and adequate their host to their own nutritional needs. Parasitoids interfere with several physiological processes at the molecular and cellular levels to regulate their hosts. Thus, this project evaluated the effects of the parasitization by *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) on gene expression and protein availability at different stages of parasitization of larvae of the host *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Comparative gene expression was carried out by RNA-Seq analysis using next-generation sequencing tools (Illumina), with data validation by quantitative real time PCR (qPCR). Protein availability in the host hemolymph was checked by colorimetric and SDS-PAGE assays. Protein changes in the hemolymph were verified throughout parasitoid development at 1, 3, 5, 7 and 9 days after parasitization. The parasitoid induced an increase in the total concentration of proteins from day 3 to 9, and induced the precocious synthesis of two proteins (180 kDa and 75 kDa) and their maintenance in the hemolymph until the end of parasitoid development. No parasitism specific proteins were detected. Differential gene expression analysis was concentrated at early parasitization (06, 24 and 72 h), and allowed the identification of 1.189 differentially expressed transcripts. The majority of these transcripts (72.7%) were down-regulated in parasitized larvae as compared to the non-parasitized. Analysis of the differentially expressed transcripts led to the identification of functionally important transcripts for the parasitoid development, belonging to *i*) sugar metabolism, *ii*) storage proteins, *iii*) hormone synthesis and degradation, and *iv*) immune response. qPCR experiments using selected transcripts validated the differential expression observed in RNA-Seq experiments. Additional analysis using the *de novo* transcriptome assembly also led to the identification of 22 transcripts associated with the genome of the polydnavirus of *C. flavicincta* distributed in four gene families: *vankyrin*, *repeated-element*, *cysteine-motif* and *N-family*. These transcripts had specific temporal patterns of expression, with the transcripts from vankyrins and cysteine-motif being the most abundant.

Keywords: Biological control; Insect physiology; Ichnovirus; Host regulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) disponíveis na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas ou não por *Campoletis flavicincta*, após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo - DAP). “*” indica a existência de diferença estatística na concentração total de proteínas de lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP), dentro de cada período amostral, pelo teste t ($p < 0,05$) 40

Figura 2 – Padrão proteico da hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas (P) ou não (NP) por *Campoletis flavicincta*, após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 3, 5, 7 e 9 dias), determinado em 4-20% SDS-PAGE. Marcador molecular (M): 200 kDa – miosina; 116,2 kDa – β -galactosidase; 97,4 kDa – fosforilase b; 66,2 kDa – soro albumina; 31 kDa – anidrase carbônica; 21,5 kDa – inibidor de tripsina da soja; 14,4 kDa – lisozima; 6,5 kDa – aprotinina 41

Figura 3 – Quantidade de proteínas (μg) em lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 1, 3, 5, 7 e 9 dias do parasitismo, que diferiram (teste t ; $p < 0,05$) em, pelo menos, um dos períodos amostrais (indicado por “*”). A – Proteína de 60 kDa; B – Proteína de 75 kDa; C – Proteína de 180 kDa 42

Figura 4 – Distribuição dos transcritos do transcriptoma *de novo* de lagartas de *Spodoptera frugiperda* após análise de expressão diferencial entre lagartas parasitadas ou não por *Campoletis flavicincta*. Os pontos referem-se aos 27.978 transcritos do transcriptoma *de novo* e o resultado da análise de sua expressão diferencial entre tratamento (P) e controle (NP). Pontos vermelhos representam sequências que não apresentaram diferença na expressão relativa entre tratamento e controle, enquanto os pontos azuis indicam sequências expressas diferencialmente no parasitado em relação ao controle (teste t ; $p < 0,05$; expressão relativa $\geq 1,3$)..... 44

Figura 5 – Distribuição dos alinhamentos de transcritos de *S. frugiperda* expressos diferencialmente após busca de similaridade junto ao banco de dados do NCBI 45

Figura 6 – Distribuição dos transcritos de *S. frugiperda* diferencialmente expressos devido ao parasitismo por *C. flavicincta* ($p < 0,05$; expressão relativa $> 1,3$) e funcionalmente anotados nas diferentes ontologias gênicas 46

Figura 7 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo 51

Figura 8 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados ao metabolismo de proteínas para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo 53

Figura 9 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados à síntese e degradação de hormônios para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo 56

Figura 10 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados à síntese e degradação de hormônios para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo 60

Figura 11 – Número de cópias do transcrito selecionados para validação dos dados de RNA-Seq em qPCR nos diferentes períodos amostrais (06, 24 e 72 h após o parasitismo) em lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não parasitadas (NP) por *C. flavicincta*. A – contig_800 (o-metiltransferase de ácido farnesoico; B – contig_11110 (proteína inibidora de fenoloxidase); C – contig_279 (serpina b6) 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Números estatísticos do transcrito <i>de novo</i> montado a partir das leituras obtidas do sequenciamento de bibliotecas de cDNA via plataforma Illumina	43
Tabela 2 – Transcritos com valor de expressão relativa superior a cinco em lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas por <i>C. flavicincta</i> após 06, 24 e 72 h do parasitismo em relação àquelas não-parasitadas	47
Tabela 3 – Transcritos com valor de expressão relativa média inferiores a cinco em lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas por <i>C. flavicincta</i> após 06, 24 e 72 h do parasitismo em relação àquelas não-parasitadas	48
Tabela 4 – Transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos de <i>S. frugiperda</i> e que foram expressos diferencialmente em lagartas após 06, 24 e 72 h do parasitismo por <i>C. flavicincta</i> , em relação às lagartas não-parasitadas	50
Tabela 5 – Transcritos de interesse relacionados a proteínas de armazenamento obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas e não-parasitadas por <i>C. flavicincta</i> após 06, 24 e 72 h do parasitismo	52
Tabela 6 – Transcritos de interesse relacionados à síntese e degradação de hormônios obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas e não-parasitadas por <i>C. flavicincta</i> após 06, 24 e 72 h do parasitismo	55
Tabela 7 – Transcritos de interesse relacionados à resposta imunológica do hospedeiro obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas e não-parasitadas por <i>C. flavicincta</i> após 06, 24 e 72 h do parasitismo	57
Tabela 8 – Sequências obtidas na construção do transcrito <i>de novo</i> utilizando-se o sequenciamento de nova geração de bibliotecas de cDNA de lagartas de <i>S. frugiperda</i> parasitadas por <i>C. flavicincta</i> após 06, 24 e 72 h do parasitismo, identificadas e alinhadas à sequências virais depositadas no banco de dado do NCBI.....	63
Tabela 9 – Valores de expressão relativa e RPKM dos transcritos identificados como relacionados aos genes do ichnovírus associado ao parasitoide <i>C. flavicincta</i> durante o parasitismo de lagartas de <i>S. frugiperda</i> após 06, 24 e 72 h.....	64

1 INTRODUÇÃO

Parasitoides utilizam outras espécies (hospedeiros) para se desenvolver e completar seu ciclo de vida, o que, invariavelmente, leva seu hospedeiro à morte (GODFRAY, 1994). O estilo de vida parasítico ocorre em diversas ordens de insetos, mas é Hymenoptera a que apresenta o maior número de espécies de ecto ou endoparasitoides (PENNACCHIO; STRAND, 2006). Braconidae e Ichneumonidae são famílias de parasitoides que se destacam dentro da ordem, pois exploram diversos hospedeiros e desenvolveram, ao longo da evolução, grande diversidade de estratégias para localização e utilização de seus hospedeiros (PENNACCHIO; STRAND, 2006; POIRIÉ; CARTON; DUBUFFET, 2009). Dada a diversidade e o sucesso na exploração hospedeira, várias espécies que parasitam insetos-praga de culturas de interesse econômico são alvo de estudos para utilização em programas de Manejo Integrado de Pragas pelo Controle Biológico Clássico ou Aplicado (BELLOWS et al., 1999; BERTI; CIOCIOLA, 2002; BARRATT et al., 2010).

As interações hospedeiro-parasitoide compreendem diversos processos biológicos envolvidos na exploração hospedeira, desde a localização do hospedeiro até a sua utilização pelo parasitoide (VINSON; IWANTSCH, 1980; HAWKINS, 2005). A planta hospedeira pode responder de forma específica à herbivoria e produzir voláteis próprios que servem como estímulos aos parasitoides para a localização hospedeira, tornando também importante a ação do primeiro nível trófico no processo de evolução das interações hospedeiro-parasitoide (BALDWIN; PRESTON, 1999; GOINGUENÉ; ALBORN; TURLING, 2003). A utilização do hospedeiro pelo parasitoide é bastante complexa e específica, dado ao processo chamado de regulação hospedeira (VINSON; IWANTSCH, 1980; BECKAGE, 1985), em que algumas espécies de parasitoides permitem que seu hospedeiro continue a se desenvolver após o parasitismo (cenobiontes), enquanto que outras paralisam o hospedeiro, para que este cesse seu desenvolvimento imediatamente ou logo após o parasitismo (idiobiontes) (LAWRENCE, 1986; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; BRODEUR; BOIVIN, 2004).

Parasitoides idiobiontes dispõem, principalmente, de veneno para paralisar e utilizar seus hospedeiros, enquanto cenobiontes também fazem uso de outras moléculas bioativas produzidas pela fêmea (fluídos do cálice), pelo imaturo em desenvolvimento (secreções larvais), ou ainda por tipos celulares associados (teratócitos) (DOUCET; CUSSON, 1996; ZHANG; DAHLMAN; JÄRLFORS, 1996; ASGARI; RIVERS, 2011). Parasitoides de algumas das subfamílias de Braconidae (Microgastrinae, Cardiochilinae e Cheloninae) e Ichneumonidae (Campopleginae), também estão associadas a partículas virais simbiotes

(Polidnavírus – PDV), as quais são injetadas durante a oviposição e infectam diversos tecidos do hospedeiro, regulando processos de sua fisiologia para garantir a colonização do parasitoide (SHELBY; WEBB, 1997; KROEMER; WEBB, 2004).

A variedade de processos biológicos envolvidos na interação hospedeiro-parasitoide e a utilização de moléculas bioativas diversas, assim como sua ação através de mecanismos de regulação da transcrição gênica do hospedeiro e de processos de utilização de nutrientes, entre outros, tem sido apontada como uma fonte para a descoberta de novas moléculas e processos de interesse biotecnológico que levem ao desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle de pragas (BECKAGE; GELMAN, 2004). A abordagem molecular da interação hospedeiro-parasitoide pelo uso de técnicas modernas, principalmente com os métodos de sequenciamento de nova geração, tem, nos últimos anos, permitido a obtenção de informações em larga escala e a identificação de transcritos de interesse de forma mais rápida, tornando possíveis a descoberta, o isolamento e a identificação de moléculas bioativas associadas à regulação hospedeira (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010; ETEBARI et al., 2011; PROVOST et al., 2011).

Campoletis flavicincta (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) é um endoparasitoide cenobionte que ataca os estádios iniciais das lagartas do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), e está presente em muitas áreas de cultivo de milho no Brasil (DEQUECH et al., 2004). Devido a sua alta abundância e eficiência no parasitismo de *S. frugiperda*, *C. flavicincta* tem sido proposto como inimigo natural com potencial para o estabelecimento de programas de controle biológico dessa lagarta (CRUZ et al., 1997; DEQUECH et al., 2004).

O sucesso biológico apresentado por esse parasitoide no controle de *S. frugiperda* aponta para a existência de mecanismos eficientes de regulação hospedeira e que, se entendidos, podem levar à descoberta de moléculas e vias metabólicas passíveis de regulação que permitam sua aplicação no controle de pragas (BECKAGE; GELMAN, 2004; ROSSI et al. 2012). Porém, ainda pouco se conhece sobre diversos aspectos biológicos deste inimigo natural, como, por exemplo, o processo de regulação hospedeira. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo estudar a regulação da expressão gênica na fase inicial do parasitismo de lagartas de *S. frugiperda* por *C. flavicincta*, utilizando-se de ferramentas de sequenciamento de nova geração (RNA-Seq), assim como verificar alterações quantitativas e qualitativas na hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* via SDS-PAGE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação parasitoide-hospedeiro

Parasitoides são insetos que utilizam outros artrópodes para se desenvolver e completar seu ciclo de vida, o que, invariavelmente, leva seu hospedeiro à morte (GODFRAY, 1994). O estilo de vida parasítico ocorre em diversas ordens de insetos, como Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera e Strepsiptera, mas é Hymenoptera a que apresenta o maior número de espécies que utilizam esta estratégia de vida, correspondendo a cerca de 80% de todas as espécies de insetos parasitoides (PENNACCHIO; STRAND, 2006).

Parasitoides podem ser classificados de acordo com diversas características de seu parasitismo. Os ectoparasitoides se desenvolvem externamente ao corpo hospedeiro, enquanto endoparasitoides o fazem internamente (PENNACCHIO; STRAND, 2006). De acordo com o estágio do hospedeiro que atacam, parasitoides também podem ser classificados em parasitoides de ovos, de larvas, de pupas ou de adultos. Aqueles que iniciam o parasitismo em um estágio do hospedeiro, mas finalizam seu desenvolvimento em outro, recebem denominações distintas, como parasitoides de ovo-larva e larva-pupa, por exemplo (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993; QUICKE, 1997; BERTI; CIOCIOLA, 2002). Além disso, os parasitoides podem ser denominados solitários ou gregários, dependendo do número de indivíduos que se desenvolve por hospedeiro (GODFRAY, 1994; QUICKE, 1997), ou classificados de acordo com o modo como o desenvolvimento do hospedeiro parasitado será afetado. Se o parasitoide permitir que seu hospedeiro continue a se alimentar e crescer após o parasitismo, será dito cenobionte; caso contrário, se o hospedeiro cessar seu desenvolvimento imediatamente ou logo após o parasitismo é chamado de idiobionte (BRODEUR; BOIVIN, 2004).

Parasitoides cenobiontes se desenvolvem como endoparasitoides de larvas e adultos e são classificados, segundo Vinson & Iwantsch (1980) e Lawrence (1986), em reguladores e “conformers”, dependendo de suas interações com os hospedeiros. Os primeiros manipulam seu crescimento e desenvolvimento, enquanto que os últimos adequam seu próprio desenvolvimento ao do hospedeiro (LAWRENCE, 1986).

2.2 Regulação hospedeira

Os parasitoides apresentam diversas estratégias para a colonização do hospedeiro, executadas pela adoção de mecanismos passivos e ativos para não serem detectados pelo sistema imunológico do hospedeiro ou para adequar a fisiologia hospedeira ao desenvolvimento de parasitoides imaturos, em um processo conhecido como regulação hospedeira (VINSON, 1990; STRAND; PECH, 1995).

Mecanismos passivos são utilizados por parasitoides para evitar o contato com o sistema imunológico do hospedeiro. Os mecanismos ativos suprimem a resposta celular do hospedeiro devido à injeção de diversos fatores durante a oviposição, como veneno, proteínas ovarianas e vírus simbioses (polidnavírus – PDVs), assim como pela liberação de outros componentes pelo próprio imaturo em desenvolvimento e secreções oriundas de tipo celular (teratócitos) derivado do parasitoide (STRAND; PECH, 1995; DOUCET; CUSSON, 1996; VINCENT et al., 2010; ROSSI et al., 2012; GUEGUEN et al., 2013). Os mecanismos utilizados pelos parasitoides, passivos ou ativos, dependem da forma como o parasitoide irá colonizar e utilizar o hospedeiro, variando entre espécies cenobiontes e idiobiontes (SCHMIDT, 2006).

Parasitoides idiobiontes desenvolvem-se em hospedeiros paralisados ou parasitam hospedeiros em estágios sésseis, como ovos e pupas (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993). A paralisação do hospedeiro durante o parasitismo de endoparasitoides idiobiontes evita que sua progênie seja reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro e inibe as ecdises e a movimentação do hospedeiro durante o parasitismo de ectoparasitoides, ao mesmo tempo em que fornece quantidade conhecida de recursos para o desenvolvimento de ambos (HARVEY, 2005). A interrupção do desenvolvimento do hospedeiro ocorre pela utilização de veneno durante o parasitismo. O veneno é normalmente composto por diversas proteínas e fatores de virulência, que também inibem as respostas imunológicas do hospedeiro (ER et al., 2010; ASGARI; RIVERS, 2011; WANG et al., 2013). O parasitoide *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae), por exemplo, injeta veneno em seu hospedeiro *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), que, além de paralisá-lo, também afeta o número e comportamento de seus hemócitos. Já o veneno utilizado por *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), além de reduzir o número de células de defesa em 50%, pode causar sua má formação, prejudicar a capacidade do hospedeiro em encapsular seus ovos e provocar a morte de hemócitos do hospedeiro (OSMAN, 1978; ER et al., 2010).

Por outro lado, parasitoides cenobiontes permitem o contínuo desenvolvimento de seu hospedeiro e utilizam de mecanismos complementares ao veneno para evitar ou inibir as respostas imunológicas e tornar o interior do corpo do hospedeiro um ambiente nutricionalmente favorável ao seu desenvolvimento (VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001). Alguns endoparasitoides apresentam mecanismos passivos de regulação hospedeira, se alojando em tecidos do hospedeiro onde as células de defesa não atuam, ou apresentando fatores em sua superfície que evitam o seu reconhecimento como invasor (SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001; CORLEY; STRAND, 2003). Outras espécies, por suas vezes, utilizam moléculas bioativas que inibem as respostas imunológicas do hospedeiro, atuando sobre hemócitos, vias de síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e cascatas de ativação de fenoloxidasas (SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001). Embora a ação do veneno de parasitoides cenobiontes apresente menor potencial, pois não paralisa totalmente o hospedeiro, este fator injetado pela fêmea durante o parasitismo é importante sinergista na ação de outros fatores maternos, como os vírus simbiotes, contra o sistema imunológico do hospedeiro para algumas espécies de parasitoides, como *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae) (ZHANG; SCHMIDT; ASGARI, 2004).

Alguns autores discutem a importância do veneno e do fluido do cálice como inibidor da resposta imunológica para ovos colocados no interior do hospedeiro, até que a expressão dos genes virais seja iniciada e as células de defesa do hospedeiro sejam afetadas (WEBB; LUCKHART, 1994). Em *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae), o veneno diminui a taxa de encapsulação de seus ovos pelo sistema imunológico do hospedeiro nas primeiras horas de colonização. Após algumas horas, o fator responsável pela sobrevivência do parasitoide passa ser os PDVs, inibindo a capacidade de espalhamento dos hemócitos pelos tecidos, reduzindo o número deles em circulação e alterando a atividade do tecido hematopoiético, como visto também em *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Hyposoter fugitivus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) (DANI; RICHARDS; EDWARDS, 2004; PENNACCHIO; STRAND, 2006; YU et al., 2007). Já para o parasitoide *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a injeção de veneno composto por pequenas quantidades de proteínas ligadas à inibição do sistema imunológico do hospedeiro, não é requerida durante o estabelecimento do parasitoide no hospedeiro, sugerindo que a ação do vírus simbiote tenha substituído este fator e sua produção tenha se tornado redundante para a espécie (DORÉMUS et al., 2013).

Após o estabelecimento no hospedeiro, parasitoides cenobiontes podem sincronizar seu desenvolvimento ao do hospedeiro (“conformers”) ou manipular o sistema endócrino e

modificar os níveis de hormônio juvenil (HJ) e de ecdisteroides presentes na hemolinfa, regulando o consumo e a mobilização de recursos armazenados pelo hospedeiro para seu próprio consumo (reguladores) (LAWRENCE, 1986).

Parasitoides modificam os níveis hormonais do hospedeiro, principalmente nos últimos ínstares, afetando os processos que levam à ecdise e metamorfose (BECKAGE, 1985). Consequentemente, o tecido adiposo, principal órgão de armazenamento e síntese de metabólitos, também sofre alterações no seu funcionamento, levando a modificações na composição da hemolinfa do hospedeiro (KEELEY, 1985; LAW; WELLS, 1989; SHIAO et al. 2008).

As alterações fisiológicas que parasitoides induzem objetivam proporcionar melhores condições para que sua progênie se desenvolva, e, para isso, parasitoides também podem mudar alguns parâmetros de digestibilidade e assimilação do alimento consumido pelo hospedeiro (HUANG et al., 2008). Para obter mais alimento, a digestibilidade aproximada pode ser aumentada, enquanto que a taxa de consumo de alimento, a eficiência de conversão e a taxa de crescimento são reduzidas. Huang et al., (2009) estudaram a interação *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) - *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e observaram diferença de peso entre lagartas parasitadas e não-parasitadas, sendo que as primeiras apresentaram peso significativamente menor, assim como a conversão de alimento e a taxa de crescimento ao final do estágio larval do hospedeiro, enquanto que a digestibilidade aproximada do inseto foi maior. Estas mudanças variam de acordo com o parasitoide e a forma como o mesmo utiliza o hospedeiro até o final de seu estágio larval. Enquanto algumas espécies se alimentam dos nutrientes presentes na hemolinfa do hospedeiro e necessitam que haja maior digestibilidade dos alimentos que o hospedeiro consome, mas que os nutrientes não sejam convertidos em tecidos, outras se alimentam dos tecidos do hospedeiro, e a conversão eficiente de alimento passa a ser importante para seu desenvolvimento (THOMPSON, 1982; NAKAMATSU; GYOTOKU; TANAKA, 2001).

2.3 Ação de fatores maternos na regulação da expressão gênica do hospedeiro

A hemolinfa que circula por todo o corpo dos insetos e irriga os tecidos diretamente, consiste de um plasma fluido em que hemócitos estão suspensos e muitos constituintes necessários às células estão presentes, como aminoácidos, carboidratos, íons, lipídeos e proteínas. Dentre as proteínas, as de armazenamento são secretadas na hemolinfa durante o estágio larval, principalmente pelo tecido adiposo, sendo utilizadas posteriormente durante a

metamorfose para formação e reorganização dos tecidos que comporão o corpo do adulto, após hidrólise e liberação de seus aminoácidos (TELFER; KUNKEL, 1991). Ao aproximar-se da metamorfose, grande parte das proteínas é recapturada pelo próprio tecido adiposo e armazenada na forma de grânulos dentro dos adipócitos (TELFER; KUNKEL, 1991). Esse processo também pode ser regulado pelos hormônios envolvidos na metamorfose e por estímulos internos e externos, como a disponibilidade de recursos, o sexo e o estágio de desenvolvimento (HAUNERLAND, 1996).

A alocação de nutrientes e síntese de moléculas podem ser reguladas pelos endoparasitoides para controlar o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, permitindo sua colonização (BECKAGE; GELMAN, 2004). A regulação hospedeira pode ocorrer como resultado da ação dos diversos fatores associados ao aparelho reprodutor da fêmea do parasitoide ou então pela ação da própria larva em desenvolvimento (STRAND; PECH, 1995).

Parasitoides de algumas subfamílias de Braconidae e Ichneumonidae carregam vírus de DNA dupla fita polidisperso (de genoma múltiplo e circular), chamados Polidnavírus (PDVs), e desenvolveram, ao longo da evolução, uma relação de simbiose positiva com os mesmos (KROEMER; WEBB, 2004). O material genético dos PDVs está integrado ao genoma de parasitoides na forma de provírus e também se encontra no trato reprodutor da fêmea para, então, ser injetado no hospedeiro no momento da oviposição. O vírus é transmitido verticalmente, embora se replique apenas no trato reprodutor das fêmeas (VOLKOFF et al., 2001; KROEMER; WEBB, 2004). No corpo do hospedeiro, os PDVs utilizam a maquinaria celular invadida para expressar seus genes e causar as alterações fisiológicas necessárias à colonização hospedeira e ao desenvolvimento do parasitoide, como inibição das respostas imunológicas e alterações no sistema endócrino (STRAND, 2008).

O genoma dos polidnavírus apresenta algumas famílias gênicas, como *motivo-cisteína*, *inexina viral*, *anquirina viral* e *elemento repetido*, que, expressos no hospedeiro, protegem o parasitoide das respostas de defesa do mesmo, agindo, por exemplo, de forma agonista, mimetizando proteínas hospedeiras e evitando que estas se liguem a receptores para desencadear a resposta imunológica (MARZIANO et al., 2011). Além da expressão de seus genes, os PDVs podem inibir a expressão gênica dos tecidos do hospedeiro. Barati-Houari et al., (2006) estudaram os efeitos da injeção do vírus no transcrito de hemócitos e do tecido adiposo de *Spodoptera frugiperda*, e observaram a redução na expressão de diversos genes relacionados à resposta imunológica, como algumas enzimas necessárias à ativação da cascata de fenoloxidasas, à migração de hemócitos e à encapsulação, assim como de alguns genes

relacionados à metamorfose, como os responsáveis pela síntese de ecdisteroides, e à produção de proteínas de armazenamento, como as arilforinas.

Em parasitoides que não estão associados aos PDVs, o veneno injetado pelas fêmeas no momento da oviposição parece ter grande relevância no processo de colonização do hospedeiro. O veneno é produzido por um par de glândulas associadas ao aparelho reprodutor da fêmea e é armazenado em um reservatório até sua utilização (EDWARDS, WEAVER, 2001). Neurotoxinas, amins e enzimas de alto peso molecular compõem o veneno de parasitoides e podem ser responsáveis pela redução no número de hemócitos, assim como por suas deformações e morte, ao mesmo tempo que são sinergistas dos vírus simbiotes em espécies que também se associam a estes (RICHARDS; DANI; BRADISH, 2013).

A modificação da composição proteica da hemolinfa do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitoide pode ocorrer também pela manipulação do tecido adiposo e do sistema endócrino do inseto atacado. O nível de arilforina presente na hemolinfa do hospedeiro *Plutella xylostella* parasitado por *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) é reduzido devido à inibição de sua síntese e redirecionamento dos nutrientes disponíveis na hemolinfa para o desenvolvimento do parasitoide (DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996; BAE; KIM, 2004). Já no sistema *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) - *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), a alteração na concentração de proteínas na hemolinfa pode estar relacionada também à síntese de proteínas específicas do parasitismo, ou ainda com a regulação dos hormônios que atuam sobre o desenvolvimento do inseto (BECKAGE, 1985; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; SALVADOR; CÔNSOLI, 2008). Parasitoides da subfamília Cheloninae induzem o aumento precoce dos níveis de esterases específicas, levando à degradação das moléculas do hormônio juvenil já no penúltimo instar larval, e à preparação do hospedeiro para a metamorfose, induzindo indiretamente a síntese e liberação na hemolinfa de grandes quantidades de proteínas, como as arilforinas, que servirão para a nutrição do parasitoide em desenvolvimento (KAESLIN et al., 2005).

2.4 Utilização de técnicas de sequenciamento de nova geração

A análise da ação de vírus simbiotes, proteínas ovarianas existentes no fluido do cálice, veneno e teratócitos sobre a expressão de genes envolvidos na síntese e liberação de hormônios e proteínas circulantes na hemolinfa baseou-se, por muito tempo, na identificação de genes alvos, na sua caracterização e na quantificação do seu padrão de expressão (BLISSARD et al., 1986; SHELBY; WEBB, 1997; KAESLIN et al., 2005; ZHU et al., 2009).

Porém, a forma como as alterações de expressão ocorrem não depende apenas desse conhecimento, uma vez que existem diversos processos pós-transcricionais, intimamente relacionados com o ambiente e suas alterações, que modificam o conjunto de transcritos das células conforme sua necessidade e regulação (BAE; KIM, 2004; MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

A quantidade de proteínas de armazenamento na hemolinfa de lagartas de *Plutella xylostella* parasitadas por *Cotesia plutellae* é bastante reduzida pelo parasitismo cinco dias após o parasitismo, devido à inibição da síntese proteica e redirecionamento dos nutrientes disponíveis na hemolinfa para o desenvolvimento do parasitoide imaturo (BAE; KIM, 2004). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos que atuam sobre essas alterações. Nos últimos anos, entretanto, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de nova geração tem auxiliado na busca por respostas quanto à ação de parasitoides e aos fatores maternos e larvais liberados no interior do hospedeiro durante o parasitismo, pela detecção de transcritos presentes, mesmo quando em baixas concentrações, e pela obtenção de sequências em larga escala, de forma mais rápida e barata (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010; ETEBARI et al., 2011).

Estudos de Etebari et al. (2011) analisaram o transcrito de *P. xylostella* parasitada por *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae) pela técnica de RNA-Seq e revelaram a expressão diferencial de genes envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro, assim como a presença de transcritos de genes do polidnavírus injetado pela fêmea parasitoide junto ao ovo na hemolinfa do hospedeiro. Resultados semelhantes, quanto à detecção de diferentes transcritos em hospedeiros e lagartas não-parasitadas, foram obtidos por Reineke e Löbmann (2005), estudando o sistema *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) – *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae).

O conhecimento sobre a composição e função do veneno de endoparasitoides cenobiontes, ainda pouco conhecida na regulação hospedeira, tem aumentado devido ao uso de análises transcritômicas e proteômicas (COLINET et al., 2013). O veneno de *H. didymator* não inibe as respostas imunológicas do hospedeiro e não está envolvido na regulação do crescimento do hospedeiro após o parasitismo, enquanto que as proteínas contidas no fluido do cálice parecem ser importantes para a regulação hospedeira, demonstrando que a utilização de novas técnicas moleculares têm sido importante na elucidação das questões acerca dos mecanismos que atuam para o sucesso do parasitismo (DORÉMUS et al., 2013). A abordagem transcritômica para a elucidação da composição do veneno de *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) e de *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucoilidae)

mostrou a presença de peptídeos responsáveis pela inibição da ativação da cascata de fenoloxidasas e pela expressão de alguns genes do polidnavírus no interior de células do hospedeiro (HEAVNER et al., 2013; PANNEBAKKER et al., 2013).

Os PDVs apresentam diversas famílias gênicas de proteínas homólogas às aquelas presentes no hospedeiro a fim de mimetizar os fatores de transcrição de eucariotos existentes e impedir que algumas vias metabólicas importantes à fisiologia do hospedeiro sejam ativadas (AL-KHODOR et al., 2010). O sequenciamento do genoma do vírus simbiote de *H. didymator* e a verificação de sua expressão gênica em células hospedeiras por PCR quantitativa permitiram a identificação de vários genes virais que codificam pela proteína anquirina viral (“vankyrin”) expressos em células de *Spodoptera frugiperda*, revelando sua possível função no sucesso do parasitoide no ataque a este hospedeiro e outros genes também estão sendo estudados de acordo com o avanço das técnicas moleculares (CLAVIJO et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação e manutenção de populações de *Spodoptera frugiperda* e *Campoletis flavicincta*

A população estoque de *Spodoptera frugiperda* foi mantida em dieta artificial a base de feijão e germe de trigo, seguindo as recomendações de Parra (1991). Para a manutenção da população de *Campoletis flavicincta*, lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar foram oferecidas às fêmeas do parasitoide para parasitismo pelo período de 24 h, conforme Huang et al. (2009). Ao término do período de parasitismo, as lagartas foram transferidas para tubos de criação com dieta artificial e mantidas em condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ U.R. e fotofase de 14 h), para o completo desenvolvimento do parasitoide.

3.2 Parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta*

Apenas lagartas de *S. frugiperda* no início do terceiro instar (0-12 h de idade) foram selecionadas para os ensaios biológicos. Essas lagartas foram divididas em dois grupos, sendo um composto por lagartas não-parasitadas (controle) e o outro, por lagartas oferecidas ao parasitoide para parasitismo (tratamento). As lagartas foram oferecidas individualmente às fêmeas de *C. flavicincta*, permitindo-se apenas uma inserção de ovipositor da fêmea do parasitoide por lagarta hospedeira. Após o parasitismo, as lagartas foram colocadas em recipientes contendo dieta artificial para sua alimentação e mantidas em condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ U.R. e fotofase de 14 h) até a realização dos experimentos.

3.3 Efeitos do parasitismo no proteoma da hemolinfa de *S. frugiperda*

3.3.1 Coleta de hemolinfa

A coleta de hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* ocorreu após 1, 3, 5, 7 e 9 dias do início do experimento, tomando-se por base o dia do parasitismo (dias após parasitismo – DAP), seja para lagartas controle (não-parasitadas – NP) ou parasitadas (P). O experimento contou com a realização de três repetições por período amostral para cada tratamento, sendo que cada repetição foi composta pela amostra conjunta de diversos indivíduos, totalizando valores próximos de 20 μL de hemolinfa/repetição, em cada unidade amostral de tempo. A

hemolinfa foi coletada por uma pequena incisão na face dorsal das lagartas e imediatamente transferida para tampão anticoagulante (98 mM NaOH, 150 mM NaCl, 1,7 mM EDTA, 46 mM ácido cítrico, pH 4,5) (MASASHI et al., 2001), mantido em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.000 g x 5 min x 4°C) para remoção de hemócitos e outros tecidos indesejados, e o sobrenadante coletado aliquoteado em duas amostras distintas. Uma alíquota, mantida apenas em tampão anticoagulante, foi utilizada para a determinação da concentração de proteína total. A outra alíquota foi misturada ao tampão da amostra 4x [250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% glicerol; 8% dodecil sulfato de sódio (SDS); 0,004% azul de bromofenol] (LAEMMLI, 1970) e armazenada a -80°C, para posterior análise via eletroforese em gel de poliacrilamida em meio desnaturante (SDS-PAGE).

3.3.2 Análise das alterações quantitativas de proteínas na hemolinfa de *S. frugiperda*

A concentração total de proteínas da hemolinfa de *S. frugiperda* foi avaliada pelo teste colorimétrico de Bradford (1976), utilizando-se de uma formulação comercial do reagente Coomassie que aumenta a sensibilidade do ensaio (Coomassie Plus Protein, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). As amostras foram misturadas ao reagente Coomassie e a concentração total de proteínas de cada amostra foi determinada pela leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Biomate 3, Thermo Electron Corp., Madison, WI) e posterior comparação com curva-padrão produzida utilizando-se soro de albumina bovina.

O experimento constou de cinco períodos amostrais – 1, 3, 5, 7 e 9 DAP para lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP), sendo que cada tratamento foi constituído por cinco repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.3 Análise das alterações qualitativas no padrão proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em meio desnaturante

As alterações qualitativas na hemolinfa de *S. frugiperda* foram avaliadas pela observação do padrão eletroforético determinado por meio de eletroforese em sistema descontínuo em gel de poliacrilamida com gradiente de 4-20% (SDS-PAGE), utilizando o sistema Amersham™ ECL™ Gel. As amostras dos diferentes tratamentos (NP e P – 1, 3, 5, 7 e 9 DAP) foram diluídas com 1x tampão SDS da amostra (50 mM Tris, pH 6,8; 2% SDS;

0,1% azul de bromofenol; 10% glicerol; água estéril) para a obtenção de concentração final de 1 µg/µL. Posteriormente, 0,5 µL de β-mercaptoetanol foi adicionado em todos os tubos e as amostras foram submetidas a tratamento térmico (95°C x 10 min) para a desnaturação das proteínas. As amostras foram carregadas (20 µg/linha) e resolvidas em gel gradiente 4-20% em sistema descontínuo, utilizando tampão Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS), em voltagem constante de 160 V, até que o marcador de frente atingisse 0,5 cm da base do gel. Após a corrida, os géis foram removidos, lavados em água destilada (3x por 5 min) e corados utilizando-se do reagente comercial Acqua Stain (NeoBio) (1 h), sob agitação constante. Após o período de coloração, os géis foram transferidos para água destilada para a remoção do excesso do corante e digitalizados. As diferentes bandas reveladas foram identificadas e suas abundâncias determinadas utilizando-se do sistema de captura e análise de imagens GelQuant versão 2.7 (Bio-Imaging Systems).

O experimento constou de cinco períodos amostrais – 1, 3, 5, 7 e 9 DAP para lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP), sendo que cada tratamento foi constituído por três repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Análise dos efeitos do parasitismo no transcrito de *S. frugiperda* via RNA-Seq

3.4.1 Coleta e extração de RNA de *S. frugiperda*

Lagartas de *S. frugiperda* foram selecionadas para o parasitismo e posterior extração de RNA, assim como descrito anteriormente para a coleta de hemolinfa. Essas lagartas foram utilizadas para o estudo do efeito do parasitismo no transcrito do hospedeiro nas fases iniciais do desenvolvimento do parasitoide. Assim, lagartas parasitadas e não-parasitadas foram amostradas 06, 24 e 72 h após o parasitismo, período que se refere exclusivamente ao desenvolvimento embrionário do parasitoide (THOMAZONI, 2012). Cada um dos tratamentos foi composto pelo macerado de 10 lagartas.

As lagartas obtidas foram mantidas em RNA Lysis Buffer a -80°C, até a extração de RNA. Após a retirada das lagartas do armazenamento, as mesmas foram maceradas com pistilos esterilizados e submetidas à centrifugação (12.000 *g* x 1 min) para a exclusão de tecidos indesejáveis das amostras. Posteriormente, a extração do RNA total foi realizada com o sistema comercial RNA Rneasy (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. A

amostra foi submetida à lise celular, seguida pela diluição do RNA e centrifugação (12.000 g x 10 min). O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo coluna de purificação, onde o RNA foi lavado em 95% etanol e recuperado via centrifugação (12.000 g x 1 min). O sobrenadante foi descartado e o RNA retido na membrana do filtro da coluna de purificação foi submetido à nova lavagem. O DNA contaminante que ainda existia nas amostras foi eliminado da membrana após tratamento com DNAses por 15 min à temperatura ambiente. A ação das DNAses foi então interrompida e a amostra sujeita a lavagem e centrifugação (12.000 g x 1 min). Após esta etapa, o RNA foi eluído em água livre de nucleases via centrifugação (12.000 g x 1 min) e armazenado a -80°C.

3.4.2 Enriquecimento do conteúdo de mRNA da amostra

Após a extração, o RNA total obtido foi quantificado utilizando-se o Picodrop para posterior enriquecimento da amostra em RNA mensageiros, utilizando o produto comercial RiboMinus™ Eukaryote Kit, de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 10 µL da amostra de RNA total (no máximo 1µg/µL), 10 µL de solução contendo sequências específicas de RNA biotiniladas na extremidade 5' (Ribominus Probe) e 100 µL de tampão de hibridação. Os tubos foram incubados a 70°C por 5 min para desnaturação do RNA e resfriados lentamente até 37°C para que a hibridação das sequências biotiniladas e as moléculas de RNA indesejadas. Enquanto os tubos resfriavam, uma suspensão de esferas magnéticas foi preparada para remoção dos complexos formados entre o RNA indesejado e as sequências biotiniladas. Após a remoção deste RNA, as amostras foram precipitadas utilizando glicogênio (20 mg/mL), 3 M acetato de sódio e 100% etanol a -80°C por 1 h e posteriormente lavadas com 70% etanol. A recuperação da amostra enriquecida em mRNA foi finalizada após centrifugação (12.000 g x 4°C x 1 min), secagem em temperatura ambiente por 15 min e ressuspensão em água estéril.

Do material resultante, foi retirada, para cada amostra, uma alíquota para quantificação de RNA utilizando-se o Picodrop. O material coletado foi encaminhado para sequenciamento em plataforma Illumina, via prestação de serviços.

3.4.3 Expressão gênica diferencial do hospedeiro durante o início do desenvolvimento do parasitoide

A identificação de genes expressos diferencialmente em lagartas de *S. frugiperda* na fase inicial do desenvolvimento do parasitoide *C. flavicincta* foi realizada pela técnica de sequenciamento de bibliotecas de cDNA, utilizando-se a plataforma Illumina© HiScanSQ, disponível no Centro Multiusuário de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP, em colaboração com o Prof. Dr. Luiz H. Coutinho. Resumidamente, as amostras de mRNA foram fragmentadas em 200 nucleotídeos e ligadas a iniciadores randômicos para posterior transcrição reversa e construção de bibliotecas de cDNA. O cDNA produzido foi purificado pela utilização de esferas magnéticas e lavagens com etanol para reparação de suas terminações, para que cada molécula apresentasse extremidades abruptas. Além da reparação, ocorreu a adição de uma adenosina na extremidade 3' de cada fragmento, útil para a orientação dos adaptadores específicos que se ligaram às moléculas, os quais apresentam, além de iniciadores de transcrição, indexadores específicos para permitir a diferenciação das amostras. Após a ligação dos adaptadores, as amostras foram submetidas a PCR de ciclo limitado e análise para verificação do sucesso obtido durante a preparação das amostras para o sequenciamento.

3.4.3.1 Análise das sequências e da expressão diferencial

3.4.3.1.1 Processamento das sequências obtidas para análise de RNA-Seq

As leituras obtidas no sequenciamento das bibliotecas de cDNA foram processadas para a verificação de sua qualidade, a fim de, posteriormente, serem utilizadas para análise da expressão diferencial de transcritos do hospedeiro durante o desenvolvimento inicial do parasitoide, utilizando-se do programa CLC Genomics Workbench v.6 (CLC BIO). As sequências foram pareadas, admitindo distância mínima de 150 e máxima de 250 nucleotídeos durante o pareamento, trimadas, baseando-se nos escores de qualidade (0,05) e número de nucleotídeos ambíguos nas terminações (<2). Também foram removidos os dez últimos nucleotídeos da terminação 3' das sequências devido aos escores de qualidade obtidos (< 30) e foram excluídas sequências de tamanho inferior a 50 nucleotídeos antes da utilização das leituras obtidas para as posteriores análises no programa CLC Genomics Workbench v.6 (CLC BIO).

3.4.3.1.2 Construção de transcrito *de novo*

As sequências das amostras pertencentes ao controle nos períodos amostrais 06, 24 e 72 h foram utilizadas na construção de um transcrito *de novo*, o qual foi empregado como referência para o alinhamento e realização das análises dos resultados do sequenciamento de biblioteca de cDNA de cada amostra. O transcrito *de novo* foi construído utilizando o conjunto de leituras não-pareadas obtidas do controle, após a verificação da qualidade e trimagem das mesmas, assim como descrito anteriormente. Apenas sequências maiores que 25 nucleotídeos foram utilizadas na montagem do transcrito *de novo*, baseando-se nos escores de qualidade (0,05) e permitindo número máximo de “não-acertos” (“mismatches”) de 2. Os tamanhos de palavra (“k-mer” = 23) e de bolha (“bubble size” = 50) utilizados para a construção do transcrito foram determinados automaticamente pelo programa CLC BIO.

3.4.3.1.3 Expressão diferencial de transcritos

A análise da expressão gênica diferencial entre lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas foi avaliada pela contagem do número de leituras lidas por kilobase da sequência alvo por milhão de leituras obtidas (“RPKM – reads per kilobase per million reads”), utilizando-se do transcrito *de novo* obtido, assumindo-se limite de inespecificidade de 10, com número máximo de não-acertos (“mismatches”) de 2, conforme Mortazavi et al. (2008). Após a análise individual das amostras, foram realizados experimentos de forma a comparar a expressão dos transcritos entre controle (não-parasitadas - NP) e tratamento (parasitadas - P).

Os valores obtidos foram normalizados de forma a corrigir problemas estatísticos, sendo considerados expressos diferencialmente, apenas aqueles transcritos que apresentaram $p < 0,05$ (teste *t*) e expressão relativa superior a 1,3. Os transcritos que apresentaram diferenças na expressão foram selecionados e submetidos à anotação funcional, utilizando-se do algoritmo de busca BLASTx para identificação putativa de sequências homólogas pelo programa Blast2Go®, com valor de escore $< 10^{-3}$. As sequências utilizadas nessa busca foram curadas e agrupadas em categorias de acordo com sua função no organismo, utilizando-se da mesma ferramenta, com valor de escore $< 10^{-6}$, para posterior seleção dos transcritos de interesse e confirmação da expressão diferencial por PCR quantitativa em tempo real.

A seleção dos transcritos de interesse utilizou como critério a sua participação em vias metabólicas importantes para o desenvolvimento do hospedeiro e do parasitoide, como de

carboidratos e vias endócrinas, além da síntese de proteínas de armazenamento e transcritos que estão relacionados à resposta imunológica do hospedeiro.

3.4.4 PCR quantitativa de transcritos selecionados da análise de RNA-Seq

3.4.4.1 Desenvolvimento de iniciadores específicos

Três transcritos foram selecionados para a validação da expressão diferencial obtida pela análise de RNA-Seq por qPCR, sendo eles: contig_11110 (proteína inibidora de fenoloxidase), contig_279 (serpina b6) e contig_800 (o-metiltransferase do ácido farnesoico). Para a análise quantitativa desses transcritos por qPCR, foram utilizados os conjuntos de iniciadores 11110F: CGGCTCCGTGTCGTTCA, 11110R: CCCCATGGTAAGGGCAATG, 800F: ATCACGCAGGCCACAAAGTT, 800R: GAAGCCCACACTCCTTTGAAGT e 279F: TGAAGCAACGCCCATTGA, 279R: GCGCATCCAGCATTTTCAGT, desenvolvidos para cada um dos transcritos selecionados, utilizando a ferramenta Primer Express® for Real Time PCR v. 3.0.1.

3.4.4.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Novas coletas de tecidos e extração de RNA de *S. frugiperda* após 06, 24 e 72 h do parasitismo foram realizadas para lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP), utilizando-se dos mesmos procedimentos mencionados no item 3.4.1, para posterior síntese de cDNA e qPCR. O experimento contou com três repetições de cada período amostral, tanto para controle, quanto para tratamento. Cada repetição constituiu-se do tecido macerado de dez indivíduos.

A reação de transcrição reversa das amostras de RNA foi conduzida utilizando-se 1 µL do iniciador oligo-dT, disponível no sistema ImProm-II™ Reverse Transcriptase, e volume equivalente a 0,5 µg de RNA. A esta reação adicionou-se água livre de RNases para um volume final de 5 µL. Em seguida, as amostras foram mantidas a 70°C durante 5 min e resfriadas a 4°C em termociclador. Após o tratamento térmico, foram adicionados à reação: 1 µL de transcriptase reversa, 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de inibidor de RNases (40 U/µL), 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 4 µL de 5x tampão de reação e 6,1 µL de água estéril. Seguiu-se ao tratamento térmico a 25°C por 5 min, 42°C por 1 h e 70°C por 15 min em

termociclador. Ao final, as amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

3.4.4.3 PCR quantitativa em tempo real

Fragmentos amplificados por cada conjunto de iniciadores foram precipitados e inseridos em plasmídeo vetor disponível no sistema pGEM T-Easy Vector System (Promega®) e utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* 5α de alta eficiência para a multiplicação dos plasmídeos. O volume de 4 µL de DNA precipitado dos fragmentos selecionados foi adicionado a 1 µL de solução salina e 1 µL de plasmídeo vetor e mantido à temperatura ambiente para a ligação dos fragmentos aos vetores. Após este período, 5 µL do produto da ligação foram transferidos para tubo contendo 50 µL de células competentes para sua transformação química. Os tubos permaneceram por 30 min em gelo, 30 s a 42°C e 2 min em gelo novamente. Após a transformação, as células foram cultivadas em meio SOC (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20 mM glicose) a 37°C por 1 h, sob agitação constante (250 rpm), plaqueadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl, 1,6 g de ágar, 100 mL de água), acrescido de ampicilina (0,1 µg/mL) e de 20 µL de solução 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-GAL) (20 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e as colônias positivas isoladas, cultivadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (0,1 µg/mL) e utilizadas para a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Os plasmídeos extraídos foram utilizados em reações de amplificação dos insertos utilizando os iniciadores específicos para cada transcrito. As reações de amplificação foram conduzidas a 94°C por 5 min (1x), seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 45 s e 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min. A verificação da inserção do inserto foi realizada pela resolução de amplicon de tamanho esperado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 1 µL de brometo de etídio, em tampão 0,5x TAE e voltagem constante de 100 V.

Os plasmídeos contendo os insertos foram quantificados no Picodrop µl Spectrophotometer v.4.0.4.0 e utilizados para a geração de curvas-padrão de diluição para cada transcrito selecionado. As reações foram conduzidas em séries de cinco diluições do plasmídeo, todas em triplicata nas mesmas condições para os três conjuntos de iniciadores específicos. As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas no

equipamento ViiA™ 7 (Life Technologies), conduzidas a 50°C por 2 min (1x); 95°C por 2 min (1x); 95°C por 15 s, 58°C por 30 s (40x), seguido de 95°C por 15 s, 58°C por 1 min e 95°C por 15 s para obtenção dos valores de curva de dissociação (curva de Melting) .

O número de cópias dos transcritos/μL foi determinado a partir da equação:

$$N = \frac{X \text{ g/}\mu\text{L DNA}}{\text{Tamanho do clone em pb} \times 660} 6,022 \times 10^{23}$$

Sendo,

X = quantidade de DNA em g/μL

Clone = plasmídeo + inserto

660 g/mol = peso molecular médio de 1 pb DNA

$6,023 \times 10^{23}$ = número de moléculas em 1 mol (N° de Avogadro)

O número de cópias de cada fragmento selecionado para a confirmação de expressão gênica diferencial entre lagartas parasitadas e não-parasitadas foi obtido por comparação com a curva padrão no sistema de qPCR ViiA™-7. As reações foram conduzidas contendo 12,5 μL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) buffer, 1 μL de cada iniciador (concentração de 10 μM), 1 μL de cDNA da amostra (06, 24 e 72 h após o parasitismo) e 7,5 μL de água livre de nucleases, totalizando 25 μL de volume final. As reações foram conduzidas em três repetições biológicas, e cada uma delas foi analisada em triplicata técnica. Os valores médios obtidos para cada período amostral foram comparados pelo teste *t* ($p < 0,05$), dentro de cada tratamento analisado (parasitadas vs. não-parasitadas).

3.4.5 Identificação de transcritos virais expressos durante o início do desenvolvimento do parasitoide *C. flavicincta* no hospedeiro *S. frugiperda*

3.4.5.1 Construção de transcrito *de novo*

As sequências obtidas do sequenciamento das bibliotecas de cDNA via plataforma Illumina das amostras pertencentes ao tratamento (P), nos períodos amostrais 06, 24 e 72 h foram utilizadas na construção de um transcrito *de novo* para a identificação de transcritos pertencentes ao polidnavírus (PDV) do parasitoide expressos durante essa fase do parasitismo.

O transcrito *de novo* foi construído utilizando-se o conjunto de leituras não-pareadas obtidas do tratamento, após verificação da qualidade e trimagem das mesmas. Apenas sequências maiores que 25 nucleotídeos foram utilizadas na montagem do transcrito *de novo*, baseando-se nos mesmos parâmetros descritos no item 3.4.3.1.2.

3.4.5.2 Identificação de transcritos virais

Após a construção do transcrito *de novo*, os contigs formados foram identificados de forma putativa e anotados de forma funcional, utilizando-se o programa Blast2Go®. Novamente, utilizou-se do algoritmo de busca BLASTx para identificação putativa de sequências homólogas pelo programa Blast2Go®, com valor de escore $< 10^{-3}$. As sequências utilizadas nessa busca foram mapeadas e anotadas funcionalmente, utilizando-se da mesma ferramenta, com valor de escore $< 10^{-6}$, para posterior seleção dos transcritos expressos em lagartas parasitadas pertencentes ao genoma do ichnovírus de *C. flavicincta*.

A expressão dos transcritos identificados putativamente como pertencentes ao ichnovírus foi avaliada em cada amostra (06, 24 e 72 h após o parasitismo) referente ao tratamento (parasitadas - P) pela contagem do número de leituras mapeado por kilobase do alvo mapeado do transcrito *de novo* por milhão de leituras obtidas (RPKM), assumindo-se limite de inespecificidade de 10, com o número máximo de não-acertos (“mismatches”) de 2, conforme Mortazavi et al. (2008). Após a análise individual destas amostras, foram realizados experimentos de forma a comparar a expressão destes transcritos entre os diferentes períodos amostrais, utilizando-se dos parâmetros de expressão relativa (“fold change”) e leituras por kilobase por milhão de leituras (RPKM).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do parasitismo no proteoma da hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*

4.1.1 Análise quantitativa

A análise quantitativa das proteínas totais na hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) após 1, 3, 5, 7 e 9 dias do parasitismo (DAP) por *Campoletis flavicincta* indicou alterações na concentração proteica na hemolinfa, de acordo com o desenvolvimento do hospedeiro e do parasitoide (Figura 1). Lagartas não-parasitadas apresentaram baixa concentração de proteínas na hemolinfa durante os três primeiros períodos de avaliação (1, 3 e 5 DAP), quando a quantidade de proteínas permaneceu entre 5,3 e 5,5 µg de proteínas/µL de hemolinfa, triplicando a partir do 7º DAP, quando as lagartas já se encontravam no 5º ínstar (Figura 1). Já as lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* apresentaram aumento gradual na concentração de proteínas na hemolinfa até atingirem valores máximos no 7º DAP ($26,7 \pm 5,7$ µg/µL), mas, nesse caso, com o hospedeiro permanecendo no 4º ínstar. Após esse período, a concentração proteica na hemolinfa sofreu redução, coincidindo com a fase de parasitismo em que o parasitoide se encontrava no último ínstar (Figura 1).

Comparações par-a-par nos diferentes períodos amostrais indicaram diferenças significativas nos níveis de proteínas totais na hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas com 3 (teste *t*; $p = 0,017$), 5 (teste *t*; $p = 0,002$) e 9 DAP (teste *t*; $p = 0,029$) (Figura 1). Apesar de seguir a mesma tendência, as diferenças encontradas 7 DAP não encontraram sustentação estatística nos limites de significância adotados (teste *t*; $p = 0,106$) (Figura 1).

Figura 1- Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) disponíveis na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas ou não por *Campoletis flavicincta*, após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo - DAP). “*” indica a existência de diferença estatística na concentração total de proteínas de lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP), dentro de cada período amostral, pelo teste t ($p < 0,05$)

4.1.2 Análise qualitativa - SDS-PAGE

A análise qualitativa da composição proteica da hemolinfa de *S. frugiperda* durante o desenvolvimento do parasitoide *C. flavicincta* indicou a existência de diferenças apenas na concentração de algumas proteínas específicas da hemolinfa de lagartas parasitadas e não-parasitadas, para os diversos períodos amostrais estudados (1, 3, 5, 7 e 9 DAP), não tendo sido detectada, pelo método de análise utilizado, nenhuma proteína específica do parasitismo (Figura 2).

Figura 2 – Padrão proteico da hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas (P) ou não (NP) por *Campoletis flavicincta*, após diferentes períodos de desenvolvimento (1, 3, 5, 7 e 9 dias), determinado em 4-20% SDS-PAGE. Marcador molecular (M): 200 kDa – miosina; 116,2 kDa – β -galactosidase; 97,4 kDa – fosforilase b; 66,2 kDa – soro albumina; 31 kDa – anidrase carbônica; 21,5 kDa – inibidor de tripsina da soja; 14,4 kDa – lisozima; 6,5 kDa – aprotinina

Apesar da existência de peptídeos com maior abundância na hemolinfa de lagartas parasitadas de *S. frugiperda*, apenas os peptídeos de 180 kDa (P180), 75 kDa (P75) e 60 kDa (P60) (Figura 2) apresentaram diferenças significativas em suas abundâncias entre tratamento e controle (Figura 3). Nenhuma dessas proteínas foi de ocorrência exclusiva do parasitismo, mas P180 e P75 apareceram precocemente na hemolinfa de lagartas parasitadas se comparadas as das não-parasitadas, enquanto a P60 foi eliminada precocemente da hemolinfa (Figura 3). As proteínas P180 e P75 foram as que apresentaram maior alteração em suas concentrações, sendo muito mais abundantes na hemolinfa de lagartas parasitadas. Em alguns casos, como a P75, a concentração da proteína se manteve elevada na hemolinfa da lagarta parasitada no período mais tardio de amostragem, enquanto na lagarta não-parasitada era quase indetectável (Figura 3). Apesar de alguns peptídeos ocorrerem pontualmente na hemolinfa de lagartas parasitadas, não foi possível verificar com segurança a ocorrência de peptídeos específicos do parasitismo.

Figura 3 – Quantidade de proteínas (µg) em lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 1, 3, 5, 7 e 9 dias do parasitismo, que diferiram (teste *t*; $p < 0,05$) em, pelo menos, um dos períodos amostrais (indicado por “*”). A – Proteína de 60 kDa; B – Proteína de 75 kDa; C – Proteína de 180 kDa

4.2 Efeitos do parasitismo no transcrito de *S. frugiperda*

4.2.1 Processamento dos dados de sequenciamento

A identificação de genes expressos diferencialmente nos tecidos do hospedeiro *Spodoptera frugiperda* na fase inicial do parasitismo por *Campoletis flavicincta* foi gerada a partir da análise das leituras obtidas pelo sequenciamento de bibliotecas de cDNA de três períodos amostrais (06, 24 e 72 h após o parasitismo). O valor de Phred das sequências foi 40, o que significou 99,99% de acurácia no sequenciamento de cada fragmento. O controle de qualidade da inserção de cada nucleotídeo nas diferentes posições das sequências também foi realizado, resultando na permanência de 130.280.247 sequências para análises posteriores no programa CLC Genomics Workbench v.6 (CLC BIO).

4.2.2 Construção de transcrito *de novo*

A construção de um transcrito *de novo* foi necessária para as análises de RNA-Seq para o fornecimento de um conjunto de transcritos de referência e a continuidade dos estudos de expressão gênica diferencial entre lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* e aquelas não-parasitadas, uma vez que o genoma desta espécie ainda não está disponível nos bancos de dados. O transcrito *de novo*, construído a partir das leituras obtidas do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas não-parasitadas nos três períodos amostrais (06, 24 e 72 h após o parasitismo), resultou no alinhamento de 88,6% das leituras, com a montagem de 27.978 transcritos, com tamanho médio de 504 nucleotídeos e N50 de 553 pb (Tabela 1).

Tabela 1 – Números estatísticos do transcrito *de novo* montado a partir das leituras obtidas do sequenciamento de bibliotecas de cDNA via plataforma Illumina

	Número	Tamanho médio	Total de bases
Alinhados	50.606.106	71,99	3.643.009.416
Não-alinhados	6.506.721	78,64	511.696.477
Transcritos	27.978	504	14.098.941
Leituras	57.112.827	72,75	4.154.705.893
N75		342	
N50		553	
N25		1.059	
Mínimo		200	
Máximo		14.629	
Média		504	

4.2.3 Análise da expressão diferencial de transcritos dos tecidos do hospedeiro durante o desenvolvimento inicial do parasitoide

O parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* induziu alterações significativas nos níveis de expressão de 1.189 transcritos presentes no transcrito *de novo* durante o desenvolvimento inicial do parasitoide, ou seja, 4,25% dos 27.978 transcritos encontrados neste transcrito apresentaram alteração significativa (teste *t*, $p < 0,05$) na razão de expressão relativa de pelo menos 1,3 vezes entre lagartas parasitadas e não-parasitadas (Figura 4). Destes 1.189 transcritos diferencialmente expressos, 72,7% foram total ou

parcialmente inibidos pelo parasitismo, enquanto que os 27,3% restante foram superexpressos em lagartas parasitadas.

Figura 4 – Distribuição dos transcritos do transcriptoma *de novo* de lagartas de *Spodoptera frugiperda* após análise de expressão diferencial entre lagartas parasitadas ou não por *Campoletis flavicincta*. Os pontos referem-se aos 27.978 transcritos do transcriptoma *de novo* e o resultado da análise de sua expressão diferencial entre tratamento (P) e controle (NP). Pontos vermelhos representam sequências que não apresentaram diferença na expressão relativa entre tratamento e controle, enquanto os pontos azuis indicam sequências expressas diferencialmente no parasitado em relação ao controle (teste *t*; $p < 0,05$; expressão relativa $\geq 1,3$)

Utilizando a ferramenta Blast2Go, 495 sequências não apresentaram identificação putativa (N.A.) e 167 sequências apresentaram semelhantes nos bancos de dados, mas não foram distribuídas nas diferentes ontologias gênicas (GO terms) por tratar-se de proteínas putativas ou que ainda não tiveram sua função nos organismos esclarecida. Outras 93 sequências foram apenas distribuídas nas diferentes ontologias gênicas (GOs), e 434 foram devidamente anotadas, apresentando identificação putativa, distribuição nas diferentes ontologias gênicas e em vias metabólicas (E.C).

As sequências diferencialmente expressas obtidas na análise de RNA-Seq se assemelharam às sequências de outras espécies de lepidópteros disponíveis no banco de dados do NCBI, principalmente *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) (65,7%) e *Bombyx*

mori (6,5%) (Lepidoptera: Bombycidae) (Figura 5), visto que as mesmas apresentam genomas completos disponíveis para a consulta.

Figura 5 – Distribuição dos alinhamentos de transcritos de *S. frugiperda* expressos diferencialmente após busca de similaridade junto ao banco de dados do NCBI

A anotação funcional e posterior distribuição das sequências nas diferentes funções desempenhadas no organismo revelou a participação de grande parte dos transcritos diferencialmente expressos em lagartas parasitadas em processos metabólicos e celulares, assim como respostas a estímulos, e a importância da regulação destas vias para o desenvolvimento do parasitoide durante os primeiros dias de parasitismo (Figura 6). Os transcritos também se distribuíram em diversas classes de componentes celulares e funções moleculares, destacando-se, nestes casos, as ligações catalíticas e o transporte de elétrons (Figura 6).

Figura 6 – Distribuição dos transcritos de *S. frugiperda* diferencialmente expressos devido ao parasitismo por *C. flavicincta* ($p < 0,05$; expressão relativa $\geq 1,3$) e funcionalmente anotados nas diferentes ontologias gênicas (GOs)

Entre os transcritos que apresentaram alterações no valor médio de expressão relativa (“fold change”) superiores a cinco em lagartas parasitadas, encontram-se a hemolectina, relacionada à resposta imunológica do hospedeiro (SHELBY; POPHAM, 2009), e proteínas do citocromo P450, as quais participam de funções diversas, entre elas, a detoxificação de moléculas nocivas (ZHOU; ZHANG; ZHOU, 2012). A grande maioria desses transcritos, porém, não apresentou qualquer identificação putativa (Tabela 2).

Já para os transcritos que sofreram forte supressão, dada pela redução no valor médio de expressão relativa em pelo menos cinco vezes, destacam-se a lectina tipo c, a qual apresenta domínio característico de proteínas que participam da adesão célula-célula, resposta imunológica a patógenos e apoptose (FANG et al., 2011), a quitinase, proteína envolvida no processamento de quitina (KHAJURIA et al., 2010) e a proteína com domínio repetido rico em leucina, envolvida na ativação das respostas imunológicas celulares dos insetos (Tabela 3).

Tabela 2 – Transcritos com valor de expressão relativa superior a cinco em lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo em relação àquelas não-parasitadas

Transcritos	Expressão relativa	p- valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_21763	5,33	0,002	transcritase reversa (EHJ73827.1)	$6,9 \times 10^{-15}$
contig_16162	5,40	0,007	não identificada	
contig_22326	5,44	0,029	domínio tbc 1 (EHJ66643.1)	$2,1 \times 10^{-35}$
contig_24955	5,44	0,029	não identificada	
contig_18277	5,50	0,029	não identificada	
contig_19436	5,50	0,004	não identificada	
contig_22578	5,50	0,007	não identificada	
contig_6658	5,50	0,001	dihidropirimidinase (EFZ10093.1)	$1,2 \times 10^{-64}$
contig_18874	5,80	0,009	não identificada	
contig_6901	5,86	0,006	proteína tumoral d54 (EHJ71130.1)	$1,6 \times 10^{-51}$
contig_10156	6	0,043	proteína hipotética KGM_10436 (EHJ66229.1)	$8,4 \times 10^{-26}$
contig_23050	6,18	0,003	citocromo P450 (AFP20595.1)	$1,1 \times 10^{-52}$
contig_5314	6,25	0,043	não identificada	
contig_12338	6,33	0,017	proteína hipotética KGM_04642 (EHJ77626.1)	$7,6 \times 10^{-35}$
contig_12686	6,33	0,017	proteína hipotética KGM_06309 (EHJ77347.1)	$4,1 \times 10^{-35}$
contig_8097	6,50	0,049	não identificada	
contig_19879	6,67	0,015	hemolectina (EHJ75969.1)	$1,8 \times 10^{-37}$
contig_14437	6,75	0,028	não identificada	
contig_19700	6,78	0,022	carreador de solutos membro 4 (EHJ65709.1)	$1,1 \times 10^{-20}$
contig_19801	6,88	0,041	não identificada	
contig_18135	7,14	0,031	não identificada	
contig_13508	7,75	0,009	não identificada	
contig_20995	7,88	0,008	não identificada	
contig_18397	20,25	0,009	não identificada	

Tabela 3 – Transcritos com valor de expressão relativa média inferiores a cinco em lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo em relação àquelas não-parasitadas

Transcritos	Expressão relativa	p- valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_21261	-8	0,008	não identificada	
contig_4788	-7,14	0,015	não identificada	
contig_100	-7,08	0,031	lectina tipo c (AFI47451.1)	$8,3 \times 10^{-15}$
contig_12337	-7	0,029	não identificada	
contig_13819	-7	0,041	semelhante ao antígeno cd109 (EHJ64472.1)	$5,3 \times 10^{-52}$
contig_7219	-7	0,013	proteína hipotética KGM_13458 (EHJ66254.1)	$7,4 \times 10^{-38}$
contig_17886	-6,67	0,023	proteína 3 udp-glucosiltransferase (AEW43126.1)	$9,0 \times 10^{-22}$
contig_10754	-6,57	0,049	aminoacilase (EHJ69102.1)	$8,0 \times 10^{-54}$
contig_11848	-6,43	0,025	quinase 8 dependente de ciclina (NP_001162054.2)	$4,1 \times 10^{-89}$
contig_15883	-6,43	0,040	oligopeptídeo transportador (EHJ74019.1)	$5,4 \times 10^{-36}$
contig_19991	-6,33	0,017	não identificada	
contig_18060	-6,29	0,030	não identificada	
contig_26070	-6,17	0,042	quitinase (EHJ66839.1)	$1,7 \times 10^{-17}$
contig_19448	-6,13	0,008	não identificada	
contig_21035	-6	0,023	proteína com domínio repetido rico em leucina (EHJ72564.1)	$1,6 \times 10^{-75}$
contig_22510	-6	0,038	não identificada	
contig_7463	-6	0,040	proteína 3 que contém wd repetido (EHJ76167.1)	$2,1 \times 10^{-69}$
contig_9359	-6	0,044	não identificada	
contig_22531	-5,86	0,026	espingomielina sintetase (EHJ68689.1)	$1,3 \times 10^{-14}$
contig_14136	-5,83	0,048	não identificada	
contig_18450	-5,83	0,015	precursor fa-amarelo (BAM18870.1)	$6,3 \times 10^{-17}$
contig_5806	-5,82	0,031	dehidrogenase de hidroxibutirato (BAM20756.1)	$3,4 \times 10^{-19}$
contig_25039	-5,78	0,025	proteassoma 26s (EHJ77434.1)	$8,3 \times 10^{-9}$
contig_20461	-5,75	0,021	proteína miotonina quinase (XP_003425741.1)	$1,5 \times 10^{-61}$

A seleção de transcritos após sua anotação funcional de acordo com o envolvimento em diferentes vias do metabolismo de *S. frugiperda* de interesse permitiu a formação de quatro grupos de transcritos: *i*) transcritos envolvidos no metabolismo de carboidratos, *ii*) transcritos relacionados às proteínas de armazenamento, *iii*) transcritos atuantes no processo de metamorfose, na síntese ou degradação de hormônios e *iv*) transcritos relacionados às respostas imunológicas.

Dos transcritos envolvidos no metabolismo de carboidratos, aqueles que fazem parte das vias de ativação da metabolização da glicose pela maquinaria celular, desde sua passagem pela membrana plasmática até seu armazenamento em forma de glicogênio através de fosforilações, foram supressos (Tabela 4). Estes transcritos sofreram maior redução logo no início do parasitismo (06 h) ou próximo à eclosão das larvas (72 h) (Figura 7). Apesar das diferenças na expressão relativa desse conjunto de transcritos, o padrão de expressão do conjunto ao longo dos períodos amostrais mostra que o padrão de expressão a 06 h e 72 h são mais próximos dentro de cada condição, parasitada e não-parasitada, se comparado ao padrão obtido a 24 h (Figura 7). Apenas um transcrito, *contig_13751*, identificado putativamente como um transportador de açúcar (*e. valor* = $4,05 \times 10^{-47}$) foi regulado positivamente durante o desenvolvimento inicial do parasitoide, apesar de dois outros transcritos (*contig_2213* e *contig_8614*) com a mesma identificação putativa apresentarem regulação negativa nas lagartas parasitadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos de *S. frugiperda* e que foram expressos diferencialmente em lagartas após 06, 24 e 72 h do parasitismo por *C. flavicincta*, em relação às lagartas não-parasitadas

Transcritos	Expressão relativa	p-valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_23738	- ∞	0,024	proteína forkhead box n3 (EGI61721.1)	$4,5 \times 10^{-47}$
contig_25938	- ∞	0,043	complexo tuberous sclerosis 2 (EHJ76090.1)	$1,0 \times 10^{-44}$
contig_26293	- ∞	0,015	inositol polifosfato fosfatase múltiplo (EHJ67074.1)	$1,4 \times 10^{-23}$
contig_15271	-5,5	0,02	fosfatidilinositol trifosfato 3-fosfato (EFN66467.1)	$1,1 \times 10^{-44}$
contig_2240	-5,5	0,027	fosfatidilinositol 3-quinase catalítica - subunidade tipo 3 (EHJ74132.1)	$1,6 \times 10^{-68}$
contig_26816	-4,44	0,007	inositol hexakisfosfato e quinase difosfoinositol-pentakisfosfate (XP_003690084.1)	$1,0 \times 10^{-30}$
contig_20048	-4,29	0,007	fosfatidilinositol-glicano âncora de biossíntese classe u (EHJ71531.1)	$1,3 \times 10^{-55}$
contig_2232	-2,41	0,001	transportador de açúcar (EHJ69219.1)	$6,6 \times 10^{-8}$
contig_2213	-2,07	0,041	fator citosólico fe-s homólogo ao nubp1 (XP_003492652.1)	$1,0 \times 10^{-102}$
contig_4706	-1,94	0,041	3-quinase c de inositol trifosfato 3 (BAM19949.1)	$7,3 \times 10^{-69}$
contig_8614	-1,55	0,013	transporte de açúcar (EHJ74627.1)	$2,7 \times 10^{-40}$
contig_13751	1,48	0,032	transportador de açúcar (EHJ72284.1)	$4,1 \times 10^{-47}$

Figura 7 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

Transcritos envolvidos na síntese de proteínas de armazenamento e/ou transporte, também sofreram regulação durante o parasitismo de lagartas de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* (Tabela 5). Algumas dessas proteínas também podem ter função na resposta imunológica e na detoxificação do organismo, como a proteína rica em glicina e a proteína de 210 kDa (RAJAMOHAN et al., 1996; ZHANG et al., 2013), as quais sofreram regulação negativa (Tabela 5). No entanto, as lipoproteínas (transcritos contig_14696 e contig_17948) e a proteína rica em serina-treonina (contig_21232) sofreram regulação positiva durante o parasitismo (Tabela 5).

Tabela 5 – Transcritos de interesse relacionados a proteínas de armazenamento obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

Transcritos	Expressão relativa	p-valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_23994	$-\infty$	0,03	gama-secretase subunidade aph-1 (XP_001842513.1)	$6,8 \times 10^{-22}$
contig_21426	-3,5	0,044	receptor de lipoproteína de baixa densidade (XP_002413538.1)	$8,4 \times 10^{-19}$
contig_23739	-2,24	0,044	proteína semelhante a arginina n-metiltransferase (XP_003492977.1)	$3,2 \times 10^{-37}$
contig_85	-1,95	0,034	proteína de 210 kDa (BAB16608.1)	$5,2 \times 10^{-30}$
contig_12621	-1,84	0,026	proteína rica em glicina (xp_002430267.1)	$7,3 \times 10^{-59}$
contig_14696	1,35	0,013	apolipoproteína d (EHJ71199.1)	$7,6 \times 10^{-137}$
contig_17948	2,19	0,002	lipoproteína de baixa densidade (XP_002430267.1)	$2,9 \times 10^{-60}$
contig_11163	2,2	0,023	cubilina (EHJ68165.1)	$4,6 \times 10^{-51}$
contig_21232	5	0,018	proteína rica em serina-treonina (XP_001605757.1)	$1,1 \times 10^{-12}$

O conjunto de transcritos selecionados dentro da categoria de proteínas de armazenamento/transporte formaram dois grupos bem definidos devido ao seu padrão de expressão nos diferentes períodos amostrais de lagartas parasitadas e não-parasitadas (Figura 10). Um grupo foi formado pelos transcritos contig_23994, contig_21426, contig_23739, contig_12621 e contig_85, e o outro agrupou os transcritos contig_11163, contig_14696, contig_17948 e contig_21232 (Figura 9). Enquanto o primeiro sofreu forte supressão em lagartas parasitadas nos três períodos observados (06, 24 e 72 h após o parasitismo) se comparadas aos períodos correspondentes em lagartas não-parasitadas, o segundo grupo de transcritos, apesar de ter expressão relativa reduzida no início do parasitismo (06 h), sofreu forte regulação positiva 24 e 72 h após o parasitismo em relação às lagartas não-parasitadas (Figura 9). O transcrito contig_23994 (gama-secretase subunidade aph-1) foi o único a ser altamente supresso nos diferentes períodos de avaliação em lagartas parasitadas (Figura 9).

Figura 8 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados ao metabolismo de proteínas para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

Os transcritos relacionados à síntese e degradação de hormônios foram regulados negativa ou positivamente em resposta ao parasitismo (Tabela 6). Quatro transcritos expressos diferencialmente apresentaram regulação negativa devido ao parasitismo, enquanto que transcritos, como a enzima catalisadora da síntese de hormônio juvenil (contig_800 - *o*-

metiltransferase do ácido farnesoico), que mantém as características juvenis dos insetos durante as ecdises, foram superexpressos em lagartas parasitadas.

Tabela 6 – Transcritos de interesse relacionados à síntese e degradação de hormônios obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

Transcritos	Expressão relativa	p-valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_10866	- ∞	0,017	receptor de neuropeptídeo (NP_001127707.1)	$8,8 \times 10^{-69}$
contig_13173	-3,67	0,005	receptor de hormônio nuclear (BAA34123.1)	$7,9 \times 10^{-85}$
contig_10003	-2,29	0,032	proteína induzível pelo hormônio juvenil (EHJ78467.1)	$2,8 \times 10^{-17}$
contig_4252	-1,92	0,044	proteína que contém domínio de EGF (EFN75095.1)	$3,9 \times 10^{-11}$
contig_3499	1,31	0,039	receptor de EGF (EHJ79031.1)	0
contig_1471	1,33	0,031	receptor de adiponectina (EHJ69172.1)	0
contig_2584	1,33	0,044	o-aciltransferase de esterol (EHJ74688.1)	$3,8 \times 10^{-100}$
contig_761	1,33	0,003	progestina e receptor de adipoq, membro 3 (XP_0003694576.1)	$4,6 \times 10^{-133}$
contig_800	1,34	0,04	o-metiltransferase do ácido farnesoico (BAM20323.1)	$1,8 \times 10^{-29}$
contig_2300	1,73	0,032	proteína tbc regulada pelo hormônio de crescimento (XP_003707306.1)	$3,1 \times 10^{-81}$

A expressão dos transcritos relacionados às vias endócrinas apresentou, de modo geral, supressão mais intensa logo no início do parasitismo (06h), seguida de superexpressão após 24 h do parasitismo e voltando a ter reduzido os níveis de expressão 72 h após o parasitismo (Figura 9). O transcrito *contig_10866* foi o único entre os transcritos relacionados às vias endócrinas que manteve inalterados os níveis de transcrição relativa durante todo o início do parasitismo, sendo totalmente inibido nos três períodos amostrais (Figura 9). Os transcritos que sofreram regulação positiva em lagartas parasitadas em relação às não-parasitadas (*contig_3499*, *contig_800*, *contig_761*, *contig_1471*, *contig_2584* e *contig_2300*), apresentaram pico de expressão 24 h após o parasitismo (Figura 9).

Figura 9 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados à síntese e degradação de hormônios para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

O sistema imunológico do hospedeiro apresentou o maior número de sequências devidamente anotadas e diferencialmente expressas. Diversos transcritos relacionados à ativação do sistema imunológico, como tirosinas-fosfatases e receptores *scavenger* foram supressos em lagartas parasitadas, enquanto que as proteínas inibidoras das cascatas de fenoxidases e de peptídeos antimicrobianos foram reguladas positivamente em indivíduos parasitados (Tabela 7, Figura 10).

Tabela 7 – Transcritos de interesse relacionados à resposta imunológica do hospedeiro obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

Transcritos	Expressão relativa	p-valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_18644	- ∞	0,011	receptor <i>scavenger</i> , classe b membro 4 (NP_001164651.1)	$3,0 \times 10^{-37}$
contig_20815	- ∞	0,016	supressor de citoquina 6 (EHJ72563.1)	$2,1 \times 10^{-79}$
contig_20987	- ∞	0,006	precursor de hemocitina (EHJ7607.1)	$1,9 \times 10^{-28}$
contig_21280	- ∞	0,001	proteína serina treonina quinase (CBH09274.1)	$2,9 \times 10^{-30}$
contig_21337	- ∞	0,005	proteína rica em cisteína com domínio semelhante ao EGF (EG166326.1)	$3,2 \times 10^{-18}$
contig_23871	- ∞	0,035	proteína com domínio de anquirina repetida (YP_001975093.1)	$2,0 \times 10^{-7}$
contig_26932	- ∞	0,008	proteína tirosina-fosfatase (EHJ78088.1)	$2,8 \times 10^{-17}$
contig_9548	- ∞	0,005	proteína tirosina quinase (EHJ65085.1)	$5,4 \times 10^{-60}$
contig_100	-7,08	0,031	lectina tipo c (AFI47451.1)	$8,3 \times 10^{-15}$
contig_21035	-6	0,023	proteína que contém domínio repetido rico em leucina (XP_001602996.2)	$3,8 \times 10^{-24}$
contig_11015	-4,25	0,006	precursor de serina proteinase (AFK93534.1)	$2,9 \times 10^{-25}$
contig_7461	-2,43	0,044	proteína serina-treonina quinase (XP_003691414.1)	$6,5 \times 10^{-47}$
contig_8254	-2,25	0,002	receptor de lipocalina (EHJ70948.1)	$6,6 \times 10^{-43}$
contig_6459	-2,21	0,049	proteína serina-treonina quinase (EHJ64232.1)	0
contig_18745	-2,17	0,02	inibidor de serina protease (AEW46895.1)	$1,4 \times 10^{-38}$
contig_16352	-2,11	0,038	precursor de tripsina iib (AAT95350.1)	$1,2 \times 10^{-33}$
contig_986	-1,78	0,039	lectina 5 tipo c (AF147450.1)	$1,4 \times 10^{-127}$
contig_14987	-1,77	0,017	precursor de lectina humoral (BAA03124.1)	$5,5 \times 10^{-63}$
contig_13630	1,35	0,042	protease semelhante à quimiotripsina (ACR15971.2)	$9,8 \times 10^{-33}$
contig_1827	1,35	0,027	proteína de reconhecimento de β -glucano (ACI32825.1)	0
contig_4066	1,40	0,014	inibidor de proteína de apoptose (AAF35285.1)	0

Tabela 7 – Transcritos de interesse relacionados à resposta imunológica do hospedeiro obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

(continuação)

Transcritos	Expressão relativa	p-valor	Identificação putativa (Número de acesso)	e. valor
contig_4116	1,41	0,020	serina protease semelhante à tripsina (EHJ67268.1)	$3,8 \times 10^{-103}$
contig_7961	1,43	0,010	precursor de proteinase semelhante à tripsina (BAH58096.1)	$4,1 \times 10^{-67}$
contig_17211	1,46	0,006	ataxina putativa (EHJ75025.1)	$2,6 \times 10^{-55}$
contig_6421	1,47	0,030	fator induzido por LPS (AGG38002.1)	$2,2 \times 10^{-12}$
contig_15548	1,47	0,019	inibidor de serina protease (ACZ81437.1)	$2,0 \times 10^{-35}$
contig_2760	1,53	0,008	proteína de reconhecimento de peptidoglicano (EHJ79021.1)	$4,0 \times 10^{-43}$
contig_2514	1,53	0,028	proteinase 21 de hemolinfa (NP_001243984.1)	$5,2 \times 10^{-173}$
contig_12648	1,53	0,002	receptor do macrófago eritroblasto, isoforma 1 (XP_39515.3)	$6,3 \times 10^{-53}$
contig_279	1,62	0,004	serpina b6 (AEW46892.10)	0
contig_14061	1,7	0,034	proteinase 6 de hemolinfa (AAV91004.1)	$1,4 \times 10^{-39}$
contig_11087	1,71	0,005	galerimicina (AAQ18896.1)	$3,6 \times 10^{-24}$
contig_19612	1,89	0,007	anquirina repetida (XP_003693913.1)	$2,3 \times 10^{-18}$
contig_12375	1,91	0,005	serina protease 48 (ACR16002.2)	$8,4 \times 10^{-44}$
contig_9028	1,97	0,041	proteína semelhante à lisozima (EHJ75441.1)	$1,8 \times 10^{-46}$
contig_1340	2,33	0,01	inibidor de serina protease (BAM18904.1)	$8,0 \times 10^{-70}$
contig_12465	2,42	0,046	serina protease (ACG61190.1)	$3,3 \times 10^{-75}$
contig_11110	2,63	0,005	proteína inibidora de fenoloxidase (ABK29497.1)	$9,5 \times 10^{-07}$
contig_20827	2,84	0,034	precursor de atacina (P50725.1)	$3,0 \times 10^{-74}$

Tabela 7 – Transcritos de interesse relacionados à resposta imunológica do hospedeiro obtidos da análise do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e não-parasitadas por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

(conclusão)

Transcritos	Expressão relativa	<i>p</i> -valor	Identificação putativa (Número de acesso)	<i>e. valor</i>
contig_19896	3,13	0,012	proteína de reconhecimento de peptidoglicano (AFP231161.1)	$1,1 \times 10^{-42}$
contig_15090	3,67	0,007	complemento de macroglobulina (XP_001655971.1)	$2,4 \times 10^{-44}$
contig_4129	4,45	0,021	proteína carreadora de nik e ikk (XP_001844025.1)	$6,7 \times 10^{-17}$
contig_19879	6,67	0,015	hemolectina (EHJ75969.1)	$1,8 \times 10^{-37}$

Os transcritos relacionados ao sistema imunológico formaram dois grandes grupos de acordo com o padrão de expressão nos diferentes períodos amostrais de lagartas parasitadas e não-parasitadas. Um desses conjuntos foi caracterizado pela forte supressão da transcrição desde o início do parasitismo, enquanto que em lagartas não-parasitadas, os valores de expressão são semelhantes desde 06 h do parasitismo. Já o segundo grupo, mesmo tendo sofrido supressão no início do parasitismo (06 h), acabou sofrendo forte regulação positiva após 24 e 72 h nos insetos parasitados se comparados aos não-parasitados (Figura 11).

Figura 10 – Cluster formado a partir da análise dos valores de RPKM dos transcritos relacionados à síntese e degradação de hormônios para lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não parasitadas (NP) por *C. flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo

4.2.4 Confirmação da expressão gênica diferencial de transcritos selecionados do hospedeiro durante o desenvolvimento inicial do parasitoide por PCR quantitativa em tempo real

Os transcritos contig_800, contig_11110 e contig_279, diferencialmente expressos entre lagartas parasitadas e não-parasitadas, foram selecionados para validação dos níveis de

expressão comparativa via PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A seleção dos transcritos para análise via qPCR foi direcionada pela exploração dos dados referentes ao nível de expressão relativa obtida entre lagartas parasitadas (P) e não-parasitadas (NP) e de observação dos valores de RPKM de cada transcrito nos diferentes períodos amostrais (06, 24 e 72 h após o parasitismo).

Os transcritos selecionados para validação dos níveis de expressão por qPCR, relacionados à resposta imunológica, *contig_11110* (proteína inibidora de fenoloxidases) e *contig_279* (serpina b6) e à síntese de hormônio juvenil, *contig_800* (*o*-metiltransferase do ácido farnesoico) apresentaram concordância com os resultados obtidos na análise de RNA-Seq, apresentando expressão elevada em lagartas parasitadas também durante a validação em qPCR (Figura 11).

Figura 11 – Número de cópias do transcrito selecionados para validação dos dados de RNA-Seq em qPCR nos diferentes períodos amostrais (06, 24 e 72 h após o parasitismo) em lagartas de *S. frugiperda* parasitadas (P) e não parasitadas (NP) por *C. flavicincta*. A – *contig_800* (*o*-metiltransferase de ácido farnesoico; B – *contig_11110* (proteína inibidora de fenoloxidase); C – *contig_279* (serpina b6)

4.2.5 Identificação e expressão diferencial de transcritos virais no transcrito de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta*

A construção de transcrito *de novo* para a identificação de transcritos virais ocorreu a partir das leituras obtidas no sequenciamento de bibliotecas de cDNA de lagartas parasitadas nos três períodos amostrais (06, 24 e 72 h após o parasitismo) resultou no alinhamento de 59,4% das leituras, com a montagem de 20.654 transcritos, de tamanho médio de 348 nucleotídeos.

A busca por transcritos de origem viral durante o início do desenvolvimento do parasitoide no hospedeiro *S. frugiperda* pela análise do transcrito *de novo*, montado à partir das leituras do sequenciamento das bibliotecas de lagartas parasitadas, resultou na identificação de 22 transcritos com alta homologia a sequências de outros Polydnaviridae depositadas no banco de dados do NCBI (Tabela 8). Alguns transcritos apresentam valores de homologia distintos em relação a uma mesma sequência-referência, indicando que o Ichnovírus associado a *C. flavicincta* pode trazer repertório de proteínas que carregam diferenças em relação às proteínas dos demais Ichnovírus que apresentam sequências disponíveis (Tabela 8). Os transcritos apresentaram sequências homólogas àquelas dos polidnavírus (PDV) associados à *Campoletis sonorensis*, *Tranosema rostrale* e *Hyposoter fugitivus*, todos pertencentes aos Ichnovírus. O alinhamento indicou a presença de quatro famílias gênicas virais importantes na colonização do hospedeiro *S. frugiperda*: “*anquirina viral*”, “*elemento repetido*”, “*motivo-cisteína*” e “*família-N*”.

Tabela 8 – Sequências obtidas na construção do transcrito *de novo* utilizando-se o sequenciamento de nova geração de bibliotecas de cDNA de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C.flavicincta* após 06, 24 e 72 h do parasitismo, identificadas e alinhadas à sequências virais depositadas no banco de dado do NCBI

Sequências	Espécie relacionada	Número de acesso	e- valor
contig_18203 – proteína do elemento repetido	<i>Tranosema rostrale</i> ichnovirus	BAF45610.1	$3,30 \times 10^{-12}$
contig_9654 – proteína do elemento repetido	<i>T. rostrale</i> ichnovirus	BAF45769.1	$5,61 \times 10^{-17}$
contig_9653 – proteína do elemento repetido	<i>T. rostrale</i> ichnovirus	BAF45598.1	$2,20 \times 10^{-34}$
contig_3958 – proteína do elemento repetido	<i>T. rostrale</i> ichnovirus	BAF45626.1	$2,39 \times 10^{-54}$
contig_4653 – proteína do elemento repetido	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAA42923.1	$1,33 \times 10^{-15}$
contig_12388 – anquirina viral 1	<i>Hyposoter fugitivus</i> ichnovirus	YP_001031239.1	$3,82 \times 10^{-14}$
contig_8779 – anquirina viral	<i>H. fugitivus</i> ichnovirus	YP_001031239.1	$8,39 \times 10^{-21}$
contig_6967 – anquirina viral	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAX56953.1	$1,46 \times 10^{-18}$
contig_5714 – anquirina viral 1	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAX56954.1	$2,34 \times 10^{-31}$
contig_3929 – anquirina viral 1	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAX56959.1	$3,06 \times 10^{-91}$
contig_20536 – anquirina viral 1	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAX56954.1	$4,34 \times 10^{-44}$
contig_1189 – anquirina viral 1	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAX56953.1	$3,51 \times 10^{-94}$
contig_1193 – anquirina viral	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAX56953.1	$8,42 \times 10^{-121}$
contig_3941 – gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAO43443.1	$3,08 \times 10^{-114}$
contig_16090 – proteína rica em cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	YP_589077.1	$9,86 \times 10^{-47}$
contig_3716 – gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAA79357.1	$5,30 \times 10^{-38}$
contig_181 – gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	YP_589079.1	$3,49 \times 10^{-45}$
contig_796 – proteína precursora do gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAO43446.1	$3,55 \times 10^{-27}$
contig_1153 – proteína precursora do gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAO43444.1	$3,06 \times 10^{-38}$
contig_1712 – proteína precursora do gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAO43446.1	$4,55 \times 10^{-7}$
contig_1713 – proteína precursora do gene motivo-cisteína	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAO43446.1	$1,13 \times 10^{-27}$
contig_319 – proteína NHV1.2	<i>C. sonorensis</i> ichnovirus	AAS79017.1	$8,36 \times 10^{-23}$

As análises de expressão em lagartas parasitadas nos diferentes períodos amostrais (06, 24 e 72 h) indicaram um padrão de expressão temporal específico para os transcritos identificados (Tabela 9). Dos 22 transcritos virais identificados, 15 foram expressos 6 h após o parasitismo, 21 após 24 h e 14 após 72 h (Tabela 9). A maioria dos transcritos das quatro famílias gênicas identificadas foram expressos 24 h após o parasitismo. Doze dos 22 transcritos identificados foram expressos nos três períodos amostrais observados, tendo, pelo menos, um transcrito em cada família gênica (Tabela 9). Os valores de expressão mais elevados foram encontrados para os transcritos de proteínas de “motivo-cisteína”, todos com RPKM superior a 80 após 24 h do parasitismo (Tabela 9). O transcrito contig_181, identificado putativamente como uma proteína de motivo-cisteína (Tabela 9), foi o mais abundantemente expresso, atingindo valores de RPKM de 2.521,1 após 24 h do parasitismo (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de expressão relativa e RPKM dos transcritos identificados como relacionados aos genes do ichtnovírus associado ao parasitoide *C. flavicincta* durante o parasitismo de lagartas de *S. frugiperda* após 06, 24 e 72 h

Transcritos	Expressão relativa			RPKM		
	06	24	72	06	24	72
"Elemento repetido"						
contig_18203	0	2,1	0	0	13,4	0
contig_3958	7,8	28,3	12	15,9	59,7	26,6
contig_4653	1,0	7,3	3,0	3,7	28,6	12,3
contig_9653	0	2,1	3,0	0	13,0	19,5
contig_9654	0	3,1	0	0	26,0	0
"Anquirina viral"						
contig_1189	12,7	8,4	25,0	42,6	29,2	91,4
contig_1193	4,9	8,4	5,0	16,8	30,0	18,8
contig_12388	0	1,0	0	0	7,1	0
contig_20536	0	0	2,0	0	0	18,3
contig_3929	1,9	9,4	2,0	6,5	32,5	7,3
contig_5714	0	1,0	0	0	6,9	0
contig_6967	1,0	1,0	2,0	6,6	7,4	14,8
contig_8779	1,0	1,0	0	7,1	7,9	0
"Motivo-cisteína"						
contig_3941	1,0	18,9	27,0	1,8	36,9	55,5
contig_1153	7,8	34,6	10,0	23,4	107,6	32,7
contig_16090	0	4,2	0	0	22,6	0
contig_1712	1,9	3,1	0	17,4	29,1	0
contig_1713	1,0	11,5	4,0	7,2	87,8	32,0

Tabela 9 – Valores de expressão relativa e RPKM dos transcritos identificados como relacionados aos genes do ichnovírus associado ao parasitoide *C. flavicincta* durante o parasitismo de lagartas de *S. frugiperda* após 06, 24 e 72 h

(conclusão)

Transcritos	Expressão relativa			RPKM		
	6	24	72	6	24	72
contig_181	82,8	1710,1	288,0	118,1	2521,1	446,7
contig_3716	1,0	1,0	0	6,1	6,8	0
contig_796	7,8	52,5	15,0	19,8	137,9	41,5
"Família-N"						
contig_319	1,9	8,4	7,0	6,2	27,5	24,1

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeitos do parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* no proteoma do hospedeiro

O desenvolvimento de endoparasitoides depende dos recursos que o hospedeiro possui, principalmente de nutrientes presentes na hemolinfa, onde o parasitoide permanece até o fim de seu estágio larval (BECKAGE; GELMAN, 2004). Proteínas são essenciais ao parasitoide e constituem importante alvo de regulação hospedeira, sendo sua síntese e armazenamento modificados durante o parasitismo (DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996).

A quantidade de proteínas presente na hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* foi, durante todo o desenvolvimento do parasitoide, maior do que a de lagartas não-parasitadas. A indução da liberação de nutrientes na hemolinfa em hospedeiros parasitados é estratégia comum a parasitoides, principalmente àqueles que atacam hospedeiros em instares larvais iniciais, já que os parasitoides encontram ambiente nutricional com quantidade limitada de recursos (HU; VINSON, 2000). Parasitoides “conformers” aguardarão que seus hospedeiros atinjam estágio de desenvolvimento adequado, quando então iniciarão seu desenvolvimento (LAWRENCE, 1986), enquanto que parasitoides reguladores necessitarão alterar rapidamente a disponibilidade de nutrientes, induzindo mudanças que levem ao aumento de recursos energéticos para seu consumo, como ocorre em lagartas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas por *Hypososter exiguae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) (THOMPSON, 1982; LAWRENCE, 1986), e aqui observado para *C. flavicincta*.

No caso de *C. flavicincta*, o desenvolvimento do hospedeiro é restrito ao quarto instar, estágio em que a atividade biossintética intensa, que precede à preparação para o inseto iniciar a fase de pupa, ainda é muito incipiente. Assim, o aumento na concentração de proteínas circulantes na hemolinfa parece ocorrer exclusivamente pela ativação precoce da produção de proteínas que só ocorreriam tardiamente no desenvolvimento do hospedeiro, visto que, diferentemente de outras espécies, não foram detectadas proteínas específicas do parasitismo (HOCHULI; LANZREIN, 2001; CÔNSOLI et al., 2005).

A produção antecipada dessas proteínas fica comprovada pela análise do perfil qualitativo de proteínas da hemolinfa de insetos parasitados, visto que foram detectadas diferenças significativas na abundância de proteínas de 75 kDa e 180 kDa. O padrão de ocorrência dessas proteínas no hospedeiro não-parasitado, associado à sua massa, indicam que as mesmas pertençam ao grupo das arilforinas e lipoforinas/proteínas ricas em metionina,

respectivamente (TELFER; KUNKEL, 1991; MARTINS; BITONDI, 2012; ZDYBICKA-BARABAS; CYTRYNSKA, 2013).

As proteínas de armazenamento, como as arilforinas e as proteínas ricas em metionina, seguem padrão de produção muito típico, visto que as mesmas são sintetizadas e acumuladas na hemolinfa do inseto até o momento em que se aproxima do término de seu desenvolvimento larval, e logo são reabsorvidas da hemolinfa pelo tecido adiposo (ARRESE; SOULAGES, 2009). A alteração temporal na disponibilidade de proteínas de armazenamento pode ser facilmente observada no inseto não-parasitado, visto que a P75 praticamente desaparece da hemolinfa do inseto no sétimo e nono dias após o parasitismo, quando esse inseto já está na fase de prepupa, contrariamente ao observado no inseto parasitado. Esse fato indica também que o parasitoide não apenas induz a síntese precoce das proteínas de armazenamento, como também regula o processo de reabsorção das mesmas pelo tecido adiposo. A regulação da abundância das proteínas de armazenamento é uma estratégia observada em várias interações hospedeiros – parasitoides, incluindo algumas que apresentam *S. frugiperda* como hospedeiro (PROVOST et al., 2011; DÓREMUS et al., 2013).

As proteínas de armazenamento, amplamente distribuídas entre os insetos, são secretadas na hemolinfa, principalmente pelo tecido adiposo, durante todo o estágio larval e abrangem moléculas que formam cadeias polipeptídicas hexa ou multihexaméricas, com subunidades de peso molecular por volta dos 75 kDa (TELFER; KUNKEL, 1991). As principais proteínas de armazenamento em lepidópteros são as arilforinas, compostas por glicoproteínas com baixo teor de metionina em sua composição e alta porcentagem de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina e tirosina, que ultrapassa os 15%, e as proteínas ricas em metionina, que, como sua denominação sugere, apresentam alto teor do aminoácido metionina, superando 4% de sua composição (WHEELER; BUCK, 1995; HAUNERLAND, 1996).

Embora apresentem padrão de produção típico às arilforinas, as proteínas ricas em metionina são produzidas apenas no final do último instar larval dos insetos, surgindo na hemolinfa mais tardiamente (ASHFAQ; SONODA; TSUMUKI, 2007). Após sua recaptura pelo tecido adiposo, porém, nem todos os grânulos formados a partir de proteínas ricas em metionina são utilizados na síntese dos novos tecidos do adulto, permanecendo, em fêmeas, intactas e passíveis de serem utilizadas na formação de ovos (RYAN; KEIM; WELLS; LAW, 1985). Por isso, muitas vezes as proteínas ricas em metionina são consideradas proteínas sexo-específicas ou são, então, reconhecidas como proteínas supressíveis pelo hormônio

juvenil, uma vez que aparecem após o decréscimo do nível deste hormônio, já ao final do último instar larval (MEMMEL et al., 1993).

Algumas espécies parasitoides são conhecidas por inibir a expressão de proteínas ricas em metionina, através da manipulação do sistema endócrino do hospedeiro. *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae) ao parasitar *Plutella xylostella* inibe a produção de ecdisteroides e, conseqüentemente, das proteínas ricas em metionina, enquanto que o parasitismo de *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae) leva ao aumento na expressão das proteínas ricas em metionina, demonstrando a diversidade de alterações que os parasitoides podem causar (IBRAHIM et al., 2006; WU et al., 2013).

As lipoforinas são proteínas envolvidas no transporte de lipídeos e são compostas por duas subunidades de alto peso molecular, apolipoproteína I (240 kDa) e II (80 kDa), além da apolipoproteína III, que apresenta baixo peso molecular (17-20 kDa) (RAVIKUMAR; VARDHANA; BASAVARAJA, 2011; ZDYBICKA-BARABAS; CYTRYNSKA, 2013). Lipoforinas sempre se tornam mais abundantes com o aumento da demanda energética do organismo, visto o seu papel no transporte de nutrientes. Porém, essas proteínas, como a apolipoproteína III, também participam de outros processos fisiológicos, estando envolvidas nas respostas imunológicas dos insetos contra patógenos pela ligação de seus receptores de reconhecimento a diversos componentes da parede celular e membrana plasmática de bactérias e fungos (SON; HWANG; KIM, 2012).

A inibição de lipoforinas durante o parasitismo já foi observada no sistema *Cotesia congregata* – *Manduca sexta*, mantendo nutrientes na hemolinfa do hospedeiro até o final de seu desenvolvimento larval, e evitando que a resposta imunológica se inicie e determine a eliminação do parasitoide, já que lipoforinas também podem desencadear respostas imunológicas (BECKAGE; KANOST, 1993). A inibição de apolipoproteínas de *S. frugiperda* durante o parasitismo por *C. flavicincta* pode ter sido observada também, pois a banda P60 (60 kDa), presente até o 5º DAP, sempre em menores quantidades em lagartas parasitadas, é totalmente ausente nos últimos dias de observação e pode representar a apolipoproteína II do complexo que forma estas lipoforinas.

5.2 Efeitos do parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* no transcrito do hospedeiro

O emprego de sequenciamento de nova geração no estudo dos efeitos do parasitismo sobre a expressão gênica do hospedeiro têm gerado importantes resultados, os quais tem auxiliado na elucidação dos mecanismos de regulação hospedeira nas interações hospedeiro-parasitoide (ETEBARI et al., 2011; ZHU et al., 2013).

A construção de um transcrito de referência de qualidade e sua utilização na análise de RNA-Seq permitiu selecionar transcritos potencialmente importantes à colonização do hospedeiro *S. frugiperda* pelo parasitoide *C. flavicincta*. Dos 27.978 transcritos pertencentes ao transcrito de referência, 1.189 foram diferencialmente expressos entre lagartas parasitadas e não-parasitadas, ou seja, 4,25% das sequências obtidas foram alterados pela presença do parasitoide durante a colonização e início de seu desenvolvimento no interior do hospedeiro. Embora parte destes transcritos ainda não tenham sido anotados funcionalmente, a inibição total ou parcial de 72,7% dos transcritos diferencialmente expressos entre lagartas parasitadas e não-parasitadas demonstra que muitos processos metabólicos e celulares estão sendo regulados pelo parasitoide e são importantes a sua sobrevivência no interior do hospedeiro.

Entre os grupos de transcritos relacionados às vias de interesse, o grupo que abrange moléculas que podem atuar no metabolismo de carboidratos apresenta grande parte de seus transcritos inibidos pelo parasitoide em desenvolvimento. O metabolismo da glicose depende de uma série de enzimas que ativam os transportadores de açúcar e levam ao armazenamento de carboidratos na forma de glicogênio ou sua manutenção para uso celular imediato como glicose, como o fosfatidilinositol trifosfato 3-fosfato (contig_15271; expressão relativa = -5,5) e a 3-quinase c do inositol-3-trifosfato (contig_4706; expressão relativa = -1,94) (MIRTH; RIDDIFORD, 2007). Dessa forma, a inibição da síntese de algumas enzimas pode impedir a entrada de glicose nas células e manter as moléculas na hemolinfa do hospedeiro, onde o parasitoide habita e necessita de nutrientes disponíveis para completar seu desenvolvimento larval.

A síntese de proteínas também é alterada pelo parasitismo em diversos sistemas, seja inibindo ou estimulando sua expressão. Durante a abordagem proteômica, observou-se a produção abundante de arilforinas e lipoproteínas em estágios avançados de parasitismo, enquanto que sua abundância na hemolinfa foi menor no início. No estudo do transcrito de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta*, embora não tenha ocorrido durante

todo o desenvolvimento do parasitoide, observou-se a superexpressão de lipoproteínas, que transportam as proteínas de armazenamento, ao mesmo tempo que seus receptores foram suprimidos. Pode-se dizer, então, que as proteínas são transportadas pelos tecidos do hospedeiro no início do parasitismo, porém, o seu armazenamento ainda é inibido, uma vez que a baixa expressão de receptores de lipoforinas pode prejudicar esta atividade do tecido adiposo (-3,5).

O sucesso do parasitismo também depende de alterações fisiológicas que permitem ao parasitoide se desenvolver no interior do hospedeiro (BECKAGE, 2004). Dentre essas alterações, as mudanças nas vias endócrinas são muito importantes para a manutenção do hospedeiro no estágio larval, em que o parasitoide poderá finalizar seu desenvolvimento larval. Assim, várias são as formas como parasitoides agem para regular os hormônios do hospedeiro, seja deteriorando as glândulas protorácicas, seja mantendo o nível de esterases baixo (DOVER; TANAKA; VINSON, 1995; SCHAFELLNER; MARKTL; SCHOPF, 2007).

O transcrito anotado como *o*-metiltransferase do ácido farnesoico é uma importante enzima na síntese de hormônio juvenil, catalisando a produção de um de seus precursores (VANNINI et al., 2010). A elevada expressão relativa desse transcrito em lagartas parasitadas indica que a síntese de hormônio juvenil possa ser uma importante via de manutenção do estágio larval do hospedeiro, diferentemente de outros parasitoides, como *Campoletis sonorensis*, que impede a muda do hospedeiro pela destruição da glândula protorácica de seu hospedeiro, a qual é responsável pela produção de ecdisteroides (VINSON, 1995).

A resposta imunológica do hospedeiro é combatida para que o parasitoide possa se desenvolver em seu interior. Para isso, as vias de ativação do sistema de defesa podem ser alvos de supressão, enquanto que a expressão de genes que mantêm células de defesa imaturas ou inativam as cascatas de fenoloxidasas podem ser estimuladas (ZHU et al., 2013). Em geral, isto foi observado nos resultados relacionados ao sistema imunológico. Várias proteínas inibidoras da cascata de fenoloxidasas, como os dois transcritos selecionados para a validação do RNA-Seq – contig_11110 (proteína inibidora de fenoloxidasas) e contig_279 (serpina b6) – apresentaram valores de expressão relativa maior em lagartas parasitadas em todos os períodos de parasitismo estudados. Essas observações corroboram aqueles disponíveis na literatura para outros sistemas, como o de *Tenebrio militior* (Coleoptera: Tenebrionidae) parasitado por *Scleroderma guani* (Hymenoptera: Bethyilidae), o qual apresentou superexpressão de alguns transcritos envolvidos na inibição da cascata de fenoloxidasas e posterior melanização no processo de resposta imunológica (ZHU et al., 2013). *Manduca sexta*, após inoculação de bactérias, e *Plutella xylostella* parasitadas por *Diadegma*

semiclausum, também apresentaram inibição dessas vias de regulação da resposta imunológica (ZOU; WANG; JIANG, 2005; ETEBARI et al., 2011).

5.3 Identificação de genes virais

O parasitismo induz diversas reações no sistema imunológico do hospedeiro que culminam em processos inflamatórios, secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e ativação de cascatas enzimáticas a fim de eliminar o invasor e o perigo iminente de morte por sua presença (GUEGUEN et al., 2013). Porém, o parasitoide, ao longo de sua evolução, desenvolveu estratégias para combater e inibir estas respostas imunológicas, injetando no hospedeiro fatores maternos, como veneno e fluídos do cálice e vírus simbiossiontes (DOUCET; CUSSON, 1996; ZHANG; DAHLMAN; JÄRLFORS, 1996; KROEMER; WEBB, 2004; ASGARI; RIVERS, 2011). Os vírus de poli-DNA infectam inúmeros tecidos do hospedeiro, onde expressarão seus genes e regularão o funcionamento do hospedeiro, principalmente nas fases iniciais de colonização do hospedeiro, exercendo papel fundamental no sucesso do parasitismo (STRAND; PECH, 1995; WEBB; STRAND, 2005).

A exploração do transcrito de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* para a identificação de genes virais expressos no início do parasitismo permitiu identificar quatro das seis famílias gênicas comuns a ichnovírus, todas importantes na colonização do hospedeiro: “*anquirina viral*”, “*elemento repetido*”, “*motivo-cisteína*” e família das “*proteínas-N*”.

Durante o desenvolvimento dos insetos, na ausência de patógenos, a via metabólica Toll é mantida inativada por fatores de eucariotos e respostas imunológicas não ocorrem (AL-KHODOR et al., 2010). A partir do reconhecimento de organismos invasores, proteínas com domínio rico em leucina, por exemplo, se ligam a estes fatores de eucariotos, permitindo a ativação do sistema imunológico e estimulando processos como inflamações, maturação das células de defesa e transporte de profenoloxidasas (HUXFORD, 1998).

O modo de ação das *anquirinas virais*, comuns a Ichnovirus (IV) e Bracovirus (BV), está relacionado ao mimetismo dos fatores de eucariotos, ligação às proteínas com domínio rico em leucina, e consequente manutenção da via Toll e do sistema imunológico inativados, permitindo a colonização do hospedeiro pelo parasitoide (GUEGUEN et al., 2013). Alguns trabalhos mostram ainda que as *anquirinas virais* também atuam na inibição de respostas humorais, alterando a expressão gênica de peptídeos antimicrobianos (AL-KHODOR et al., 2010). A expressão destes genes no sistema *Cotesia plutellae* – *Plutella xylostella* parece

ocorrer durante estádios tardios do desenvolvimento do parasitoide, comportando-se como transcritos de persistência no hospedeiro e configurando-se como importantes no sucesso do parasitismo (BAE; KIM, 2007).

Outra família gênica identificada durante as análises de RNA-Seq foi a “*motivo-cisteína*”, caracterizada por proteínas ricas em cisteína que retardam o crescimento do hospedeiro e inibem a resposta imunológica celular (LI; WEBB, 1994). Em lagartas de *H. virescens* parasitadas por *C. sonorensis*, foi observada a presença destas proteínas no interior de granulócitos e ligadas externamente a plasmatócitos, de 4 h após o parasitismo até o final do desenvolvimento do parasitoide (CUI; SOLDEVILA; WEBB, 1997). No sistema *Cotesia congregata* – *Manduca sexta*, a presença dessa proteína declina após o primeiro dia após o parasitismo até desaparecer, indicando que outros transcritos são necessários para a continuação da regulação do hospedeiro (LAVINE; BECKAGE, 1996). O declínio mencionado também foi verificado no sistema *Cotesia plutellae* – *Plutella xylostella*, sistema em que se demonstrou a função dessa proteína na inibição da movimentação dos hemócitos e no atraso do desenvolvimento do hospedeiro, utilizando-se de técnicas de RNA de interferência (RNAi) e de expressão transiente (BARANDOC; KIM, 2008). No caso de *C. flavicincta*, os transcritos identificados desta família apresentaram alta expressão 24 h após o parasitismo. Ocorreu um declínio após 72 h; porém, a expressão ainda manteve-se alta e estudos posteriores são necessários para se entender o comportamento desta família gênica ao longo de todo o desenvolvimento do parasitoide.

Transcritos relacionados ao gene do “*elemento repetido*” também foram identificados no transcrito de lagartas parasitadas de *S. frugiperda*. Os genes do “*elemento repetido*” codificam por proteína intracelular que aparece de forma limitada em diversos tecidos de *S. frugiperda* parasitadas por *H. didymator*, principalmente no tecido adiposo e no epitélio do hospedeiro, enquanto que ocorre de forma abundante em lagartas de *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) parasitadas por *Tranosema rostrale* (GALIBERT et al., 2006; RASOOLIZADEH et al., 2009). Neste caso, a expressão dos genes desta família ocorre principalmente no início da colonização do hospedeiro, entre as 2 e 6 h após o parasitismo. Já em *S. frugiperda*, a expressão destes transcritos virais foi maior após 24 h do parasitismo, sendo pouco expressa após 6 h.

Por fim, sobre a família gênica “*das proteínas-N*”, que apresentou expressão de um transcrito no hospedeiro *S. frugiperda* durante as 72 h de parasitismo observadas, pouco se sabe sobre seu padrão de expressão e função durante o parasitismo, mesmo sendo uma família bastante comum a Ichnovírus (WEBB et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

O parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* altera a concentração de proteínas na hemolinfa de lagartas parasitadas;

As alterações quantitativas das proteínas da hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* não estão relacionadas a alterações qualitativas do perfil proteico;

Campoletis flavicincta interrompe o desenvolvimento do hospedeiro e induz a produção precoce de proteínas tardias do desenvolvimento imaturo, como as proteínas de 180 kDa e 75 kDa;

Além de estimular a síntese precoce de proteínas, *C. flavicincta* também interfere no processo de reabsorção de proteínas pelo tecido adiposo, levando ao acúmulo das mesmas na hemolinfa;

O parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* regula a expressão de transcritos relacionados à resposta imunológica, ao metabolismo e sistema endócrino do, hospedeiro, desde os momentos iniciais do parasitismo;

Transcritos do Ichnovirus associado a *Campoletis flavicincta* e pertencentes às *anquirinas virais*, *elemento repetido*, *motivo-cisteína* e *família-N de proteínas* são utilizados desde o início do parasitismo no processo de regulação do hospedeiro *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

AL-KHODOR, S.; PRICE, C. T.; KALIA, A.; ABU KWAIK, Y. Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 18, n. 3, p. 132-139, 2010.

ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 55, p. 207, 2010.

ASGARI, S.; RIVERS, D. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 56, p. 313–335, 2011.

ASHFAQ, M.; SONODA, S.; TSUMUKI, H. Expression of two methionine-rich storage protein gene of *Plutella xylostella* (L.) in response to development, juvenile hormone-analog and pyrethroid. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, New York, v. 148, p. 84-92, 2007.

BAE, S.; KIM, Y. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and integrative physiology**, New York, v. 138, n. 1, p. 39–44, 2004.

_____. Ikb genes encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress an antiviral response and enhance baculovirus pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 102, p. 79-87, 2007.

BALDWIN, I.T.; PRESTON, C.A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, Heildelberg, v. 208, p. 137-145, 1999.

BARANDOC, K.; KIM, Y. A technique of segment expression. And RNA interference (Seri) reveals a specific physiological function of a cysteine-rich protein gene encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 610-615, 2008.

BARAT-HOUARI, M.; HILLIOU, F.; JOUSSET, F-X; SOFER, S.; DELEURY, E.; ROCHER, J.; RAVALLEC, M.; GALIBERT, L.; DELOBEL, P.; FEYEREISEN, R.; FOURNIER, P.; VOLKOFF, A. N. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnavirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 1-20, 2006.

BARRATT, B.I.P.; HOWARTH, F.G.; WITHERS, T.M.; KEAN, J.M.; RIDLEY, G.S. Progress in risk assessment for classical biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 52, n. 3, p. 245–254, 2010.

BECKAGE, N.E. Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 30, p. 371–413, 1985.

_____. Wasp parasitoid disruption of host development: Implication for new Biologically based strategies for Insect Control. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 49, p. 299–330, 2004.

- BECKAGE, N.E.; GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 299–330, 2004.
- BECKAGE, N.E.; KANOST, M.R. Effects of parasitismo by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 643-653, 1993.
- BELLOWS, T. S.; FISHER, T. W.; CALTAGIRONE, L. E.; DAHLSTEN, D. L.; HUFFAKER, C.; GORDH, G. **Handbook of biological control: principles and applications of biological control**. New York: Academic Press, 1999. 1046 p.
- BERTI FILHO, E.; CIOCIOLA, A.I. Parasitóides ou predadores? Vantagens e desvantagens. In: Parra, J. R. P.(ed) ; Botelho, P. S .M. ; Corrêa-Ferreira, B. S.; Bento, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, cap. 3, p. 29-41, 2002.
- BLISSARD, G.W.; FLEMING, J.G.W.; VINSON, S.B.; SUMMERS, M.D. *Campoplex sonorensis* virus: Expression in *Heliothis virescens* and identification of expressed sequences. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, p. 351-359, 1986.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRODEUR, J.; BOIVIN, G. Functional ecology of immature parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 27–49, 2004.
- CLAVIJO, G.; DORÉMUS, T.; RAVALLEC, M.; MANNUCCI, M-A.; JOUAN, V.; VOLKOFF, A-N.; DARBOUX, I. Multigenic Families in Ichnovirus : A Tissue and Host Specificity Study through Expression Analysis of Vankyrins from *Hyposoter didymator* Ichnovirus. **PloSone**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. e27522, 2011.
- COLINET, D.; MATHÉ-HUBERT, H.; ALLEMAND, R.; GATTI, J.L.; POIRIÉ, M. Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps : From a phylogenetic to a population approach. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 205–212, 2013.
- CÔNSOLI, F.L.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A.; VINSON, S.B. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*-*Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, New York, v. 142, p.181-191, 2005.
- CORLEY, L.; STRAND, M.R. Evasion of encapsulation by the polyembryonic parasitoid *Copidosoma floridanum* is mediated by a polar body-derived extraembryonic membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 83, p. 86–89, 2003.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L.; GONÇALVES, E. P.; LIMA, D. A.; DINIZ, E. E. Efeito da idade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no desempenho

- do parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e consumo foliar por lagartas parasitadas e não parasitadas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 229-234, 1997.
- CUI, L.; SOLDEVILA, A.; WEBB, B.A. Expression and hemocyte-targeting of a *Campoletis sonorensis* polydnavirus cysteine-rich gene in *Heliothis virescens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 36, p. 251-271, 1997.
- DANI, M.P.; RICHARDS, E.H.; EDWARDS, J.P. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 86, p. 19-25, 2004.
- DEQUECH, S.T.B.; FIUZA, L.M.; DA SILVA, R.F.P. Ocorrência de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lep., Noctuidae) em lavouras de milho em Cachoeirinha, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1235-1237, 2004.
- DONG, K.; ZHANG, D.Q.; DAHLMAN, D.L. Down-regulation of juvenile hormone esterase and arylphorin production in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Microplitis croceipes*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, p. 237-248, 1996.
- DORÉMUS, T.; URBACH, S.; JOUAN, V.; COUSSERANS, F.; RAVALLEC, M.; DEMETTRE, E.; WAJNBERG, E.; POULAIN, J.; AZÉMA-DOSSAT, C.; DARBOUX, I.; ESCOUBAS, J.M.; COLINET, D.; GATTI, J.L. POIRIÉ, M. VOLKOFF, A.-N. Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, p. 292-307, 2013.
- DOUCET, D.; CUSSON, M. Alteration of developmental rate and growth of *Choristoneura fumiferana* parasitized by *Tranosema rostrale*: role of the calyx fluid. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 81, p. 21-30, 1996.
- DOVER, B.A.; TANAKA, T.; VINSON, S.B. Stadium-specific degeneration of host prothoracic glands by *Campoletis sonorensis* calyx fluid and its association with host ecdysteroids titers. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, p. 947-455, 1995.
- EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. 314p.
- ER, A.; UÇKAN, F.; RIVERS, D.B.; ERGIN, E.; SAK, O. Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocyte numbers, morphology and viability of its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, Md., v. 103, n. 2, p. 273-282, 2010.
- ETEBARI, K.; PALFREYMAN, R.W.; SCHLIPALIUS, D.; NIELSEN, L.K.; GLATZ, R. V.; ASGARI, S. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Diadegma semiclausum*. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 446-463, 2011.

FANG, Q.; WANG, F.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.; CHEN, X.X.; HU, C.; YE, G.Y. Venom of parasitoid, *Pteromalus puparum*, suppresses host, *Pieris rapae*, immune promotion by decreasing host C-type lectin gene expression. **PloSone**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e26888, 2011.

GALIBERT, L.; DEVAUCHELLE, G.; COUSSERANS, F.; ROCHER, J.; CÉRUTTI, P.; BARAT-HOUARI, M.; FOURNIER, P.; VOLKOFF, A-N. Members of the *Hyposoter didymator* ichnovirus repeat element gene family are differentially expressed in *Spodoptera frugiperda*, **Virology Journal**, Washington, v. 3, p. 48-59, 2006.

GODFRAY, H.J.C. **Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology**. New Jersey: Princeton University Press, 1994. 473 p.

GOUINGUENÉ, S.; ALBORN, H.; TURLING, T.C. J. Induction of volatile emissions in maize by different larval instar of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 145-162, 2003.

GUEGUEN, G.; KALAMARZ, M.E.; RAMROOP, J.; URIBE, J.; GOVIND, S. Polydnal viral ankyrin proteins aid parasitic wasp survival by coordinate and selective inhibition of hematopoietic and immune NF-kappa B signaling in insect hosts, **PlosOne**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. e1003580-e1003594, 2013.

HARVEY, J.A. Factors affecting the evolution of development strategies in parasitoid wasps: the importance of functional constraints and incorporating complexity. **Entomology Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 117, n. 1, p. 1-13, 2005.

HAUNERLAND, N.H. Insect Storage Proteins: Genes Families and Receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 26, p. 755-765, 1996.

HAWKINS, B.A. **Pattern and process in host-parasitoid interactions**. Cambridge: University Press, 2005. 202 p.

HEAVNER, M.E.; GUEGUEN, G.; RAJWANI, R.; PAGAN, P.E.; SMALL, C.; GOVIND, S. Partial venom gland transcriptome of a *Drosophila* parasitoid wasp, *Leptopilina heterotoma*, reveals novel and shared bioactive profiles with stinging Hymenoptera. **Gene**, Amsterdam, v. 526, n. 2, p. 195-204, 2013.

HOCHULI, A.; LANZREIN, B. Characterization of a 212kD protein, released into the host by the larva of the endoparasitoid *Chelonus inanitus* (Hymenoptera, Braconidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1313-1319, 2001.

HU, J.S.; VINSON, S.B. Interaction between the larval endoparasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America** 93, Lanhan, p. 220-224.

HUANG, F.; CAO, T.-T.; SHI, M.; CHEN, Y.-F.; CHEN, X.-X. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Cotesia vestalis* or *Diadegma semiclausum*. **Insect Science**, Zhejiang, v. 15, p. 237-243, 2008.

- HUANG, F.; SHI, M.; YANG, Y.; LI, J.; CHEN, X. Changes in hemocytes of *Plutella xylostella* after parasitism by *Diadegma semiclausum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 70, n. 3, p. 177–187, 2009.
- HUXFORD, T.; HUANG, D. B.; MALEK, S.; GHOSH, G. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 759–770, 1998.
- IBRAHIM, M.A.; LEE, K.; LEE, H.; KIM, Y. Storage proteins of Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Purification and expression profile. **Journal Asia-Pacific Entomology**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 139–143, 2006.
- KAESLIN, M.; PFISTER-WILHELM, R.; MOLINA, D.L.; LANZREIN, B. Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implications. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, n. 9, p. 975–988, 2005.
- KEELEY, L.L. Biochemistry and physiology of the insect fat body. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. New York: Pergamon, 1985. v. 3, chap. 6, p. 211–248.
- KHAJURIA, C.; BUSCHMAN, L.L.; CHEN, M.S.; MUTHUKRISHNAN, S., ZHU, K.Y. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 621–629, 2010.
- KROEMER, J.A; WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 49, p. 431–456, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- LAVINE, M. D.; BECKAGE, N.E. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 41–51, 1996.
- LAW, J.H.; WELLS, M.A. Insects as biochemical models. **Journal of Biological Chemistry**. Bethesda, Md., v. 264, p. 16335–16338, 1989.
- LAWRENCE, P.O. Host-parasite hormonal interactions: An overview. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 295–298, 1986.
- LI, I.; WEBB, B.A. Apparent functional role for a cysteine-rich polydnavirus protein in suppresion of the insect cellular immune response. **Journal of Virology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 7482–7489, 1994.
- MACKAUER, M.; SEQUEIRA, R. Patterns of development in insect parasites. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and Pathogens of Insects**. New York: Academic Press, 1993. v. 1, chap. 1, p. 1–23.

- MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 67, n. 4, p. 569–579, 2010.
- MARTINS, J.R.; BITONDI, M.M.G. Nuclear immunolocalization of hexamerins in the fat body of metamorphosing honey bees. **Insects**, New York, v. 3, p. 1039-1055, 2012.
- MARZIANO, N.K.; HASEGAWA, D.K.; PHELAN, P.; TURNBULL, M.W. Functional interactions between polydnavirus and host cellular innexins. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, n. 19, p. 10222-10229, 2011.
- MASASHI, A.; TANAKA, T. *Cotesia kariyai* teratocytes: growth and development. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 31-41, 2001.
- MIRTH, C K.; RIDDIFORD, L.M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **BioEssays** : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, Cambridge, v. 29, n. 4, p. 344-355, Apr. 2007.
- MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A; McCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, New York, v. 5, p. 621–628, 2008.
- NAKAMATSU, Y.; GYOTOKU, Y.; TANAKA, T. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separate* larvae by venom and CK polydnavirus. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 573-584, 2001.
- OSMAN, S.E. The effect of the accessory genital gland secretions in female *Pimpla turionella* L. (Hym., Ichneumonidae) on the hemocytes and the encapsulation reaction of host pupae. **Parasitology Research**, Berlin, v. 57, p. 89-100, 1978.
- PANNEBAKKER, B.A; TRIVEDI, U.; BLAXTER, M.A.; WATT, R.; SHUKER, D.M. The Transcriptomic Basis of Oviposition Behaviour in the Parasitoid Wasp *Nasonia vitripennis*. **PlosOne**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e68608, 2013.
- PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZU, A.R.; PARRA, J.R P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991, cap. 2, p. 9-65.
- PENNACCHIO, F.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 51, p. 233–258, 2006.
- POIRIÉ, M.; CARTON, Y.; DUBUFFET, A. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 2, p. 311-320, 2009.
- PROVOST, B.; JOUAN, V.; HILLIOU, F.; DELOBEL, P.; BERNARDO, P.; RAVALLEC, M.; COUSSERANS, F.; WAJNBERG, E.; DARBOUX, I.; FOURNIER, P.; STRAND, M. R.; VOLKOFF, A.-N. Lepidopteran transcriptome analysis following infection by phylogenetically unrelated polydnaviruses highlights differential and common responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 582-591, 2011.

QUICKE, D.L.J. **Parasitic wasps**. London: Chapman & Hall, 1997. 470 p.

RASOOLIZADEH, A.; BÉLIVEAU, C.; STEWART, D.; CLOUTIER, C.; CUSSON, M. *Tranosema rostrale* ichnovirus repeat element gene display distinct transcriptional patterns in caterpillar and wasp hosts, **Journal of General Virology**, London, v. 90, p. 1505-1514, 2009.

RAVIKUMAR, G.; VARDHANA, K. V.; BASAVARAJA, H. K. Characterization of lipophorin receptor (LpR) mediating the binding of high density lipophorin (HDLp) in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Science**, Ludhiana, v. 11, p. 150-161, 2011.

REINEKE, A.; LÖBMANN, S. Gene expression changes in *Ephestia kuehniella* caterpillars after parasitization by the endoparasitic wasp *Venturia canescens* analyzed through cDNA-AFLPs. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 923-932, 2005.
relationships. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 31-56, 1995.

RICHARD, E.H.; DANI, M.P.; BRADISH, H. Immunosuppressive properties of a protein (rVPr1) from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*: Mechanism of action and potential use for improving biological control strategies. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, p. 213-222, 2013.

ROSSI, G.D.; LABATE, M.T.; LABATE, C.A.; VINSON, S. B.; CÔNSOLI, F. L. Characterization of a *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae)-Derived Chitinase and its Potential for Pest Control. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 104, p. 96-102, 2012.

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

SAMBROOK, J.J.; RUSSELL, D.D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 2344 p.

SCHAFELLNER, C.; MARKTL, R.C.; SCHOPF, A. Inhibition of juvenile hormone esterase activity in *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) larvae parasitized by *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera, Braconidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 53, n. 8, p. 858-868, 2007.

SCHMIDT, O. At the core of parasitoid-host interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 61, n. 3, p. 107-109, 2006.

SCHMIDT, O.; THEOPOLD, V.; STRAND, M.R. Innate immunity and its evasion and suppression by Hymenoptera endoparasitoid. **BioEssays**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 344-351, 2001.

SHELBY, K.S.; WEBB, B.A. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 263-270, 1997.

SHELBY, K.S.; POPHAM, H. JR. Analysis of ESTs generated from immune-stimulated hemocytes of larval *Heliothis virescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 2, p. 86-95, 2009.

SHIAO, S.H.; HANSEN, I.A.; ZHU, J.; SIEGLAFF, D.H.; RAIKHEL, A.S. Juvenile hormone connects larval nutrition with target of rapamycin signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, p. 231-239, 2008.

SON, Y.; HWANG, J.; KIM, Y. Functional study of the gene encoding apolipophorin III in development and immune responses in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Seoul, v. 15, n. 1, p. 106-112, 2012.

STRAND, M.R. Invited review: The insect cellular immune response. **Insect Science**, Elmsford, v. 15, n.1, p. 1-14, 2008.

STRAND, M.R.; PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 31-56, 1995.

TELFER, W.; KUNKEL, J. The function and evolution of insect storage hexamers. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 205-228, 1991.

THOMAZONI, D.. **Efeito da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cyhalothrin na interação com o milho geneticamente modificado (MON810) e na resposta imunológica ao parasitismo por *Campoletis af.*** 2012. 123 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

THOMPSON, S.N. Immediate effects of parasitization by the insect parasite, *Hyposoter exiguae* on the nutritional physiology of its host, *Trichoplusia ni*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 68, n. 5, p. 936-941, 1982.

VANNINI, L.; CIOLFI, S.; SPINSANTI, G.; PANTI, C.; FRATI, F.; DALLAI, R. The putative-farnesoic acid o-methyltransferase (FAMET) gene of *Ceratitis capitata*: characterization and pre-imaginal life expression. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 73, n. 2, p. 106-117, 2010.

VINCENT, B.; KAESLIN, M.; ROTH, T.; HELLER, M.; POULAIN, J.; COUSSERANS, F.; SCHALLER, J.; POIRIÉ, M.; LANZREIN, B.; DREZEN, J-M.; MOREAU, S.J. M. The venom composition of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* resolved by combined expressed sequence tags analysis and proteomic approach. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 693-707, 2010.

VINSON, S.B. Physiological interactions between the host genus *Heliothis* and its guild of parasitoids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 1/2, p. 63-81, 1990.

VINSON, S.B.; IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 143-165, 1980.

VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F.L. The parasitoid-host interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J. P.; WEAVER, R. J. Ed. **Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens**. Oxford: bios scientific, 2001. p. 187-205.

VOLKOFF, A.-N.; ROCHER, J.; CÉRUTTI, P.; OHRESSER, M. C.; D'AUBENTON-CARAFA, Y.; DEVAUCHELLE, G.; DUONOR-CÉRUTTI, M. Persistent expression of a newly characterized *Hyposoter didymator* polydnavirus gene in long-term infected lepidopteran cell lines. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 4, p. 963-969, 2001.

WANG, L.; FANG, Q.; QIAN, C.; WANG, F.; YU, X.Q.; YE, G. Inhibition of host cell encapsulation through inhibiting immune gene expression by the parasitic wasp venom calreticulin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 936-946, 2013.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2010.

WEBB, B.A.; LUCKHART, S. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoplex sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 26, n. 2-3, p. 147-163, 1994.

WEBB, B.A.; STRAND, M.R.; DICKEY, S.E.; BECK, M.H.; HILGARTH, R.S.; BARNEY, W.E.; WITHERELL, R.A. Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. **Virology**, New York, v. 347, n. 1, p. 160-174, 2006.

WHEELER, D. E.; BUCK, N. A. Storage proteins in ants during development and colony founding. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 41, p. 885-894, 1995.

WU, S.F.; SUN, F.D.; QI, Y.X.; YAO, Y.; FANG, Q.; HUANG, J.; STANLEY, D.; YE, G. Y. Parasitization by *Cotesia chilonis* Influences Gene Expression in Fat body and Hemocytes of *Chilo suppressalis*. **PloSone**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74309, 2013.

YU, R.X.; CHEN, Y.F.; CHEN, X.X.; HUANG, F.; LOU, Y. G.; LIU, S.S. Effects of venom / calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 22-29, 2007.

ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYNSKA, M. Apolipophorins and insect immune response. **Invertebrate Survival Journal**, Modena, v. 10, p. 58-68, 2013.

ZHANG, D.; DAHLMAN, D.L.; JÄRLFORS, U.E. Effects of *Microplitis croceipes* Teratocytes on Host Haemolymph Protein Content and Fat Body Proliferation. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 577-585, 1997.

ZHANG, G.; SCHMIDT, O.; ASGARI, S. A Novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes *. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md., v. 279, n. 40, p. 41580-41585, 2004.

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

ZHOU, J.; SHU, Y.; ZHANG, G.; ZHOU, Q. Lead exposure improves the tolerance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to cypermethrin. **Chemosphere**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 507-513, 2012.

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

ZHU, J.-Y.; YE, G.Y.; FANG, Q.; HU, C.; AKHTAR, Z. cDNA of an arylphorin-type storage protein from *Pieris rapae* with parasitism inducible expression by the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum*. **Insect Science**, Elmsford, v. 16, n. 3, p. 227–236, 2009.

ZHU, J-Y.; YANG, P.; ZHANG, Z.; WU, G-X.; YANG, B. Transcriptomic immune response of *Tenebrio miltor* pupae to parasitization by *Scleroderma guani*. **PlosOne**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e54411, 2013.

ZOU, Z.; WANG, Y., JIANG, H. *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-1 (PAP-1) gene: Organization, expression, and regulation by immune and hormonal signals. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 627-636, 2005.