

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

**Regulação do desenvolvimento e resposta imune de
lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera:
Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera:
Braconidae)**

Carolina Schultz Lopes

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

**Piracicaba
2008**

Carolina Schultz Lopes
Engenheiro Agrônomo

**Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de
Diatraea saccharalis (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia
flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**

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

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

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Lopes, Carolina Schultz

Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) / Carolina Schultz Lopes. -- Piracicaba, 2008.
72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Brocas (insetos nocivos) 2. Imunobiologia 3. Parasitismo 4. Vespas I. Título

CDD 632.78
C755r

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

Dedico.

Aos meus pais, Maz Antonio e Dora Alice e a
minha irmã Camila, com todo amor e carinho

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pois Deus pode fazer tudo, mas reservou-nos algo para realizar, por nós mesmos, de modo a sermos dignos de Seu nome;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo e ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do curso de graduação e mestrado;

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Luis Cònsoli, pelo exemplo de superação e dedicação em todos os trabalhos realizados;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;

À equipe do Laboratório de Biologia de Insetos, em especial, à Neide Graciano Zério, pelos seus ensinamentos e paciência e Heraldo Negri, por toda ajuda durante o período do experimento;

À equipe do laboratório de Biologia Molecular de Plantas e ao Prof. Dr. Márcio de Castro, pela disponibilização do equipamento e auxílio no experimento de avaliação de óxido nítrico;

À equipe do Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia e ao Prof. Dr. Valter Arthur, pela gentil colaboração na irradiação de *C. flavipes*;

Ao meu namorado, Danilo Barboza de Oliveira, pelo amor, compreensão e por me mostrar que para todas as dificuldades que surgirem existirá sempre uma oportunidade de aprendizado e que a superação dos problemas só depende de nossa própria força;

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Nutricional e Molecular de Insetos: Larissa Spoladore, Aline S. Guidolin, Gabriela e Izabela Salvador, Cláudia F. Marinho, Priscila Fortes, Daniela Pinheiro e Fábio C. Dossi, pelo companheirismo e incentivo;

Aos amigos do curso de pós-graduação: Tiago C. Lima, Tibério Graco A. da Silva, Rosylaine A. Pereira, Maria Áurea P. A. Silveira, André Signoretti, Renata A. Simões, Ana Paula Korndorfer, Eliane Grisoto, Katherine G. P. Córdoba e Fernando Silva, que tornaram esses anos tão divertidos;

Às minhas queridas amigas, Ana Cláudia Ribeiro Rossi e Daniela Alves de Oliveira pelos conselhos e bons momentos compartilhados em nosso apartamento;

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização do meu trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Trabalho, ação, aprendizado, melhoria!
Não te ponhas à espera deles sob a imaginária incapacidade de procurá-
los, à vista de imperfeições e defeitos que te marcaram ontem.
Realização pede apoio da fé.
Mãos à obra.
Tudo o que serve para corrigir, elevar, educar e construir nasce
primeiramente no esforço da vontade unida à decisão”.

Emmanuel

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Estratégias de desenvolvimento.....	14
2.2 Interação hospedeiro-parasitóide.....	15
2.3 O sistema imune de insetos	16
2.4 Regulação hospedeira	20
2.5 Ação do polidnavírus (PDV), veneno e teratócitos	22
2.6 Interações hormonais hospedeiro-parasitóide.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Criação de <i>D. saccharalis</i> e <i>C. flavipes</i>	30
3.2 Efeito das secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas de <i>C. flavipes</i> no crescimento e desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i>	31
3.2.1 Coleta de veneno e fluidos do cálice.....	31
3.2.2 Efeito do veneno e fluidos do cálice no desenvolvimento do hospedeiro.....	31
3.3 Efeito do parasitismo por <i>C. flavipes</i> na resposta imune de <i>D. saccharalis</i>	33
3.3.1 Resposta celular - Contagem total de hemócitos.....	33
3.3.2 Resposta celular – Encapsulação	33
3.3.3 Resposta humoral - Atividade das fenoloxidasas (PO)	34
3.3.4 Resposta humoral - Dosagem de óxido nítrico.....	35
3.4 Análise dos dados	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Efeito das secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas de <i>C. flavipes</i> no crescimento e desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i>	37
4.2 Efeito do parasitismo por <i>C. flavipes</i> na resposta imune de <i>D. saccharalis</i>	43
4.2.1 Contagem total de hemócitos.....	43
4.2.2 Capacidade de encapsulação	44
4.2.3 Atividade das fenoloxidasas	46

5 DISCUSSÃO	49
5.1 Efeitos das secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas de <i>C. flavipes</i> no crescimento e desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i>	49
5.2 Resposta celular	51
5.3 Resposta humoral	54
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Cotesia flavipes (Cameron) (Hym.: Braconidae), como outros cenobiontes, é capaz de regular seu hospedeiro, criando um ambiente que sustenta e promove o desenvolvimento de suas larvas, comumente em detrimento do hospedeiro. Substâncias derivadas do trato reprodutivo das fêmeas (proteínas ovarianas, veneno e polidnavírus) são injetadas no hospedeiro, afetando a resposta imune e outros processos fisiológicos com o propósito de regular os níveis hormonais, nutrição e comportamento. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o papel dessas substâncias no crescimento e desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), e avaliar como o parasitismo afeta a resposta imune do hospedeiro. Todas as substâncias derivadas da fêmea foram obtidas após a dissecação do parasitóide, através da coleta do reservatório de veneno ou dos ovários (proteínas ovarianas e polidnavírus) em tampão resfriado. As secreções foram processadas adequadamente e injetadas logo após a coleta. O veneno e as proteínas ovarianas + polidnavírus (PDV) foram injetados juntos ou separadamente em lagartas entre 0-12h do 6^o instar. O efeito de cada um dos componentes isolados do parasitóide no desenvolvimento e crescimento do hospedeiro foi avaliado através de observações no ganho de peso, duração e viabilidade da fase larval e pupal. Os efeitos do parasitismo na resposta imune do hospedeiro foram avaliados tanto ao nível celular, através da contagem do número total de hemócitos e capacidade de encapsulação, como ao nível bioquímico, medindo-se a ativação da profenoloxidase e produção de óxido nítrico na hemolinfa das lagartas de *D. saccharalis* em diferentes estágios de desenvolvimento do parasitóide (0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo). As proteínas ovarianas do parasitóide e o PDV sozinho, ou co-injetado com o veneno, suspenderam o desenvolvimento larval do hospedeiro, enquanto que o veneno, sozinho, afetou o processo de metamorfose. A resposta imune do hospedeiro também foi afetada por *C. flavipes*, de maneira dependente do tempo. Lagartas parasitadas apresentaram declínio no número total de hemócitos a partir do 3^o dia e a capacidade de encapsulação foi afetada ao longo do desenvolvimento do parasitóide. A atividade da fenoloxidase do hospedeiro foi alterada apenas no final do desenvolvimento imaturo do parasitóide, enquanto que o óxido nítrico foi afetado nas 24 h iniciais após parasitismo.

Palavras-chave: Interações hospedeiro-parasitóide; Resposta imune; Regulação hospedeira; Polidnavírus

ABSTRACT***Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) larval development and immune response regulation by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**

Cotesia flavipes (Cameron) (Hym., Braconidae), as other koinobionts, is capable of regulating the host development to produce an suitable host environment to sustain and promote its own larval development at the host expenses. Female-derived substances from the reproductive tract (ovarian proteins, venom, polydnavirus) are injected into the host, affecting the host immune response and other physiological processes aiming to regulate the host hormone levels, nutrition and behavior. Our goal was to evaluate the role of these substances on *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) growth and development, and how the parasitism affects the host immune response. All female-derived substances were collected after parasitoid dissection by collecting the venom reservoir or the ovaries (ovarian proteins and polydnavirus). Dissections were carried out in ice-cold buffer, collected tissues were processed accordingly and the desired substances injected immediately after collection. Venom and ovarian proteins+polydnavirus (PDV) were injected jointly and separated in 0-12 h-old 6th instars of *D. saccharalis*. The effect of these substances on host development and growth was evaluated by measuring the host weight gain, larval and pupal survivorship and developmental time. The effects of the parasitism on the host immune response was evaluated either at the cellular level, by measuring the total hemocyte count and the encapsulation capacity, and at the biochemical level, by measuring the prophenoloxidase activity and nitric oxide levels at different stages of parasitoid development (0, 1, 3, 5, 7 and 9 days after parasitism). Parasitoid ovarian proteins and PDV alone or co-injected with the venom arrested the host larval development, while the venom by itself only affected the host metamorphosis process. The host immune response was also affected by *C. flavipes* at a time-dependent manner. The total hemocyte count dropped at day 3 of parasitism, while the host encapsulation capacity was reduced during parasitoid development. The host prophenoloxidase activity was also affected mainly towards the end of parasitoid larval development, while the nitric oxide at the first 24 h after parasitism.

Keywords: Host-parasitoid interactions; Host immune response; Host regulation; polydnavirus

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do curso da evolução, membros de diversas ordens de insetos adotaram estilo de vida parasítico, como alguns em Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera e Strepsiptera, representando um exemplo extremo de colonização bem sucedida dos nichos ecológicos existentes. No entanto, Hymenoptera, com aproximadamente 80% de suas espécies, é a ordem mais importante de insetos de hábito parasítico. Essa alta diversidade só é possível dado ao espectro de interações hospedeiras desenvolvidas por esses organismos (GODFRAY, 1994; QUICKE, 1997; WHITFIELD, 2003; PENNACCHIO; STRAND, 2006).

As larvas de parasitóides se desenvolvem utilizando como fonte nutricional o corpo de outros artrópodes, normalmente insetos, apresentando importante função nos ecossistemas agrícolas, onde influenciam ou regulam a densidade populacional de muitos de seus hospedeiros. Pesquisas com esse grupo de inimigos naturais foram estimuladas devido ao sucesso freqüente de seu uso em programas de controle biológico, clássico ou aplicado (GODFRAY, 1994). Parasitóides desenvolveram um surpreendente conjunto de mecanismos para manipular os aspectos fisiológicos e bioquímicos de seus hospedeiros, de forma a criar um ambiente favorável ao desenvolvimento de sua progênie, mas tipicamente em detrimento do desenvolvimento de seu hospedeiro (BECKAGE; GELMAN, 2004).

Entre os diferentes grupos de parasitóides, os cenobiontes são, sem dúvida, aqueles em que seu imaturo enfrenta as maiores restrições impostas pelo hospedeiro, já que o mesmo permanecerá vivo e continuará a crescer. Ao mesmo tempo que esse fato impõe limitações ao parasitóide, visto que ele deverá competir com os tecidos do hospedeiro pela utilização dos nutrientes disponíveis na hemolinfa, principalmente no início de seu desenvolvimento, ele também permite que esses parasitóides diversifiquem sua estratégia de desenvolvimento, já que há a expectativa de que o hospedeiro atinja estado nutricional mais adequado do que aquele no momento do parasitismo. Assim, diante dessa expectativa e da preferência de parasitismo, parasitóides podem ajustar seu desenvolvimento às mudanças fisiológicas do hospedeiro ou adequar o hospedeiro às necessidades do seu desenvolvimento,

manipulando a fisiologia do mesmo. Dessa maneira, parasitóides manipulam a atividade fisiológica e bioquímica do hospedeiro com o intuito de criar um ambiente favorável ao seu próprio desenvolvimento, utilizando diversos mecanismos de regulação (VINSON; IWANTSCH, 1980; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; PENNACCHIO; STRAND, 2006).

A possibilidade de regulação dos diferentes mecanismos que alteram o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, que envolve desde a inibição do sistema imunológico até o controle da expressão gênica do hospedeiro, é uma das características que tornam esses insetos agentes de controle tão eficientes (BURON; BECKAGE, 1997; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; PENNACCHIO; MALVA; VINSON, 2001; CÔNSOLI; VINSON, 2004).

Em muitos casos, os mecanismos moleculares responsáveis por alterações produzidas na fisiologia e metabolismo do hospedeiro são ainda desconhecidos, mas os avanços tecnológicos facilitarão a elucidação dos meios pelos quais parasitóides e seus produtos, incluindo polidnavírus (PDV), veneno e teratócitos, alteram o funcionamento do hospedeiro, incluindo a manipulação dos níveis de hormônios importantes, como os ecdisteróides e hormônio juvenil (EDWARDS; WEAVER, 2001). A identificação das moléculas indutoras e a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação hospedeira por parasitóides são tidas como fontes importantes de informações que levarão ao desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas seguras ao meio ambiente (STOLTZ, 1986; EDWARDS, WEAVER; MARRIS, 2001; MAITI et al., 2003; BECKAGE; GELMAN, 2004).

O parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) foi introduzido no Brasil em 1974 e se destaca em diversas regiões como eficiente agente de controle biológico de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) (BOTELHO; MACEDO, 2002). Apesar de sua introdução e utilização em larga escala no controle biológico dessa praga, pouco se sabe a respeito do processo de regulação hospedeira desse inimigo natural. Assim, dada à importância da cultura canavieira para o agronegócio nacional, a eficiência de *C. flavipes* no controle de *D. saccharalis* e o potencial de exploração da interação hospedeiro-parasitóide no desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas, esse trabalho buscou: *i)* avaliar o papel das

secreções introduzidas no hospedeiro pelo parasitóide, no momento do parasitismo, no crescimento e desenvolvimento do hospedeiro e *ii*) o efeito do parasitismo na resposta imune do hospedeiro, como etapa inicial na busca de moléculas reguladoras e na identificação de processos fisiológicos passíveis de exploração para o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o controle de pragas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estratégias de desenvolvimento

Os parasitóides atacam diversos hemimetábolos e holometábolos, sendo os ovos depositados sobre (ectoparasitóides) ou no interior (endoparasitóides) do hospedeiro. Desse modo, os parasitóides se restringem a completar seu desenvolvimento larval em um único hospedeiro, freqüentemente utilizando somente um estágio de desenvolvimento. Parasitóides de hemimetábolos são menos estágio-específicos do que aqueles que parasitam holometábolos, devido ao fato de ninfas e adultos de hemimetábolos explorarem o mesmo hábitat e alimento e apresentarem comportamento semelhante. Os estágios juvenis dos insetos são mais freqüentemente atacados, embora poucos grupos ataquem insetos adultos. Os parasitóides de holometábolos, como de Lepidoptera e Diptera, podem ser classificados de acordo com o estágio que atacam. Desse modo, um hospedeiro pode sofrer ataque por parasitóide de ovos, de larvas, de pupas ou de adultos. Alguns parasitóide ovipositam em um estágio do hospedeiro, mas sua progênie não o mata até que ele tenha entrado em outro estágio de desenvolvimento, por exemplo, os parasitóides ovo-larva e larva-pupa. Além disso, os parasitóides podem ser classificados como solitários ou gregários, dependendo do número de indivíduos a se desenvolver por hospedeiro, se um (solitário) ou vários (gregário) (GODFRAY, 1994; EDWARDS; WEAVER; MARRIS, 2001).

Brodeur e Boivin (2004) selecionaram a dicotomia idiobionte-cenobionte como a classificação mais funcional para o estilo de vida dos parasitóides. O parasitóide idiobionte cessa o desenvolvimento do hospedeiro imediatamente ou logo após o parasitismo, enquanto o cenobionte permite que seu hospedeiro continue a se alimentar e a crescer. Os idiobiontes incluem os ectoparasitóides que paralisam permanentemente ou matam seus hospedeiros larvais e, por definição, os parasitóides de estágios sésseis, como ovos e pupas. Os parasitóides cenobiontes se desenvolvem como endoparasitóides de larvas, que continuam se movimentando, e hospedeiros adultos, permanecendo restritos fisiologicamente ao hospedeiro no qual vivem.

As interações hospedeiro-parasitóide podem ocorrer de duas maneiras distintas, através da não alteração do desenvolvimento e comportamento do hospedeiro ou os

parasitóides podem causar mudanças (diretas ou indiretas) na síntese e metabolismo de hormônios relacionados ao crescimento e desenvolvimento (BECKAGE, 1985; LAWRENCE, 1986).

Vinson e Iwantsch (1980) e posteriormente Lawrence (1986) dividiram os parasitóides cenobiontes em “reguladores” e “conformadores”, baseando-se em suas interações com seus hospedeiros. Os “reguladores” manipulam o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, normalmente por via endócrina, retardando o desenvolvimento do mesmo após o crescimento máximo ter sido alcançado, enquanto que os “conformadores” apresentam maior plasticidade de desenvolvimento, adequando o seu desenvolvimento ao do hospedeiro.

Muitos parasitóides usam diferentes estratégias em seqüência, sendo o parasitismo assintomático nos instares iniciais do hospedeiro, enquanto os instares tardios mostram sintomas claros do parasitismo, como a interrupção da alimentação, da muda e do processo de metamorfose (LAWRENCE, 1986; HARVEY, 1996; EDWARDS; WEAVER; MARRIS, 2001; BECKAGE; GELMAN, 2004).

2.2 Interação hospedeiro-parasitóide

Após a aceitação hospedeira, os imaturos do parasitóide enfrentam uma série de desafios fisiológicos que podem diminuir suas chances de sobrevivência. Esses desafios incluem a garantia de suprimento adequado de alimento e oxigênio e a morte do hospedeiro, devido a doenças, predação ou parasitismo secundário. Contudo, as maiores ameaças potenciais estão presentes nas formas dos vários mecanismos de defesa imunológica e variações do sistema endócrino, que são cruciais para a regulação do hospedeiro (EDWARDS; WEAVER; MARRIS, 2001). Esses processos fisiológicos incluem as respostas imunológicas naturais ao ataque e as mudanças críticas nos níveis de diversos hormônios que determinam o início do desenvolvimento, e resultam no crescimento, muda e metamorfose. Os organismos invasores, ou se adaptam ao padrão determinado pelo hospedeiro para seu programa de desenvolvimento, ou assumem o controle da fisiologia do hospedeiro e a manipulam para suprir suas necessidades (VINSON, 1976; VINSON; IWANTSCH, 1980).

Embora alguns endoparasitóides evitem sua detecção pelo sistema imune, em vários casos há o reconhecimento dos imaturos depositados pelo sistema imunológico do hospedeiro, mas os mesmos escapam à reação imune pela supressão dessa resposta. Não só a imunidade é ativamente suprimida, mas os insetos parasitados são geralmente mantidos em um estado de desenvolvimento fisiológico adequado ao parasitóide. Para estabelecer um ambiente tolerante para sua sobrevivência, fatores do trato reprodutivo feminino e do imatura em desenvolvimento do parasitóide são empregados para inativar a resposta imune e alterar outros aspectos da fisiologia do hospedeiro. Esses fatores incluem proteínas sintetizadas pelas fêmeas e introduzidas no hospedeiro durante a oviposição (venenos e proteínas ovarianas), vírus simbiotes (polidnavírus-PDV) e células liberadas pelo ovo do parasitóide no final do desenvolvimento embrionário (teratócitos), assim como secreções liberadas pela própria larva do parasitóide em desenvolvimento (DAHLMAN; VINSON, 1993; STRAND; PECH, 1995; WEBB, 1998; BECKAGE; GELMAN, 2004).

2.3 O sistema imune de insetos

Para muitos animais multicelulares, as defesas contra infecções são mediadas por dois sistemas, *i*) a imunidade inata (natural) e *ii*) a adquirida. Enquanto vertebrados exibem ambas as respostas imunológicas, insetos e outros invertebrados possuem apenas a resposta inata (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997).

Em insetos, o sistema imune é comumente dividido em: componentes humorais e celulares. A resposta humoral resulta principalmente da ação de proteínas que estão sempre presentes ou são induzidas, sendo geralmente associadas à infecção de microrganismos. Entre as moléculas efetoras mais importantes do sistema humoral, estão os peptídeos antimicrobianos (como as cecropinas e atacinas, responsáveis pela inibição da biossíntese de proteínas na membrana externa de bactérias), produzidos por diversos tecidos, inclusive o tecido adiposo. Os insetos também liberam oxigênio citotóxico e reativo, assim como uma gama de outras moléculas de defesa, como lisozimas (enzimas relacionadas à despolimerização da parede celular). Já a resposta celular se refere à atividade dos hemócitos, células de defesa suspensas na hemolinfa.

A defesa produzida por estes processos é baseada na resposta celular, humoral ou na combinação de ambas (ARMSTRONG, 1996; GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997; NAPPI; OTTAVIANI, 2000; SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001; TZOU; GREGÓRIO; LEMAITRE, 2002). A hipótese mais aceita é a de que os pró-hemócitos seriam as células precursoras que se diferenciariam em um ou mais tipos celulares. Chapman (1998) reuniu os principais tipos de hemócitos envolvidos na resposta imune, descritos por Gupta (1979) e Rowley e Ratcliffe (1981), sendo: *i*) plasmatócitos - são células pleomórficas e as mais abundantes e são envolvidas na fagocitose e encapsulação de invasores, *ii*) granulócitos - células que apresentam grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, descarregando o conteúdo de suas vesículas na superfície do organismo invasor na etapa inicial da resposta imune. Ainda são encontrados os esferulócitos, células não-adesivas, responsáveis pelo transporte de componentes cuticulares, e os oenocitóides, que ocorrem principalmente em Lepidoptera. Os oenocitóides são células que contêm precursores citoplasmáticos de fenoloxidasas e, provavelmente, apresentam papel na melanização (ASHIDA; DOHKE, 1980; IWAMA; ASHIDA, 1986; SASS; KISS; LOCKE, 1994; JIANG et al., 1997; LAVINE; STRAND, 2002).

Os insetos possuem um complexo e eficiente sistema de defesa que envolve barreiras físicas como o tegumento e o tubo digestivo, que limitam a invasão da cavidade hemocélica. Quando essas barreiras são vencidas, desencadeia-se o processo de resposta celular e a indução da síntese de peptídeos antimicrobianos e proteínas de defesa. O patógeno ou parasito invasor é reconhecido como organismo estranho pela detecção de estímulos químicos e físicos que envolvem proteínas solúveis da hemolinfa, assim como proteínas receptoras localizadas na superfície dos hemócitos ou outras células. O evento de reconhecimento inicial pode conduzir a comunicação com outras células através de moléculas que atuam como sinalizadores no estímulo da resposta. O reconhecimento e os sinais secundários iniciam um processo de tradução de sinais que levará à ação celular, ou seja, a adesão seguida de fagocitose, nodulação ou encapsulação pelos hemócitos, liberação dos fatores sinalizadores ou a transcrição induzida de genes para a produção de proteínas antimicrobianas (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997).

Através de fagocitose, os hemócitos removem pequenas partículas como bactérias e agentes abióticos, a ação é realizada por uma célula individual, como os plasmatócitos ou granulócitos. A nodulação se refere à formação de um agregado multicelular que apanha um grande número de bactérias em um material extracelular, esses agregados se aderem aos tecidos, podendo ser encapsulados (LACKIE, 1988; YOKOO; GOETZ; TOJO, 1995).

A resposta imune mais complexa a grandes invasores, como parasitóides ou nematóides, é a encapsulação, processo que envolve o isolamento e aprisionamento do invasor dentro de uma cápsula de defesa. O início da formação da cápsula ocorre quando um pequeno número de hemócitos se anexa ao organismo estranho. Os dois tipos de hemócitos mais freqüentemente observados nas cápsulas, em Lepidoptera, são os granulócitos e plasmatócitos. Hemócitos adicionais tornam-se mutuamente adesivos, formando um revestimento ao redor do alvo. A agregação dos hemócitos finalmente cessa, resultando em uma cápsula lisa com camadas celulares sobrepostas. A encapsulação envolve três fases: *i*) o reconhecimento do invasor como “não-próprio”, pela mediação de células granulares (os granulócitos descarregam seu conteúdo na superfície do invasor), *ii*) a forte adesão entre os plasmatócitos e a suspensão no recrutamento de hemócitos e *iii*) a formação da cápsula propriamente dita (SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001).

A lagarta de *D. saccharalis* é um hospedeiro adequado para *C. flavipes*, ou seja, a progênie do parasitóide é bem sucedida na evasão das defesas do organismo hospedeiro, podendo ser encontradas aproximadamente 40 larvas do parasitóide no hemocele das lagartas (ALLEYNE; WIEDENMANN, 2001). A razão de encapsulação para essa combinação hospedeiro-parasitóide pode chegar a zero e a emergência do parasitóide alcança mais de 75% em lagartas no início do 4^o instar (ALLEYNE; WIEDENMANN; DIAZ, 2001).

Esferas plásticas sintéticas, tipo Sephadex (SIGMA-Chemical Company), são muito utilizadas em estudos da resposta imune para a avaliação do processo de encapsulação, por apresentarem características que permitem seu reconhecimento como agente estranho pelo sistema imune dos insetos, através dos receptores responsáveis nas células granulares, e superfície que permite a sua permanência em

circulação, sem que ocorra sua fixação aos tecidos do hospedeiro, circulando assim livremente na hemocele (LAVINE; STRAND, 2001; HU; ZHU; FU, 2003).

Uma vez a cápsula formada, o invasor exibe sinais como citólise ou melanização. Muitos fatores, incluindo asfixia, produção de quinonas tóxicas, via cascata de profenoloxidase, produção de oxigênio e nitrogênio reativos e peptídeos antibacterianos, são relacionados como agentes responsáveis pela morte do organismo (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997; CHAPMAN, 1998; NAPPI et al., 2000).

Injúrias mecânicas ou a presença de agentes estranhos, como parasitóides e microrganismos, resultam em deposição de melanina ao redor do tecido danificado ou do objeto introduzido. A melanina oferece proteção física e previne ou retarda o crescimento do invasor. Durante sua formação, é produzida uma substância intermediária, altamente tóxica, a quinona. A forma ativa da enzima fenoloxidase (PO) é responsável por essa atividade, constituindo um dos mais importantes componentes do sistema de defesa. A fenoloxidase faz parte de uma cascata enzimática ativada pelos granulócitos através da liberação de fatores sinalizadores, acarretando a síntese de proteínas que aumentam a aderência dos plasmatócitos ao invasor e intensificam a liberação por outros granulócitos. Por meio da ativação através de proteólise por serina proteinases, a PO catalisa a oxigenação dos monofenóis e a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas nas etapas iniciais da via de formação da melanina (SÖDERHÄLL, 1982; CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Outra função das fenoloxidases é a de endurecer a cutícula através de reações de esclerotização, bloqueando assim a invasão por entomopatógenos. A profenoloxidase está presente na hemolinfa, plasma e/ou hemócitos, mas também ocorre na cutícula e nas células epiteliais do intestino médio (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997).

As espécies reativas de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) são produzidas, principalmente, pelas células fagocíticas e são moléculas que apresentam efeito citotóxico, capazes de destruir microrganismos. Elas são produzidas como resultado de interações ligante-receptor, sendo mediadas em parte pela NADPH-oxidase, no caso das ROI, ou pela óxido nítrico sintase (NOS), no caso das RNI. A NADPH-oxidase, presente na membrana do fagócito, reduz o oxigênio para formar o ânion superóxido (O_2^-), o que pode aumentar a concentração de radicais hidroxila (OH), ácido hipocloroso

(HClO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As RNI são derivadas do óxido nítrico (NO), e levam os microrganismos à morte por danificar componentes essenciais, como DNA, lipídios e proteínas (GABIG; BABIOR, 1981; FANG, 1997).

Estudos realizados por Nappi et al. (1995) e Nappi e Vass (1998) foram direcionados à identificação de moléculas citotóxicas produzidas por *Drosophila melanogaster*. Elevados níveis do ânion superóxido (O_2^-) e H_2O_2 foram encontrados em larvas imuno-reativas. A produção elevada desses reativos intermediários coincide com o recrutamento, agregação e adesão no sítio específico de um grande número de hemócitos que formam cápsulas melanizadas ao redor de ovos do parasitóide *Leptopilina boulardi*. Os hemócitos foram identificados como fonte do O_2^- e H_2O_2 ; porém, o papel proposto para esses intermediários na resposta imune está relacionado à formação das moléculas citotóxicas citadas acima. Dessa maneira, Nappi et al. (2000) investigaram se o óxido nítrico (NO) seria a molécula efetora na interação com O_2^- ou H_2O_2 para iniciar a atividade citotóxica, avaliando o papel do NO na resposta imune. Foi detectado aumento da produção de NO nos hospedeiros imuno-reativos, fornecendo evidências que os reativos intermediários fazem parte do arsenal citotóxico empregado na defesa contra invasores.

Na resposta imune de mamíferos, entre os radicais nitrogenados, o óxido nítrico é conhecido pela sua atividade antimicrobiana, matando microrganismos por nitrosilação, nitratação e oxidação de componentes microbianos essenciais (DNA, lipídeos e proteínas) (FANG, 1997).

2.4 Regulação hospedeira

Os parasitóides desenvolveram uma variedade de estratégias para explorar eficientemente o hospedeiro, permitindo a colonização do mesmo (inibição da resposta imune) e a manipulação da fisiologia do hospedeiro (adequação hospedeira) (DAVIES; VINSON, 1986).

A regulação hospedeira deve ser iniciada com a manipulação do sistema imune do hospedeiro, permitindo o estabelecimento dos parasitóides imaturos no interior do hospedeiro. As formas de regulação do sistema imune envolvem mecanismos passivos

e ativos. Os mecanismos passivos incluem o desenvolvimento em regiões que os protejam do processo de encapsulação, como nos ectoparasitóides, desenvolvimento em hospedeiros que ainda não apresentam sistema imune desenvolvido, como nos ovos, ou ainda possuir superfície que impeça o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, como ovos de *Cotesia rubecula*, cuja composição superficial os mantém indetectáveis pelo sistema imune do hospedeiro (DAVIES; VINSON, 1986; ASGARI; SCHMIDT, 1994; HAYAKAWA; YAZAKI, 1997).

Além dos meios passivos de proteção, o parasitóide pode introduzir vírus ou partículas semelhantes a vírus que suprimem o sistema imune do hospedeiro. Assim como as partículas virais, fluídos provenientes da glândula de veneno são injetados no hospedeiro durante a oviposição, também apresentando ação sobre o sistema imune (ASGARI et al., 2003).

Parasitóides de algumas famílias de Hymenoptera, principalmente Braconidae, Scelionidae e Platygasteridae, liberam células após sua eclosão no hospedeiro. Essas células são originadas da dissociação da membrana serosa que envolve o embrião do parasitóide e passam a ser chamadas por teratócitos. Teratócitos parecem desempenhar funções múltiplas, dependendo da associação hospedeiro-parasitóide, como a síntese de moléculas que regulam o desenvolvimento do hospedeiro, enzimas que auxiliam na exploração do hospedeiro, síntese e acúmulo de substâncias tróficas, além de sua função imunossupressora tardia (DAHLMAN, 1991).

Os efeitos dos fatores associados ao parasitismo também incluem a modificação na resposta hemocítica (contagem total e diferencial de hemócitos), assim como a alteração no comportamento e morfologia dessas células. Esses aspectos foram investigados em vários graus em endoparasitóides onde tanto a proteção do ovo, como da larva, sendo crucial para a sobrevivência do parasitóide (STETTLER et al., 1998).

Após ser garantida a invasão do hospedeiro, o parasitóide deve torná-lo adequado ao seu próprio desenvolvimento. Para que o hospedeiro responda às exigências nutricionais do parasitóide em desenvolvimento, vários aspectos do metabolismo, fisiologia e comportamento do hospedeiro são regulados. Essa regulação ocorre pela alteração na síntese e liberação de proteínas, atividade metabólica e/ou regulação dos níveis de hormônio juvenil e ecdisteróides, que são os dois principais

hormônios responsáveis pela regulação do crescimento, desenvolvimento, metamorfose e reprodução dos insetos (BECKAGE; GELMAN, 2004).

Nesse processo de regulação, parasitóides alteram a distribuição de nutrientes do hospedeiro, permitindo que os mesmos sejam utilizados para o seu consumo próprio, ao invés de serem utilizados no desenvolvimento de estruturas corporais e metabolismo básico do hospedeiro (VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001). Assim, parasitóides induzem mudanças na composição bioquímica da hemolinfa do hospedeiro visando adequar a qualidade nutricional do mesmo ao seu desenvolvimento larval. Essas alterações bioquímicas refletem a manipulação das vias metabólicas do hospedeiro, assim como a sua habilidade de induzir a síntese de proteínas específicas do parasitismo e, até mesmo, produzir proteínas que podem ser utilizadas como recurso nutricional para o seu próprio desenvolvimento larval (KADONO-OKUDA; WEYDA; OKUDA, 1998; WEAVER et al., 2001; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; BECKAGE; GELMAN, 2004; CÔNSOLI et al., 2005; SALVADOR; CÔNSOLI, 2008).

A regulação do hospedeiro é obtida pela utilização de um arsenal de moléculas e simbiontes que podem estar associadas às fêmeas parasitóides, como as secreções do ovário, venenos e vírus simbiontes, além dos produtos derivados do imaturo, como os teratócitos e as secreções oriundas da própria larva do parasitóide (BECKAGE; GELMAN, 2004).

2.5 Ação do polidnavírus (PDV), veneno e teratócitos

Parasitóides produzem secreções que apresentam diversos componentes biologicamente ativos que auxiliam no condicionamento do hospedeiro para benefício do desenvolvimento de sua progênie (ABT; RIVERS, 2007).

Os vírus simbiontes são partículas endógenas contendo um filamento duplo de DNA, sendo denominados polidnavírus devido ao seu genoma polidisperso. Ocorrem em parasitóides da superfamília Ichneumonoidea, principalmente em algumas subfamílias de Braconidae e Ichneumonidae, dividindo associação de mutualismo obrigatório, sem efeitos deletérios ao parasitóide. Esses vírus são produzidos nas células do cálice de fêmeas e liberados para o lúmen do cálice, seguindo juntamente

com o ovo do parasitóide para o interior do hospedeiro no momento do parasitismo. Uma vez no hospedeiro, infectam diversos tipos celulares e expressam um complemento de genes virais específicos. Os polidnavírus, sozinhos ou em conjunto com outros fatores, suprimem a resposta imune do hospedeiro e alteram seu desenvolvimento (BECKAGE, 1998; WEBB, 1998; TURNBULL; WEBB, 2002).

Como os PDVs, as proteínas do veneno começam a ser produzidas durante o estágio pupal. O veneno é produzido em um par de glândulas especializadas e armazenado em um reservatório em forma de bolsa. O tubo do reservatório é anexado à parte terminal do oviduto, onde o veneno e os fluidos do cálice são injetados separadamente no hospedeiro no momento da oviposição. Evidências sugerem que em muitos sistemas hospedeiro-parasitóide, veneno e PDVs atuam independentemente, mas há relatos da ação sinérgica de ambos na regulação hospedeira. Em outros casos, o veneno é essencial para que o PDV desempenhe suas atividades (NUSSBAUMER; STRADNER; SCHOPF, 2002; ASGARI, 2006).

O veneno pode atuar na regulação do desenvolvimento do hospedeiro através da interferência no sistema endócrino, da indução de efeitos citotóxicos às células de defesa ou da potencialização da ação de outras substâncias derivadas do sistema reprodutivo do parasitóide. Em muitas associações, os efeitos do veneno no sistema endócrino são frequentemente difíceis de serem dissociados daqueles causados por outros fatores maternos (PDV, teratócitos e proteínas ovarianas) ou da presença da progênie do parasitóide (WEAVER et al., 2001).

Asgari et al. (2003) descreveram o isolamento de uma proteína do veneno (Vn50) do parasitóide *Cotesia rubecula*, a qual interfere na cascata proteolítica que, sob circunstâncias normais, conduziria à ativação da profenoloxidase e formação de melanina. A inibição da melanização pela Vn50 ocorre possivelmente pela sua similaridade estrutural à enzima homóloga a serina proteinase (SPH), competindo com as SPHs pelos sítios de ligação das imunolectinas e profenoloxidase, evitando, assim, a ativação desse complexo.

Li et al. (2007) investigaram a função do veneno e proteínas ovarianas de *Macrocentrus cingulum*, um endoparasitóide poliembriônico, na imunossupressão de *Ostrinia furnacalis*, na ausência de seu PDV. O estudo mostrou que as proteínas

ovarianas podem auxiliar os ovos depositados a escapar da encapsulação tanto *in vivo* como *in vitro*. No entanto, esses dois fatores não suprimiram a dispersão e viabilidade dos hemócitos.

A ação do veneno também foi estudada em parasitóides com diferentes estratégias de desenvolvimento. Marris et al. (1999) investigaram o papel do veneno de *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae) na supressão da imunidade de pupas de *Lacanobia oleracea* L., e relataram aumento na susceptibilidade à infecção microbiana após a injeção do veneno. Além disso, ovos implantados em pupas tratadas com veneno não foram encapsulados, sendo ainda observadas alterações no padrão de troca de gases do inseto, indicando que a redução da eficiência do sistema imune pode ser decorrente de alterações induzidas no metabolismo do hospedeiro.

Foi detectado que o veneno do ectoparasitóide *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) apresenta atividade semelhante à da enzima fenoloxidase. Nesse caso, a ocorrência dessa enzima no veneno de parasitóides estaria relacionada à indução de morte celular, causando, em testes *in vitro*, rompimento da integridade da membrana plasmática, inchaço e posteriormente a morte celular de hemócitos (ABT & RIVERS, 2007).

Lavine e Beckage (1996) verificaram que a resposta imune celular foi afetada apenas transitoriamente no sistema *Manduca sexta-Cotesia congregata*. Investigaram também como a larva de último instar do parasitóide conseguiria escapar dessa recuperação na ausência dos efeitos imunossupressivos do PDV. Para isso, transferiram larvas do hospedeiro parasitado, para um não-parasitado e o acompanharam até a emergência. A resposta de encapsulação foi avaliada após injeção de esferas de Sephadex A-25, sendo encontradas fortes evidências de que a habilidade do parasitóide em evitar a resposta imune necessita do PDV durante os estágios iniciais do parasitismo, enquanto que as larvas em estágio avançado de desenvolvimento utilizam outros mecanismos.

Stettler et al. (1998) investigaram a influência do parasitismo de *Chelonus inanitus* e seu polidnavírus/veneno na morfologia, contagem diferencial, ultraestrutura e comportamento de dispersão dos hemócitos e atividade de encapsulação em seu hospedeiro *Spodoptera littoralis*. Foi demonstrado que o parasitismo ou

polidnavírus/veneno não anulam o comportamento de dispersão dos plasmatócitos nem alteram os tipos e a morfologia ultraestrutural das células de defesa do hospedeiro. Além disso, o hospedeiro foi capaz de encapsular esferas de látex, mas não a larva do parasitóide, indicando que a reação de encapsulação não é suprimida, mas que o reconhecimento da larva do parasitóide e/ou da ativação subsequente do sistema imune celular não ocorre. Dessa maneira, os autores não encontraram indícios de supressão do sistema imune celular nesse parasitóide, mostrando que a larva deve estar protegida da encapsulação por meios específicos, não associados com a supressão do sistema imune do hospedeiro. Contudo, a mistura de PDV e veneno fornece proteção à larva do parasitóide, uma vez que larvas implantadas no hospedeiro, na ausência de secreções, foram encapsuladas.

Um outro exemplo da ação do polidnavírus e veneno pode ser ilustrado pelo estudo realizado por Nakamatsu et al. (2001) no sistema *Cotesia kariyai* - *Pseudaletia separata*. Foram avaliadas as mudanças fisiológicas causadas pela injeção do fluido do cálice (polidnavírus) mais veneno (C+V) em hospedeiros não-parasitados. A injeção de C+V em hospedeiros não-parasitados duplicou os efeitos do parasitismo, isto é, aumentou a digestibilidade aproximada (DA) e diminuiu a eficiência de conversão do alimento digerido (ECD). Além disso, as injeções de C+V elevaram as concentrações de trealose em hospedeiros não-parasitados de 7 a 10 dias após a injeção (segundo estágio da larva de *C. kariyai*), indicando que a disponibilização dos nutrientes necessários ao crescimento do parasitóide imaturo na hemolinfa do inseto hospedeiro também é afetada pela ação do complexo vírus-veneno.

Diversos estudos demonstraram que alguns PDVs somente atuam com eficácia quando acompanhados por proteínas do veneno. Dessa maneira, Zhang et al. (2004) estudaram os constituintes do veneno que facilitam a infecção pelo PDV e/ou a sua expressão gênica. Os autores relataram que o peptídeo Vn 1.5, isolado do veneno de *Cotesia rubecula*, foi necessário a expressão de genes do bracovírus CrBVs em hemócitos do hospedeiro, *Pieris rapae*, embora o mesmo não mostrou ser essencial para a entrada de CrBV em células do hospedeiro. O estudo revelou que na ausência do Vn1.5 ou proteínas totais do veneno, a transcrição de genes do CrBV não foi detectada e o comportamento dos hemócitos não foi alterado, apesar de sua infecção.

Esses resultados indicam que os componentes do veneno são exigidos para a expressão de genes do CrBV nas células do hospedeiro após sua infecção.

No sistema *Tranosema rostrale* (Hymenoptera: Ichneumonidae) - *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) foi observado o prolongamento do período de desenvolvimento, chegando a dobrar a duração no 6^o instar, além de redução no crescimento e produção de fezes da larva. Injeção dos fluidos do cálice do parasitóide no hospedeiro resultou em atraso no desenvolvimento, equivalente ao observado em larvas naturalmente parasitadas e, em alguns hospedeiros, a completa supressão da pupação (DOUCET; CUSSON, 1996ab).

Além da ação do veneno e vírus simbiotes, que podem atuar na inativação do sistema imune e regulação do desenvolvimento do hospedeiro, parasitóides também contam com a participação dos teratócitos no processo de regulação hospedeira. Os teratócitos permanecem na hemolinfa do hospedeiro durante o desenvolvimento larval do parasitóide, sofrendo hipertrofia acentuada devido ao processo de divisão nuclear. Essas células apresentam atividade sintética acentuada e o seu produto de secreção pode servir como nutriente para sustentar o desenvolvimento do parasitóide imaturo e também atuar na regulação do desenvolvimento e crescimento do hospedeiro (STRAND; WONG, 1991; DAHLMAN; VINSON, 1993; OKUDA; KADONO-OKUDA, 1995; WEBB; RANA; DAHLMAN, 2001, BELL et al., 2004).

No sistema *Pseudaletia separata* - *Cotesia kariyai*, os teratócitos novos (retirados após quatro dias de parasitismo) parecem ter um papel na prevenção da encapsulação, impedindo a ação dos hemócitos do hospedeiro. Agem conjuntamente com o fluido do cálice e o veneno, já que a encapsulação foi impedida somente quando os três produtos do parasitóide foram injetados em hospedeiros não-parasitados. Em hospedeiros parasitados em estágio tardio, a atividade da fenoloxidase foi reduzida e um inibidor da enzima foi detectado nos teratócitos. Além disso, os teratócitos, mas não o fluido do cálice nem o veneno, reduziram a atividade da enzima em experimentos *in vitro*. Conseqüentemente, foi levantada a hipótese de que os teratócitos sozinhos podem impedir a encapsulação neste estágio, suprimindo a atividade da fenoloxidase (KITANO; WAGO; ARAKAWA, 1990).

Nussbaumer, Stradner e Schopf (2002) avaliaram o efeito no crescimento e desenvolvimento de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) após a injeção isolada dos diferentes fatores associados ao parasitóide braconídeo *Glyptapanteles porthetriae*. O veneno sozinho não apresentou qualquer efeito no desenvolvimento do inseto, enquanto que o fluido do cálice afetou significativamente o crescimento do hospedeiro. Porém, o efeito mais similar ao parasitismo natural foi o da injeção dos ovos do parasitóide no hospedeiro.

Os mecanismos pelos quais PDV e teratócitos inibem o crescimento e o desenvolvimento do hospedeiro pode representar a exploração de sítios-alvo de regulação em um programa de desenvolvimento conservado. Endoparasitóides devem superar as defesas dos hospedeiros e de suas redes reguladoras, tornando isso possível através da introdução de proteínas codificadas por genes derivados de PDV e teratócitos ao longo do desenvolvimento do parasitóide e regulação da fisiologia do hospedeiro (WEBB; RANA; DAHLMAN, 2001).

2.6 Interações hormonais hospedeiro-parasitóide

Os dois grupos hormonais mais importantes responsáveis pela regulação do crescimento, desenvolvimento, metamorfose e reprodução em insetos são os ecdisteróides, produzidos pelas glândulas protorácicas, e o hormônio juvenil (HJ), produzido pelos *corpora allata*. Os neurohormônios sintetizados por células neurosecretoras localizadas em diversos órgãos dos insetos, como cérebro e intestino, por exemplo, regulam a produção e liberação do HJ e ecdisteróides e também atuam na ativação e inibição da atividade de órgãos-alvo do hospedeiro. A manipulação da fisiologia do hospedeiro realizada pelos parasitóides ocorre em grande parte através da alteração na síntese, liberação, metabolismo e ação desses hormônios (EDWARDS; WEAVER; MARRIS, 2001; BECKAGE; GELMAN, 2004).

Em larvas sadias de Lepidoptera, os níveis de HJ são altos durante o início do desenvolvimento larval e caem no último instar, quando a larva alcança o tamanho crítico para o início da metamorfose. Então ocorre um pico de liberação de ecdisteróide na ausência do HJ e o inseto inicia a fase de muda e início da metamorfose. A presença

do parasitóide pode alterar drasticamente essa situação e a metamorfose pode ser induzida precocemente ou pode ser completamente suprimida (NIJHOUT; WILLIAMS, 1974; JONES, 1985; GILBERT; GRANGER; ROE, 2000).

Wani et al. (1997) observaram que *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae), quando parasita *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), leva à expressão precoce do comportamento pré-metamórfico no penúltimo instar do hospedeiro, antes da emergência do parasitóide. Essa alteração comportamental é devida à elevação dos níveis de ecdisteróides no 6^o instar, com concomitante redução da atividade das esterases que degradam o hormônio juvenil, permitindo alterações comportamentais sem a mudança para o estágio pupal.

Diversos trabalhos demonstraram que os parasitóides liberam na hemolinfa do hospedeiro ecdisteróides e HJ, ajustando os níveis desses hormônios a fim de satisfazer suas próprias necessidades. Dentre eles está o estudo desenvolvido por Cole et al. (2002), que demonstraram que *C. congregata* libera HJ III (forma comumente encontrada em muitos insetos) tanto *in vivo* como *in vitro*. A manutenção de concentrações elevadas do HJ, em conjunto com a redução na atividade das HJ esterases, é uma combinação importante no controle do desenvolvimento do hospedeiro.

Em hospedeiros parasitados por *Cotesia* spp., os efeitos endócrinos se tornam evidentes no último instar do hospedeiro, quando os sintomas da metamorfose são suprimidos. No sistema *M. sexta* - *C. congregata*, o peso do hospedeiro excede o valor normalmente atingido para início da metamorfose, antes da saída dos imaturos do parasitóide do corpo do hospedeiro. Como resultado, o hospedeiro tem seu desenvolvimento interrompido e vive por muitos dias em um estado de pós-emergência, sem se alimentar antes de morrer, duas ou três semanas após a saída do parasitóide. Lagartas sadias injetadas com PDV alcançam peso elevado e então morrem como larvas pré-metamórficas ou um intermediário entre larva e pupa, sugerindo que os níveis de HJ na hemolinfa permanecem altos suficientemente para suprimir a metamorfose (DUSHAY; BECKAGE, 1993; BECKAGE et al., 1994; ALLEYNE; BECKAGE, 1997).

Marris et al. (2001) verificaram que o veneno do ectoparasitóide *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) é capaz de interromper a produção de ecdisteróides de *Lacanobia oleraceae* (Lepidoptera: Noctuidae) através da regulação da atividade da glândula protorácica, que perde a habilidade em responder à sinalização para a produção do hormônio.

Os produtos do parasitóide injetados nos hospedeiros são surpreendentemente eficientes e apresentam modos de ação peculiares, sendo utilizados com o objetivo de proporcionar ao parasitóide uma forma bem sucedida de completar seu desenvolvimento. A injeção de veneno, fluidos do cálice contendo PDV e a presença de teratócitos podem ser as fontes de moléculas reguladoras que ajustam o sistema do hospedeiro, suprimindo sua resposta imune e controlando seu desenvolvimento. A identificação e caracterização dessas moléculas reguladoras permitirão que as mesmas sejam direcionadas ao desenvolvimento de tecnologias que permitam sua utilização aplicada ao controle de pragas (BECKAGE; GELMAN, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de *D. saccharalis* e *C. flavipes*

Lagartas de *Diatraea saccharalis* foram criadas em dieta à base de farelo de soja e germe de trigo (MACEDO et al., 1983), seguindo técnicas assépticas de criação de insetos descritas por Parra (1999). Lagartas recém-eclodidas foram colocadas em tubos de vidro (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) e mantidas em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 14 h de fotofase). Parte das lagartas foi removida dos tubos de criação após 15 dias de desenvolvimento para o seu parasitismo por *Cotesia flavipes*. Logo após o parasitismo, as lagartas foram transferidas para placas plásticas (5 cm de diâmetro) contendo dieta de realimentação (semelhante a dieta de alimentação, exceto pela adição de ácido acético e remoção dos sais de Wesson) para o desenvolvimento do parasitóide e acondicionadas em câmaras climatizadas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e 14 h de fotofase). Após o término do desenvolvimento larval do parasitóide, as massas de casulos, contendo as pupas de *C. flavipes*, foram removidas e transferidas para recipientes limpos de criação para a emergência e acasalamento dos adultos. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 50% para manutenção da criação do parasitóide.

As lagartas de *D. saccharalis* que não foram utilizadas na manutenção da população do parasitóide foram mantidas nas condições acima descritas para a manutenção da população do hospedeiro.

Para os experimentos realizados, o desenvolvimento das lagartas foi sincronizado para se evitar variações devido à desuniformidade no desenvolvimento do hospedeiro, sendo empregadas apenas lagartas no início do 6^o instar (0-12h após a muda).

3.2 Efeito das secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas de *C. flavipes* no crescimento e desenvolvimento de *D. saccharalis*

3.2.1 Coleta de veneno e fluidos do cálice

Amostras de veneno e fluidos do cálice + vírus simbiossitos associados a *C. flavipes* foram obtidos isoladamente, após a dissecação de fêmeas de 1-2 dias de idade desse parasitóide. Fêmeas recém-emergidas foram mantidas em recipientes contendo solução aquosa de mel até a sua dissecação para a obtenção do reservatório de veneno e retirada da região do cálice do ovário.

Para a obtenção do reservatório de veneno e região do cálice, as fêmeas foram imersas em tampão anticoagulante (98 mM NaOH, 0,15 M NaCl e 1,7 mM EDTA em pH 4,5) (HOTTA; OKUDA; TANAKA, 2001) e o aparelho reprodutor inteiramente removido com auxílio de um par de pinças. Após a retirada do aparelho reprodutor intacto do interior do abdome das fêmeas, os reservatórios de veneno foram coletados e transferidos para lâminas de vidro contendo 5 µl de solução tampão, mantidas sobre gelo.

O fluido do cálice também foi obtido após a retirada do aparelho reprodutor, assim como descrito acima. Os cálices foram removidos do restante do aparelho reprodutor e transferidos para lâminas de vidro com 100 µl de solução tampão, rompidos com auxílio de agulha hipodérmica e o conteúdo celular removido após filtração em membrana Millipore de 45 µm acoplada a uma seringa descartável (1 ml). O material filtrado foi coletado em tubos de centrifuga (1,5 ml) sendo o volume final ajustado para a concentração de uma fêmea equivalente/5 µl de solução. Tanto o veneno como os fluidos do cálice foram utilizados imediatamente após a coleta.

3.2.2 Efeito do veneno e fluidos do cálice no desenvolvimento do hospedeiro

Os produtos do parasitóide selecionados para a verificação do seu efeito no desenvolvimento do hospedeiro foram injetados em lagartas de 6^o instar (0-12 h), selecionadas como descrito no item 3.1. Essas lagartas tiveram o seu peso inicial

determinado e foram injetadas com o auxílio de micro-agulhas produzidas a partir do aquecimento e distensão de capilares de vidro. A região apical do capilar foi lixada de forma a produzir um ápice em forma de bisel para facilitar a penetração da mesma pela região membranosa da cutícula larval. Larvas selecionadas de *D. saccharalis* foram injetadas com 5 µl de solução tampão contendo os produtos derivados de *C. flavipes* a serem testados, sempre na concentração equivalente a 1 fêmea do parasitóide, resultando nos seguintes tratamentos: *i*) veneno, *ii*) fluidos do cálice+vírus e *iii*) veneno+fluidos do cálice+vírus. Como controle negativo, lagartas de *D. saccharalis* foram injetadas apenas com 5 µl de solução tampão, sendo utilizados dois controles positivos; *i*) lagartas parasitadas por *C. flavipes* e *ii*) lagartas parasitadas por *C. flavipes* irradiadas, para que pudesse ser observado apenas o efeito das secreções (veneno+fluido do cálice+vírus) do parasitóide no desenvolvimento do hospedeiro. Fêmeas de *C. flavipes* foram esterilizadas após exposição de pupas desse parasitóide à fonte de radiação ⁶⁰Co (Gamacell 220), na dose de 75Gy. Essa dose de ⁶⁰Co permitiu o completo desenvolvimento da pupa e a emergência do adulto, sem comprometer as funções necessárias ao parasitismo, mas resultando na completa esterilização dos adultos. A eficiência do processo de esterilização foi verificada dissecando-se amostras de larvas parasitadas por essas fêmeas para constatar a eclosão e o desenvolvimento larval.

Após o parasitismo ou injeção dos diferentes produtos derivados do parasitóide nas lagartas de *D. saccharalis*, as mesmas foram individualizadas em placas plásticas (5 cm de diâmetro) contendo dieta de realimentação e acondicionadas em câmaras climatizadas (28±2°C, 70±10% UR e 14 h de fotofase). As lagartas foram pesadas diariamente em balança de precisão (Bel Engineering), sendo o efeito do parasitismo e das substâncias injetadas verificadas pela observação do ganho médio diário de peso/lagarta, peso máximo acumulado, período de desenvolvimento larval, sobrevivência larval e porcentagem de pupas deformadas. As lagartas foram observadas até a sua morte, pupação ou emergência do parasitóide, ou pelo período máximo de observação de 30 dias. Cada tratamento contou com pelo menos 30 repetições, sendo cada lagarta considerada como uma repetição. Lagartas que

morreram logo após a injeção foram eliminadas, assumindo-se a sua ocorrência a problemas no procedimento de injeção.

3.3 Efeito do parasitismo por *C. flavipes* na resposta imune de *D. saccharalis*

3.3.1 Resposta celular - Contagem total de hemócitos

Para avaliação do efeito do parasitismo na contagem total de hemócitos de lagartas de *D. saccharalis*, após a higienização superficial do inseto, uma de suas falsas pernas foi removida e 10 µl de hemolinfa foi coletada com auxílio de micropipeta e colocada em tubo de centrifuga (1,5 ml) refrigerado, contendo 90 µl de tampão anticoagulante (98 mM NaOH, 0,15 M NaCl e 1,7 mM EDTA, pH 4,5). A amostra foi agitada e uma alíquota transferida para contagem do número de células em câmara de Neubauer (Boeco Germany), sob microscópio ótico (Axiostar Plus, Zeiss) acoplado ao sistema de captura e análise de imagens Motic Image Advanced 3.2 (Motic China Group Co., Ltd).

A contagem total do número de hemócitos foi conduzida ao longo do desenvolvimento do parasitóide, amostrando-se as células em seis intervalos após o parasitismo (0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo). Lagartas controle no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico foram amostradas nos mesmos intervalos para a contagem do número de células no inseto sadio. Foram utilizadas 7 lagartas para cada intervalo amostral para cada tratamento, sendo cada lagarta considerada como uma repetição.

3.3.2 Resposta celular – Encapsulação

O efeito do parasitismo na capacidade de encapsulação *in vivo* dos hemócitos do hospedeiro foi testado utilizando-se de esferas sintéticas de 40 a 120 µm (Sephadex G-200-120) como agente invasor (LAVINE; BECKAGE, 1996; RICHARDS; EDWARDS, 2002). As esferas a serem utilizadas foram incubadas em etanol 70% por 10 min e lavadas quatro vezes em 100x o seu volume em tampão fosfato estéril (PBS) (200 mM

de fosfato de sódio e 150 mM de NaCl, pH 7.0) (YOSHIGA; TOJO, 2001), antes de serem utilizadas para injeção no hospedeiro. As esferas foram então ressuspensas em volume adequado de tampão fosfato para se atingir a concentração de aproximadamente 3 esferas/ μ l, sendo cada lagarta injetada com 5 μ l da solução, ou seja, 15 esferas.

O experimento foi separado em dois tratamentos distintos, lagartas controle e lagartas parasitadas, ambas injetadas com as esferas e mantidas em câmaras climatizadas ($28\pm 2^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e 14 h de fotofase). A capacidade de encapsulação foi avaliada em diferentes estágios do desenvolvimento do parasitóide, sendo as lagartas injetadas com 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo, e a encapsulação avaliada 24 h após a injeção das mesmas. A encapsulação foi avaliada após higienização superficial das lagartas pela imersão em álcool 70% por 10 min e lavagem em água destilada. As lagartas foram então dissecadas em solução tampão anticoagulante, tendo a sua cavidade hemocélica lavada com o mesmo tampão para a recuperação das esferas. As esferas de Sephadex injetadas foram localizadas em microscópio óptico invertido (Motic), acoplado ao sistema de captura e análise de imagens Motic Image Advanced 3.2 (Motic China Group Co., Ltd). As imagens capturadas foram analisadas e a resposta celular medida pelo número de hemócitos ou camadas celulares aderidas à superfície da esfera. Foram assim classificados: *i*) ausência de resposta celular quando não ocorria aderência de células às esferas, *ii*) adesão de 1 a 10 células, *iii*) 11 a 100 células, *iv*) 101 a menos de uma camada e *v*) uma ou mais camadas celulares. Foram utilizados cinco indivíduos para cada tratamento em cada período amostral, totalizando 60 lagartas avaliadas.

3.3.3 Resposta humoral - Atividade das fenoloxidasas (PO)

Para o preparo da amostra de plasma para condução desse ensaio, os insetos foram higienizados superficialmente com etanol 70% e uma de suas falsas pernas foi removida com auxílio de tesoura oftalmológica e a hemolinfa extravasada foi coletada em tubo de centrifuga mantido em gelo, com auxílio de uma micropipeta. A amostra foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5417 R) imediatamente após a coleta (2.580g por 5

min a 4° C) e 1 µl do sobrenadante, correspondente ao plasma, foi coletado em 49 µl de tampão anticoagulante e armazenado a -20°C para a posterior determinação da concentração de proteína da amostra. O restante do sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da atividade das fenoloxidasas. A atividade das fenoloxidasas foi determinada adicionando-se 10 µl de plasma a 990 µl de 5 mM de L-DOPA (3,4-dihidroxi-DL-fenilalanina) (substrato das fenoloxidasas), em tampão cacodilato (10 mM de cacodilato de sódio, 5mM de CaCl₂, pH 7,0). As amostras foram misturadas brevemente e a atividade foi avaliada medindo-se o produto da reação em espectrofotômetro BioMate3 (Thermo Electron Corporation), a 490 nm. As medidas foram realizadas a intervalos de 5 min por 2 h, período no qual a velocidade da reação foi proporcional à concentração da enzima. Para o branco foram adicionados 10 µl de tampão PBS (10 mM de fosfato de sódio, pH 8,0, 0,9% (p/v) de NaCl) aos 990 µl de L-DOPA. A atividade das fenoloxidasas de lagartas de *D. saccharalis* foi expressa em unidades de absorbância lidas a 490 nm por mg de proteína na amostra.

A concentração de proteínas na amostra foi determinada através de teste colorimétrico, utilizando-se de produto comercial (Coomassie Brilliant Blue BG-250), baseado no teste de Bradford (1976). As amostras (50 µl) foram misturadas a 1500 µl do reagente, agitadas vigorosamente em vórtex e a absorbância a 595 nm foi lida imediatamente. Albumina de soro bovino foi utilizada para a determinação da curva-padrão.

As lagartas utilizadas como controle e aquelas parasitadas foram amostradas após 1, 3, 5, 7 e 9 dias da data do parasitismo. Cada tratamento contou com cinco repetições (1 lagarta = 1 repetição) por período amostral.

3.3.4 Resposta humoral - Dosagem de óxido nítrico

Lagartas controle e parasitadas de *D. saccharalis*, preparadas como descrito anteriormente, foram amostradas após 1, 3, 5, 7 e 9 dias do parasitismo. Essas lagartas também tiveram a hemolinfa coletada através de dano produzido no tegumento de uma das pernas torácicas da lagarta. Foram coletados 10 µl do conteúdo extravasado em 50 µl de solução tampão PBS refrigerada, mantida em banho de gelo. Foram utilizadas 10

lagartas por tratamento, para cada período de amostragem, totalizando 100 indivíduos/tratamento.

A hemolinfa coletada foi imediatamente centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5417 R) a 2000g por 10 min para a separação da parte celular do plasma. Após a centrifugação, o sobrenadante (plasma) foi coletado e transferido para um novo tubo, sendo o pellet (fração celular) ressuspensa em 25 µl de tampão PBS.

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada com base no reagente de Griess (GREEN et al., 1981), sendo avaliada pela concentração do íon nitrito (NO^{2-}). Para isso, foram colocados 25µl de cada amostra em poços de microplaca, aos quais foram adicionados 25 µl de solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5%, mais 50 µl de solução de NEED (dihidroclorito de naftiletilenoamina) a 0,1% (FARALDO et al., 2005). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi obtida em leitor de microplacas com filtro de 540nm (Espectromax Plus - Molecular Devices) pelo protocolo "Basic Endpoint" do programa Soft Max (PRO 4.3 LS). Para a determinação da concentração de óxido nítrico no plasma e na fração celular, os valores de absorbância obtidos foram comparados àqueles determinados em curva-padrão utilizando-se concentrações conhecidas de NEED.

3.4 Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova on Ranks) ($P < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Dunn's ($P < 0,05$). Para a avaliação do efeito das secreções no desenvolvimento de *D. saccharalis*, os tratamentos foram comparados com o controle negativo, utilizado como referência nas avaliações. O teste de Mann-Witney Rank Sum ($P < 0,05$) foi aplicado na determinação do efeito do parasitismo na resposta imune de *D. saccharalis*, utilizando, em ambos, o pacote estatístico SigmaStat (versão 2.0).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito das secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas de *C. flavipes* no crescimento e desenvolvimento de *D. saccharalis*

As secreções associadas ao aparelho reprodutor de *C. flavipes* afetaram o crescimento (ganho de peso) e o período de desenvolvimento necessário para que as lagartas de *D. saccharalis* finalizassem o seu desenvolvimento. Alterações no ganho de peso de lagartas de *D. saccharalis* foram observadas apenas naqueles insetos parasitados por fêmeas esterilizadas, não havendo diferença entre os demais tratamentos e o controle (Fig. 1). No entanto, não foram observadas diferenças no ganho médio de peso diário dos diferentes tratamentos em relação ao controle (Fig. 2), e nem no padrão de ganho de peso (Fig. 3). Assim, esses resultados indicam que a diferença encontrada quanto ao ganho máximo de peso das lagartas parasitadas por fêmeas irradiadas e o controle deveu-se ao maior período de alimentação da primeira (Fig. 4).

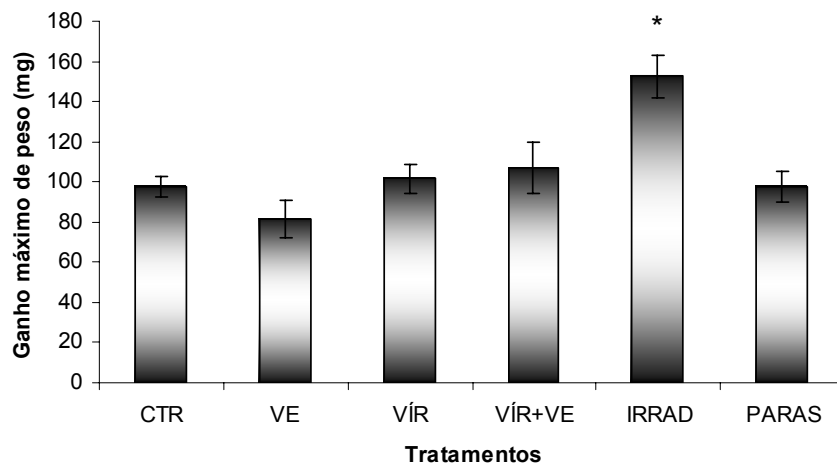


Figura 1 - Ganho máximo de peso alcançado por lagartas de *D. saccharalis* injetadas com secreções derivadas do aparelho reprodutor feminino de *C. flavipes* (VE= veneno; VIR= fluidos do cálice+vírus; VIR+VE= fluidos do cálice+vírus+veneno) e parasitadas por fêmeas normais (PARAS) ou esterilizadas (IRRAD) (CTR = controle - injeção com salina) (* Indica diferença significativa pelo teste Dunn's, $P < 0,05$)

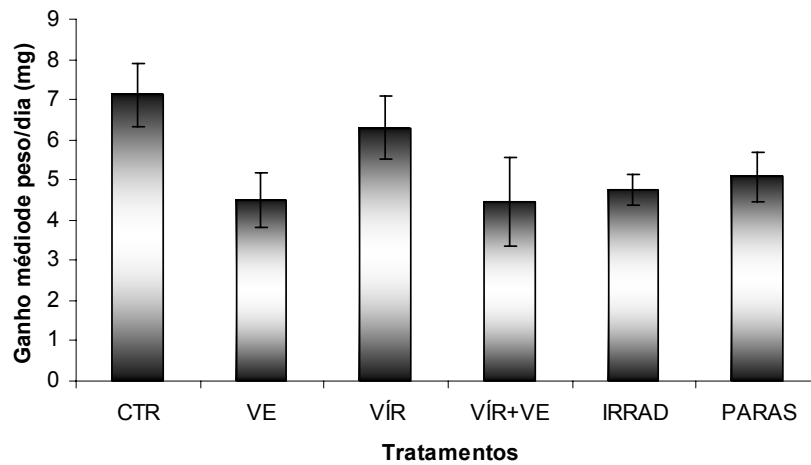


Figura 2 - Ganho médio de peso diário de lagartas de *D. saccharalis* injetadas com secreções derivadas do aparelho reprodutor feminino de *C. flavipes* (VE= veneno; VIR= fluidos do cálice+vírus; VIR+VE= fluidos do cálice+vírus+veneno) e parasitadas por fêmeas normais (PARAS) ou esterilizadas (IRRAD) (CTR= controle - injeção com salina)

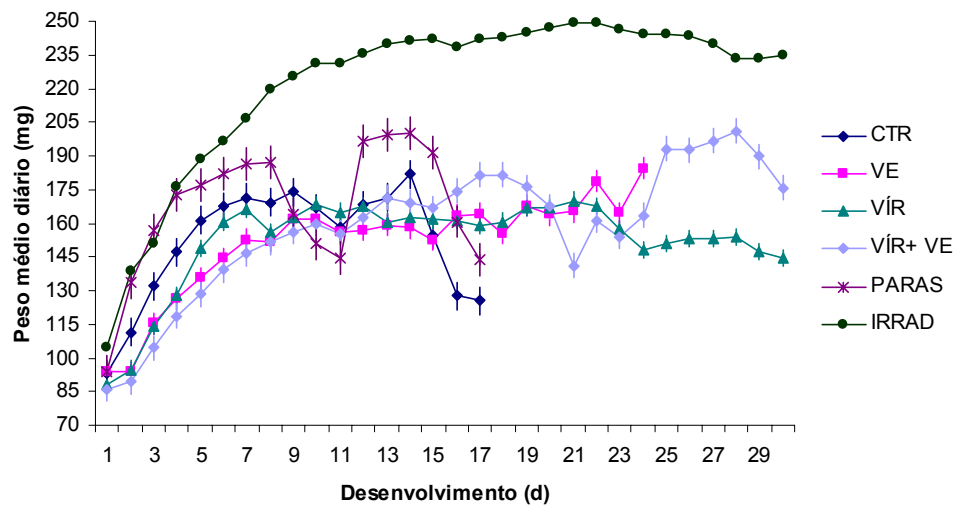


Figura 3 - Peso médio diário (mg) ao longo do desenvolvimento larval de *D. saccharalis* após injeção de secreções derivadas do aparelho reprodutor feminino de *C. flavipes* (VE= veneno; VIR= fluidos do cálice+vírus; VIR+VE= fluidos do cálice+vírus+veneno) e parasitadas por fêmeas normais (PARAS) ou esterilizadas (IRRAD) (CTR= controle - injeção com salina)

Lagartas injetadas com fluidos do cálice+vírus ou fluidos do cálice+vírus+veneno apresentaram alongamento do período larval quando comparadas aos insetos controle, os quais finalizaram o seu desenvolvimento larval cerca de 10 dias após o início do último instar (Fig. 4). No entanto, lagartas injetadas apenas com o veneno não sofreram qualquer alteração em seu desenvolvimento, o qual também não potencializou os efeitos já observados em insetos injetados com os fluidos do cálice+vírus, quando aplicados conjuntamente, indicando que o fluido do cálice+vírus são os responsáveis pelas alterações do desenvolvimento do hospedeiro (Fig. 4). Os efeitos induzidos em hospedeiros parasitados por fêmeas estéreis foram muito mais evidentes, permanecendo o hospedeiro na fase larval por todo o período de observação experimental (30 dias) (Fig. 4). Essa observação também indica que secreções oriundas das larvas do parasitóide e/ou teratócitos são desnecessárias no processo de regulação do desenvolvimento do hospedeiro. Interessante notar que o parasitóide não induz o prolongamento da fase larval do hospedeiro quando o inseto se desenvolve em lagartas de último instar, sugerindo que as larvas do parasitóide exploram o seu hospedeiro rapidamente nesse instar (Fig. 4).

Lagartas de todos os tratamentos, com exceção daquelas parasitadas por fêmeas normais ou fêmeas irradiadas transformaram-se em pupas (Fig. 5-A). No entanto, as lagartas injetadas com veneno e/ou fluidos do cálice apresentaram maior incidência de deformações de pupas, com as mesmas apresentando características larvais. Dos seis indivíduos que escaparam ao parasitismo por *C. flavipes* e desenvolveram-se em pupa, todos apresentaram deformações no aparelho bucal e asas (Figs. 6 e 7). As deformações observadas nas pupas refletiram na formação dos adultos, com os mesmos apresentando deformações de asas, mas a sobrevivência pupal não foi afetada nos diferentes tratamentos (Fig. 5-B).

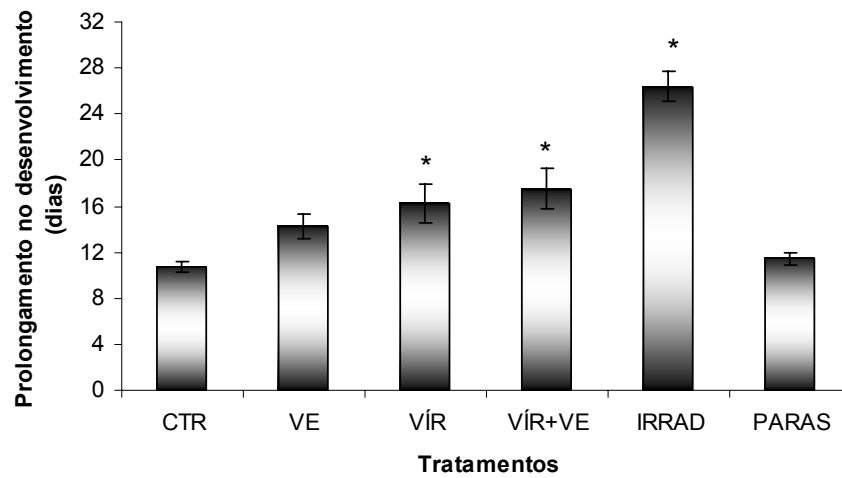


Figura 4 - Prolongamento no desenvolvimento de lagartas de *D. saccharalis* injetadas com secreções derivadas do aparelho reprodutor feminino de *C. flavipes* (VE = veneno; VIR= fluidos do cálice+vírus; VIR+VE= fluidos do cálice+vírus+veneno) e parasitadas por fêmeas normais (PARAS) ou esterilizadas (IRRAD) (CTR= controle - injeção com salina). (*Indica diferença significativa pelo teste Dunn's, $P < 0,05$)

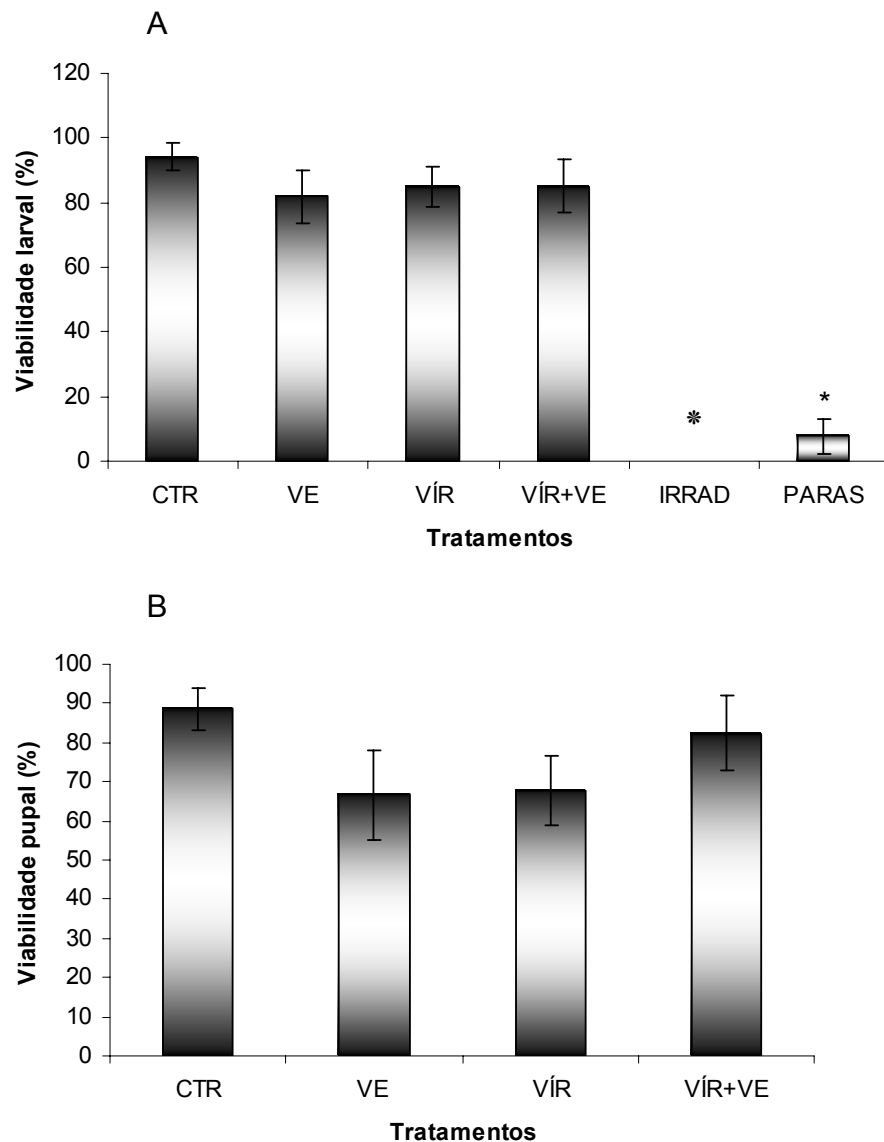


Figura 5 - Sobrevivência larval (A) e pupal (B) de *D. saccharalis* observada após injeção das secreções do aparelho reprodutivo de *C. flavipes* (VE= veneno; VIR= fluidos do cálice+vírus; VIR+VE= fluidos do cálice+vírus+veneno) e parasitadas por fêmeas normais (PARAS) ou esterilizadas (IRRAD) (CTR= controle - injeção com salina). * Indica a ausência de indivíduos que passaram para a fase pupal até o término do período de observação (*Indica diferença significativa pelo teste Dunn's, $P < 0,05$)

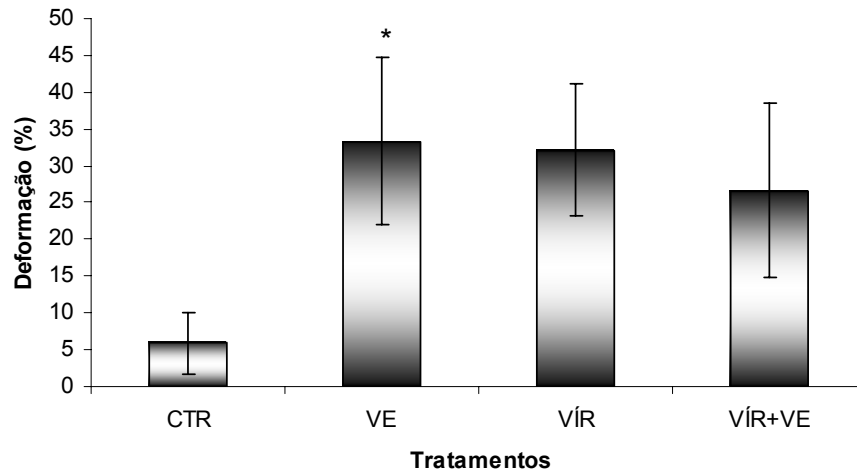


Figura 6 - Deformação de pupas ou adultos de *D. saccharalis* observada após injeção das secreções do aparelho reprodutivo de *C. flavipes* (VE= veneno; VÍR= fluidos do cálice+vírus; VÍR+VE= fluidos do cálice+vírus+veneno) (CTR= controle - injeção com salina) (*Indica diferença significativa pelo teste Dunn's, $P < 0,05$)

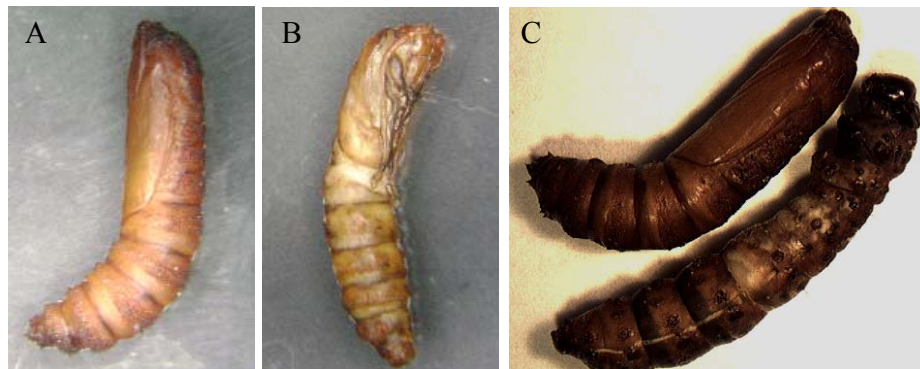


Figura 7 - Pupas de *D. saccharalis*, comparação de uma pupa normal (A), com uma pupa proveniente de lagarta parasitada por *C. flavipes* irradiada (B) e duas pupas, uma normal e outra com características larvais após injeção de veneno (C)

4.2 Efeito do parasitismo por *C. flavipes* na resposta imune de *D. saccharalis*

4.2.1 Contagem total de hemócitos

O número total de hemócitos de lagartas de *D. saccharalis* foi afetado pelo parasitismo por *C. flavipes* em estágios específicos do parasitismo (Fig. 8). A contagem do número total de células de lagartas controle e lagartas parasitadas não diferiu no período inicial do parasitismo. No entanto, o número de hemócitos em lagartas parasitadas após a eclosão das larvas do parasitóide (após dia 3 de desenvolvimento), foi reduzido quando comparado ao controle (Fig. 8). Assim, lagartas parasitadas apresentaram declínio no número total de hemócitos a partir do terceiro dia de desenvolvimento do parasitóide, enquanto o número de células no inseto controle manteve-se mais ou menos constante. Diferenças significativas entre o número total de células no controle e nos indivíduos parasitados foram encontradas nos dias 5 e 9 após o parasitismo.

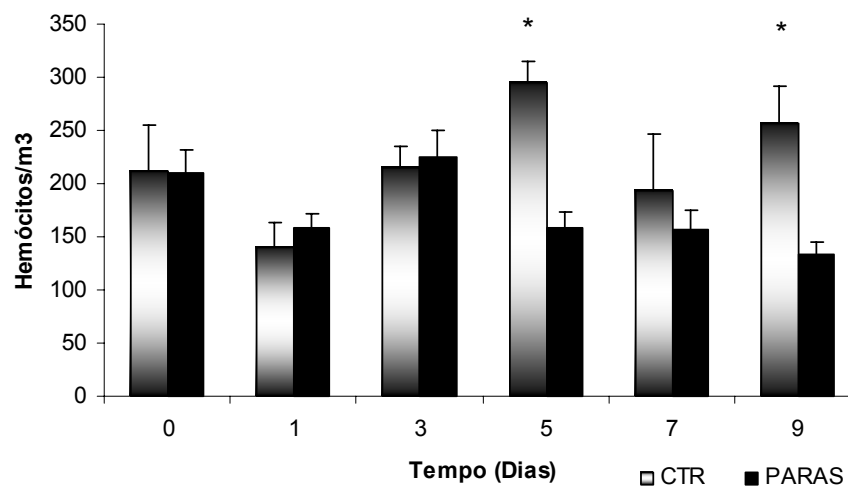


Figura 8 - Número de hemócitos de *D. saccharalis* por m³ encontrados em lagartas controle (CTR) e parasitadas (PARAS) por *C. flavipes* durante o período adotado de avaliação (0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias). (*Indica diferença significativa pelo teste Mann-Witney Rank Sum, P<0,05)

4.2.2 Capacidade de encapsulação

O parasitismo afetou drasticamente a capacidade de encapsulação dos hemócitos de *D. saccharalis* ao longo do desenvolvimento do parasitismo (Fig. 9). No estágio inicial do parasitismo, com a injeção de esferas logo após a oviposição de *C. flavipes*, a encapsulação completa no controle ocorreu em cerca de 74% das esferas, enquanto nas lagartas parasitadas apenas cerca de 3% foram encapsuladas. Nas lagartas parasitadas, a maioria das esferas, cerca de 46,8 e 35,6%, apresentavam apenas 1-10 células e 11-100 células, respectivamente (Fig. 9). A tendência observada no processo de encapsulação logo após o parasitismo foi mantida nos demais períodos de avaliação, sendo a resposta muito mais intensa no controle do que no inseto parasitado, mesmo que a resposta de encapsulação no inseto parasitado após 1 e 3 dias do parasitismo tenha sido mais intensa do que nos demais períodos de avaliação. O interessante foi observar que a inibição ou atenuação da resposta celular dada pela encapsulação é mantida nos estágios tardios do parasitismo, a partir do início do desenvolvimento larval do parasitóide. Após a eclosão da larva do parasitóide, que ocorre após o terceiro dia de parasitismo, foi verificada redução significativa no número de esferas que foram completamente encapsuladas, com aumento proporcional no número de esferas que não apresentaram qualquer célula aderida à sua superfície (Fig. 9).

Considerando as esferas totalmente encapsuladas (Fig. 10), a resposta celular também é alterada de acordo com o período de desenvolvimento no qual o inseto se encontra. Tanto no início do 6º instar, como no final do desenvolvimento larval do hospedeiro o número de esferas encapsuladas é relativamente superior (84,3%) quando comparado aos demais períodos nas lagartas controle. A mesma diferença é observada em lagartas parasitadas, próximo à emergência do parasitóide, no 9º dia após a oviposição, só que de maneira oposta; as esferas localizadas não apresentaram nenhum sinal de adesão celular.

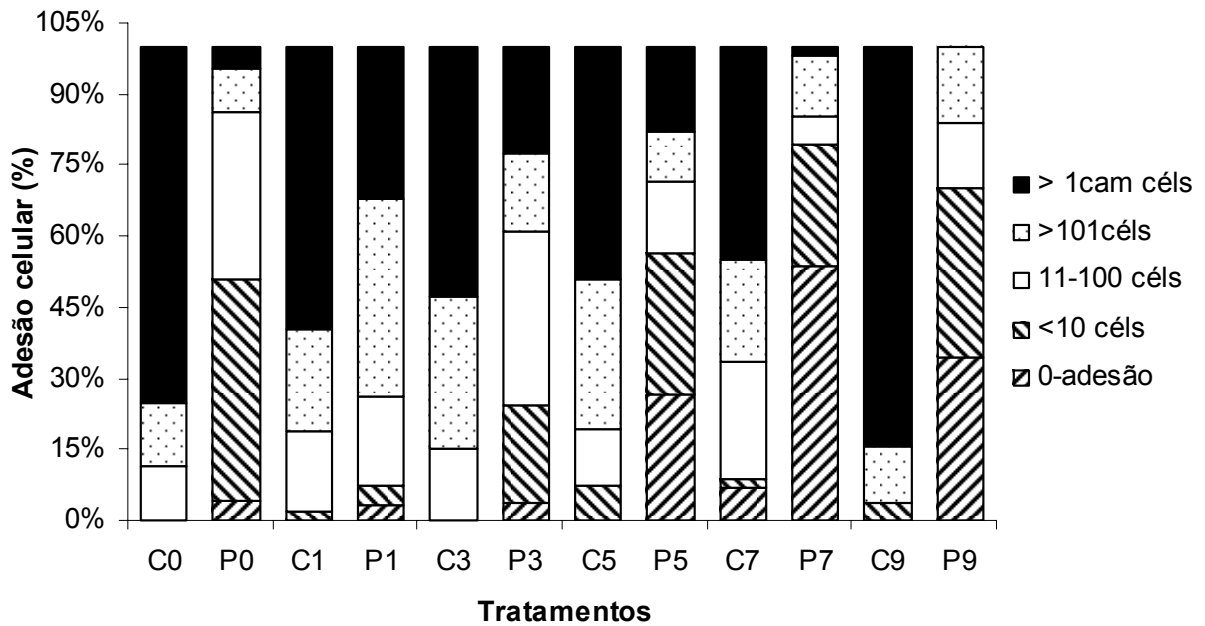


Figura 9 - Adesão celular (%) nas esferas de sephadex separadas pelos critérios de adesão (0, sem adesão; < 10 células; entre 11 a 100 células; >101 células e > 1 camada celular) em lagartas de *D. saccharalis*, tanto em lagartas parasitadas por *C. flavipes* (P), como em lagartas controle (C), nos tempos de avaliação, 0, 1, 3, 5, 7, 9 dias

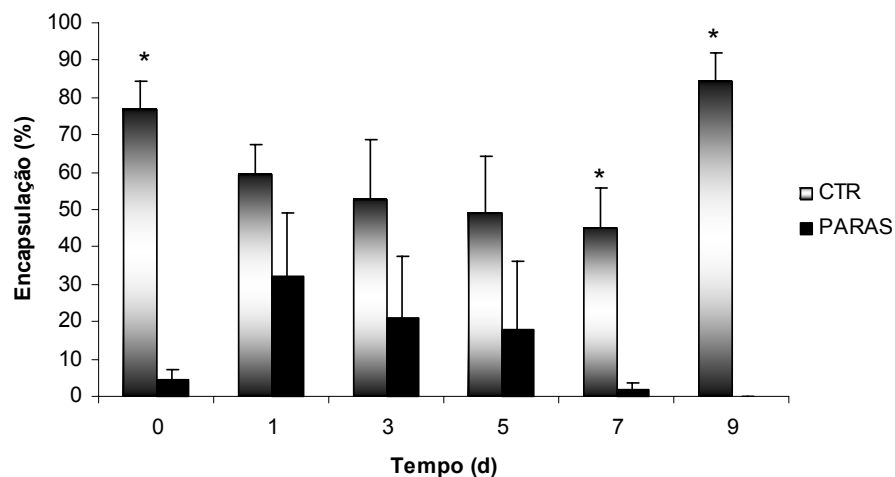


Figura 10 - Esferas de Sephadex consideradas encapsuladas, com número superior ou igual a 1 camada de células aderidas, em lagartas de *D. saccharalis* controle e parasitadas por *C. flavipes* nos diferentes intervalos de avaliação, 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias (* Indica diferença significativa pelo teste Mann-Witney Rank Sum, P<0,05)

4.2.3 Atividade das fenoloxidasas

O parasitismo afetou a atividade das fenoloxidasas do hospedeiro principalmente no final do desenvolvimento imaturo do parasitóide (Fig. 11). A atividade enzimática encontrada em lagartas controle e parasitadas durante o período inicial e intermediário do parasitismo foram semelhantes, apesar da tendência de menor atividade dessa enzima nas lagartas parasitadas após 24 h do parasitismo (Fig. 11A). Ao contrário do observado no início do parasitismo, a atividade das fenoloxidasas em lagartas parasitadas três dias após o parasitismo foi ligeiramente superior à do controle (Fig. 11B). A maior atividade dessas enzimas em insetos parasitados pode ser evidenciada em insetos nove dias após o parasitismo, quando a atividade das fenoloxidasas foi cerca de seis vezes superior à do controle (Fig. 11E)

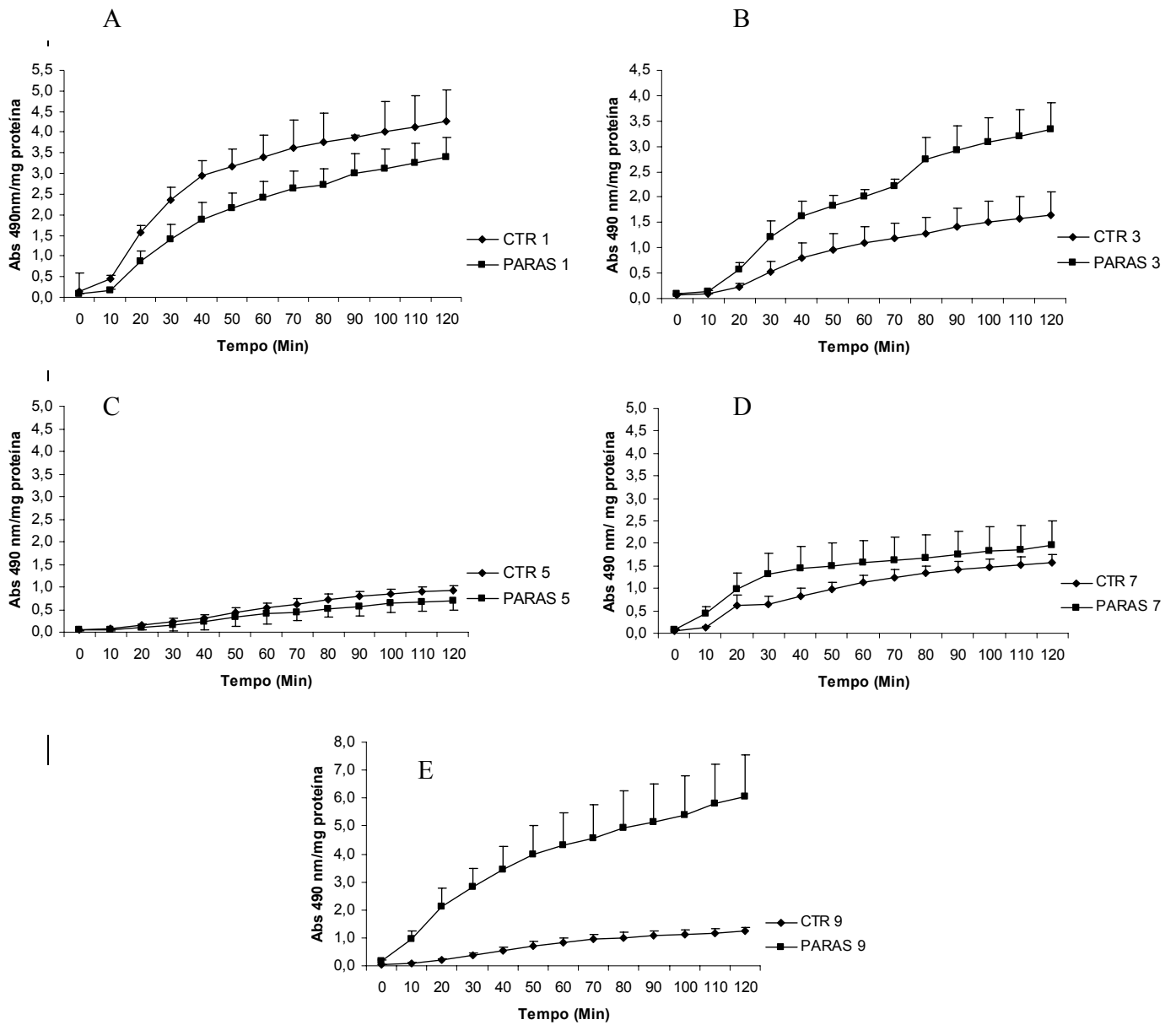


Figura 11 - Ativação da profenoloxidase medida em absorbância a 490nm, por mg de proteína, em função do tempo (de 0 a 120 minutos) na hemolinfa de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* (PARAS) e controle (CTR). Nos tempos de avaliação considerados; 1(A), 3(B), 5(C), 7(D) e 9(E) dias

4.2.4 Dosagem de óxido nítrico

O parasitismo induziu alterações significativas nos níveis de óxido nítrico em lagartas parasitadas, tanto na fração celular (Fig. 12A) quanto no plasma (Fig. 12B). No entanto, diferenças significativas na concentração desse composto foram verificadas apenas nas 24 h iniciais após parasitismo, sendo a concentração dessa molécula cerca de três vezes superior no inseto parasitado em relação ao controle.

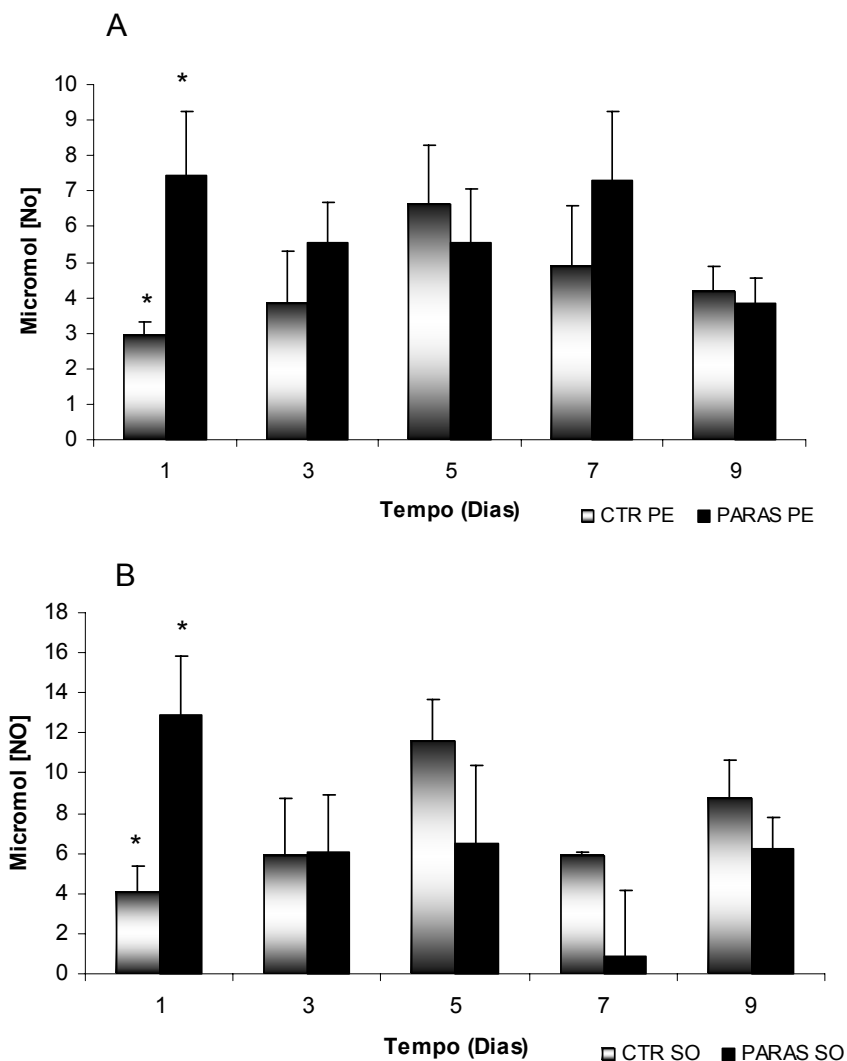


Figura 12 - Concentração de óxido nítrico (mM) na fração celular (A) e no plasma (B) da hemolinfa ao longo do desenvolvimento de lagartas de último instar de *D. saccharalis* (1, 3, 5, 7 e 9 dias) controle (CTR) e parasitadas por *C. flavipes*. So= Sobrenadante (plasma); Pe= Pellet (fração celular) (* Indica diferença significativa pelo teste Mann-Witney Rank Sum, $P < 0,05$)

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeitos das secreções associadas ao aparelho reprodutor de fêmeas de *C. flavipes* no crescimento e desenvolvimento de *D. saccharalis*

Os mecanismos de ação e as funções dos diferentes fatores maternos relacionados à regulação do desenvolvimento do hospedeiro foram elucidados para vários sistemas hospedeiro-parasitóide. Especialmente em parasitóides braconídeos, o polidnavírus e o veneno são fatores importantes na regulação do hospedeiro durante os estágios iniciais do parasitismo (TANAKA; VINSON, 1991b; MARRIS et al., 2001).

O efeito observado da injeção do vírus mais fluidos do cálice associado ou não à injeção de veneno de *C. flavipes*, que resultou no prolongamento do desenvolvimento e ganho de peso de lagartas do hospedeiro *D. saccharalis* também foi relatado em diversas outras associações hospedeiro-parasitóide (DUSHAY; BECKAGE, 1993; DOUCET; CUSSON, 1996ab; GUPTA; FERKOVICH, 1998; NAKAMATSU; GYOTOKU; TANAKA, 2000; NUSSBAUMER; STRADNER; SCHOPF, 2002). Hospedeiros injetados com fluidos do cálice e vírus estenderam seu desenvolvimento até a fase de pré-pupa, quando interromperam seu desenvolvimento, não iniciando o processo de metamorfose, apesar de que alguns hospedeiros formaram intermediários de larva-pupa. A formação de intermediários em hospedeiros injetados com as substâncias isoladas do parasitóide indica possível deficiência do método de injeção, já que lagartas parasitadas por fêmeas estéreis, onde apenas os fluidos do cálice, vírus e veneno atuaram no hospedeiro, não conseguem iniciar o processo metamórfico (DUSHAY; BECKAGE, 1993; DOUCET; CUSSON, 1996ab).

Como injeções isoladas do veneno de *C. flavipes* não produziram efeito no desenvolvimento do hospedeiro, o prolongamento e interrupção do desenvolvimento observados em *D. saccharalis* são produzidos por substâncias presentes nos fluidos do cálice ou pelo vírus, de forma semelhante àquela relatada por Doucet e Cusson (1996ab) e Nakamatsu, Gytoku e Tanaka (2000). Apesar de não ter sido observado nenhum efeito aditivo do veneno aos efeitos observados no desenvolvimento do hospedeiro após a injeção de fluidos do cálice+vírus, o veneno pode desempenhar

papel importante em outros processos da regulação hospedeira ou mesmo do desenvolvimento do parasitóide, já que há evidências de que componentes associados a ele podem ser necessários para garantir a eclosão de larvas do parasitóide (NUSSBAUMER; STRADNER; SCHOPF, 2002). Lagartas injetadas com fluido do cálice e veneno também apresentam, em alguns casos, aumento no consumo de alimento, com baixa eficiência de conversão e alta digestibilidade, ou seja, os nutrientes digeridos, mesmo presentes na hemolinfa, não seriam incorporados pelo hospedeiro (NAKAMATSU; GYOTOKU, TANAKA, 2000).

Os efeitos observados no desenvolvimento de hospedeiros parasitados são normalmente relacionados à atividade dos componentes injetados pela fêmea parasitóide, os quais interferem com o sistema endócrino do hospedeiro, interrompendo seu desenvolvimento e o processo de metamorfose. A interferência com o sistema endócrino pode ocorrer tanto no processo de síntese, degradação ou disponibilização dos hormônios do desenvolvimento, como os ecdisteróides e o hormônio juvenil (DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996; GROSSNIKLAUS-BÜRGIN et al., 1998; KHAFASI; HEGAZI, 2001; SCHAFELLNER et al., 2004). Assim, parasitóides podem prolongar o desenvolvimento ou interromper a metamorfose após inativação dos ecdisteróides do hospedeiro através da sua glicosilação (PENNACHIO; MALVA, VINSON, 2001; TANAKA, VINSON, 1991a), inibição da síntese de ecdisteróides pela inativação das glândulas protorácicas (BECKAGE; BURON, 1993; CUSSON et al., 2001), estimulação da síntese ou inibição da ação das esterases que degradam o hormônio juvenil (DUSHAY; BECKAGE, 1993).

Dos componentes injetados pelas fêmeas do parasitóide no hospedeiro no momento do parasitismo, as secreções do fluido do cálice+PDV são as mais comumente relatadas afetando o balanço hormonal de hospedeiros de parasitóides cenobiontes, enquanto o veneno exerce maior controle sobre a biologia de hospedeiros de idiobiontes (COUDRON; KELLY; PUTTLER, 1990; DUSHAY; BECKAGE, 1993; ALLEYNE; BECKAGE, 1997; WANI et al., 1997; KNOP-WRIGHT; COUDRON; BRANDT, 2001; MARRIS et al., 2001). Em cenobiontes, essa secreção parece estar envolvida na inativação das glândulas protorácicas, dada pela infecção das células pelos PDVs, limitando a disponibilização de ecdisteróides (DOVER et al., 1987,

DOVER, DAVIES, VINSON, 1988a; DOVER, DAVIES, VINSON, 1988b). No entanto, também não pode ser descartado o efeito que essa secreção pode exercer nos níveis de transcrição gênica, que levam à manutenção do hormônio juvenil em circulação, dada à inibição das HJ esterases (SCHOPF; REMBOLD, 1993; DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996; GROSSNIKLAUS-BÜRGIN et al., 1998).

Assim, como dados preliminares dos níveis e hormônio juvenil em lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* não indicaram qualquer alteração, é possível que esse parasitóide interrompa o início do processo de metamorfose pela ação do vírus desse inimigo natural sobre as glândulas protorácicas do hospedeiro (CÔNSOLI; HOFFMAN - dados não publicados).

5.2 Resposta celular

As alterações na capacidade de resposta imune celular observadas em insetos parasitados por *C. flavipes* podem estar relacionadas ao efeito que as secreções maternas exercem sobre as células de defesa do hospedeiro, assim como observado para várias espécies de inimigos naturais (SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001; HU; ZHU; FU, 2003; GLATZ; ASGARI; SCHMIDT, 2004). Essas substâncias parecem induzir alterações que levam a resposta estágio-específica, visto que o número total de hemócitos disponíveis no hospedeiro e a sua capacidade de encapsulação diferiu ao longo do parasitismo.

A redução observada na capacidade de encapsulação em lagartas parasitadas logo após o parasitismo não foi acompanhada pela redução no número de hemócitos, comumente relatada para outras associações hospedeiro-*Cotesia* spp. (DAVIES; STRAND; VINSON, 1987; GUZO; STOLTZ, 1987; TERAMOTO; TANAKA, 2004; IBRAHIM; KIM, 2006), sugerindo a existência de outros mecanismos de defesa ou de interferência nessa via de defesa do hospedeiro.

Parasitóides podem evitar a encapsulação pelo hospedeiro devido à existência de uma camada de fibras recobrimo o ovo do parasitóide, a qual impede o seu reconhecimento e/ou a adesão dos hemócitos (DAVIES; VINSON, 1986; HU; ZHU; FU,

2003). No entanto, estudos ultra-estruturais do aparelho reprodutor feminino de *C. flavipes* não indicaram a existência de tal camada recobrimdo ovos maduros, depositados no cálice de fêmeas desse parasitóide (CÔNSOLI; KITAJIMA, 2006). Assim, *C. flavipes* pode evitar a encapsulação de seus ovos ao interferir em outros processos, como na capacidade de dispersão e adesão de hemócitos, dadas as alterações induzidas no citoesqueleto celular de actina dessas células (TERAMOTO; TANAKA, 2004; NALINI; KIM, 2007).

As alterações no citoesqueleto celular dos hemócitos, que levam à redução na capacidade de resposta dessas células, se devem à ação de proteínas produzidas pelo vírus simbiotes associados a esses inimigos naturais (LI; WEBB, 1994; LE et al., 2003; KROEMER; WEBB, 2004; TERAMOTO; TANAKA, 2004; TURNBULL et al., 2004; NALINI; KIM, 2007). Em muitas associações, o vírus age conjuntamente com o veneno na supressão da resposta celular, sendo o vírus responsável pela indução de apoptose celular e o veneno pelo declínio inicial na população de hemócitos (TERAMOTO; TANAKA, 2004).

O PDV é claramente necessário na proteção do ovo do parasitóide. Fatores adicionais introduzidos no hospedeiro durante a oviposição, como o veneno e proteínas ovarianas também podem ser necessários em algumas espécies, especialmente nos estágios iniciais, antes dos genes virais serem expressos. O veneno sozinho, para espécies que não apresentam PDV, mostrou não afetar a encapsulação, enquanto que as proteínas ovarianas e a mistura de proteínas mais veneno foram capazes de afetar significativamente a resposta (TANAKA, 1987; WEBB; LUCKHART, 1994; LAVINE; BECKAGE, 1996; LI et al., 2007).

Em outros casos, o parasitismo pode ainda afetar a resposta de encapsulação através da indução de alterações no padrão protéico do plasma de lagartas parasitadas, induzindo a síntese de novas proteínas ou regulando os níveis de proteínas normalmente expressas pelo hospedeiro sadio, contribuindo, conseqüentemente, para a supressão da resposta imune (RICHARDS; EDWARDS, 2002; AMAYA et al., 2005).

A recuperação da capacidade de encapsulação de lagartas parasitadas após 24 h do parasitismo e a manutenção de níveis compatíveis ao do controle até 7 dias após o parasitismo sugerem que o parasitóide permite ao hospedeiro a manutenção de certa

capacidade de defesa, visando, provavelmente, a assepsia do seu ambiente de desenvolvimento (VINSON, 1971). A drástica redução na capacidade de encapsulação ao final do parasitismo é acompanhada de redução no número total de hemócitos, que tem seu início marcado pelo início da fase larval de desenvolvimento do parasitóide. Assim como discutido anteriormente, *C. flavipes* eclode após 72 h de desenvolvimento no hospedeiro e a redução no número de hemócitos encontrada após 5 dias do parasitismo indica que a fase larval do parasitóide poderia ser suscetível ao ataque do sistema imune do hospedeiro, havendo, assim, necessidade de regulação tardia do mesmo. Alterações na resposta imune tardia podem ser causadas por secreções protéicas derivadas dos teratócitos (células oriundas da dissociação da serosa do embrião do parasitóide), as quais são liberadas na hemocele do hospedeiro e inibem a encapsulação e interferem na atividade das fenoloxidasas (KITANO et al., 1990; BURON; BECKAGE, 1997; BELL et al., 2004).

O fato de que larvas injetadas com as secreções associadas ao aparato reprodutor da fêmea ainda assim apresentaram certa resposta de encapsulação, sugere que o parasitóide *C. flavipes* apresenta características adicionais que levam à completa inibição da encapsulação. Esse fato é sustentado por observações de que hospedeiros parasitados por fêmeas estéreis, as quais injetam suas secreções em concentrações normais, também inibiram a encapsulação do inimigo natural sem, no entanto, suprimir a resposta imune geral do hospedeiro (STETTLER et al., 1998).

Em resumo, os fatores responsáveis pela supressão podem ser principalmente os vírus simbiotes, que atuam em conjunto com o veneno, fatores ligados ao embrião em desenvolvimento e teratócitos que provocam, sozinhos ou em conjunto, alterações drásticas na parede celular dos hemócitos (NALINI; KIM, 2007), evitam o reconhecimento da larva do parasitóide como organismo estranho (DAVIES; VINSON, 1986; STETTLER et al., 1998) e secretam proteínas na hemolinfa do hospedeiro (KITANO; WAGO; ARAKAWA, 1990).

5.3 Resposta humoral

A fenoloxidase (PO) é uma enzima multifuncional que hidrolisa monofenóis a difenóis e oxida difenóis a quinona durante o processo de esclerotização da cutícula, tendo papel importante em vários mecanismos de defesa imune, como a biossíntese de melanina, freqüentemente observada ao redor de agregados de hemócitos e parasitas encapsulados. As POs são sintetizadas como zimógenos chamados de pró-fenoloxidases (proPO), os quais são ativados por proteólise. A ativação da proPO pode ser provocada, por exemplo, por componentes da superfície celular de agentes microbianos, como os peptidoglicanos e os lipopolissacarídeos, indicando haver o reconhecimento específico de estímulos que provocam a ativação dessa via (HOPKINS; KRAMER, 1992; SUGUMARAM; KANOST, 1993; JIANG et al., 1997).

A redução do nível de melanização em insetos parasitados tem sido atribuída à redução na atividade da fenoloxidase, provocada principalmente através da introdução de fatores maternos do parasitóide no momento da oviposição. Em estudos recentes, proteínas do veneno (Vn 50) de *C. rubecula* e uma proteína (Egf 1.0) produzida pelo bracovírus de *M. demolitor* foram isoladas. A Vn 50 foi capaz de bloquear a melanização de seu hospedeiro, reduzindo a ativação da proPO e permanecendo em altas concentrações por até 72 h. A proteína Egf 1.0, também relacionada à inibição da cascata enzimática que leva a produção da PO, teria como alvo enzimático a proteinase responsável pela ativação da PO (SHELBY et al., 2000; ASGARI et al., 2003; ZHANG et al., 2004; BECK; STRAND, 2007).

Apesar de muitos inimigos naturais reduzirem a atividade das POs por dias consecutivos após o parasitismo, no sistema *D. saccharalis* - *C. flavipes* a atividade dessa enzima foi reduzida apenas no primeiro dia após o parasitismo, sendo que insetos parasitados recuperaram a atividade das POs no período subsequente. A redução na atividade das POs apenas no início do parasitismo também é observada em outras associações hospedeiro-parasitóide, envolvendo parasitóides em Ichneumonidae (SHELBY et al., 2000; BECK; THEOPOLD; SCHMIDT, 2000) e Braconidae (ASGARI et al., 2003). A queda na atividade das POs logo após o parasitismo pode ser decorrente da presença de inibidores enzimáticos no fluido do cálice ou da presença de proteínas no veneno que venham a interferir na cascata proteolítica que leva à ativação da

enzima (SHELBY et al., 2000; BECK; THEOPOLD; SCHMIDT, 2000; ASGARI et al., 2003). A redução dos níveis de PO na hemolinfa de hospedeiros parasitados logo após o parasitismo é normalmente relacionada à regulação do sistema imune do hospedeiro para evitar a participação dessa enzima no processo de encapsulação do invasor (ovo do parasitóide). Porém, sua redução nesse estágio de desenvolvimento também pode estar envolvida com o processo de invasão do hospedeiro pelo vírus simbiote associado ao parasitóide, já que as fenoloxidasas podem agir de forma constitutiva na resposta humoral inata contra vírus em insetos (POPHAM et al., 2004).

Um aspecto da regulação da atividade dessa enzima que parece singular à associação *D. saccharalis* - *C. flavipes* é a maior atividade das POs observadas em insetos parasitados nos 3^o e 9^o dias após o parasitismo, apesar de serem inexistentes dados sobre a atividade dessa enzima ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento do inimigo natural. A maior atividade dessa enzima nos períodos mencionados nos insetos parasitados corresponde a eventos marcantes no desenvolvimento do inimigo natural. Nas condições do estudo em questão, o terceiro dia após o parasitismo corresponde ao período de eclosão do parasitóide, enquanto o nono marca o final de seu desenvolvimento interno, muito próximo à sua egressão do corpo do hospedeiro para pupação (CÔNSOLI - dados não-publicados). Dessa forma, é possível que a maior atividade das POs em hospedeiros parasitados no terceiro dia após o parasitismo seja decorrente da ativação das POs pelas enzimas digestivas secretadas pelas larvas recém-eclodidas de *C. flavipes*, assim como demonstrado para as enzimas produzidas por alguns endo (MULLEN; GOLDSWORTHY, 2006) e ectoparasitóides (PARKINSON; WEAVER, 1999). Já o aumento no período final do parasitismo pode estar relacionado à contaminação da hemocele do hospedeiro por agentes microbianos, provavelmente devido aos danos mecânicos induzidos ao tubo digestivo e tegumento do hospedeiro pela alimentação das larvas e perfuração do tegumento do hospedeiro relativo ao seu comportamento de abandono da cavidade hemocélica, visto que a ocorrência de micróbios altera a atividade endógena das POs (MULLEN; GOLDSWORTHY, 2006; ABT; RIVERS, 2007; BAILEY; ZUK, 2008).

Alterações em processos relacionados à resposta imune podem refletir no redirecionamento dos mecanismos de defesa do sistema imune de um organismo,

como forma de resistência a uma mudança na capacidade imune, e que podem ser temporariamente flexíveis durante a infecção (BRAUDE; TANG; TAYLOR, 1999; ADAMO, 2004). Essas alterações em processos particulares também podem ocorrer em detrimento da atividade de outros processos envolvidos no mecanismo de defesa imune, como, por exemplo, a redução na produção de lisozimas com o subsequente aumento da atividade das POs (MULLEN; GOLDSWORTHY, 2006; BAILEY; ZUK, 2008).

Ainda há a possibilidade de que a elevação na concentração enzimática de PO na hemolinfa de lagartas parasitadas seja devido à produção desse fator pelo próprio parasitóide, já que o veneno de muitas espécies de parasitóides contém múltiplos tipos de enzimas. No entanto, para que essa elevação na atividade de PO fosse associada ao veneno, seria de se esperar que alterações na atividade enzimática fossem detectadas logo após o parasitismo. Além disso, é reduzido o número de inimigos naturais que apresentam veneno com atividade de PO (PARKINSON; WEAVER, 1999; ABT; RIVERS, 2007). O veneno também poderia induzir a maior atividade de PO de forma indireta, através de sua ação sobre os hemócitos, que se rompem quando expostos ao veneno de parasitóides e liberam a enzima para o meio, aumentando, conseqüentemente, a concentração de profenoloxidase na hemolinfa. No entanto, esse efeito indireto é observado apenas para o veneno de ectoparasitóides que induzem paralisia em seu hospedeiro (HARTZER; ZHU; BAKER, 2005).

Possivelmente, *C. flavipes* deve utilizar outras vias de regulação para evitar que seu estágio larval seja atacado pelo sistema imune do hospedeiro, permitindo, dessa forma, o desenvolvimento de seus imaturos em *D. saccharalis*. Além disso, um aumento no nível de PO pode ser benéfico para o parasitóide, pois permite a manutenção parcial da capacidade de defesa imune do hospedeiro, protegendo-o contra outros agentes patogênicos invasores (HAGSTRUM; SMITTLE, 1978; HAGSTRUM, 1983, BECKAGE et al., 1990).

Outro fator importante que participa da resposta imune do hospedeiro contra invasores é a produção enzimática de óxido nítrico (NO), o qual pode atuar em diversos processos fisiológicos, muitos dos quais relevantes ao entendimento dos mecanismos relacionados ao processo de defesa imune (WEISKE; WIESNER, 1999). A maior

atividade de NO encontrada, tanto na porção celular quanto no plasma de hospedeiros parasitados nas primeiras 24h após o parasitismo, indicam a utilização de mecanismos de regulação nesse processo fisiológico buscando garantir a invasão e colonização do hospedeiro, principalmente o estabelecimento das partículas virais simbiotes associadas a esse inimigo natural. O NO exerce função diversificada em vários processos fisiológicos e patofisiológicos, sendo essenciais no estabelecimento de uma variedade de infecções microbianas. Apesar de sua reconhecida atividade antimicrobiana contra bactérias e protozoários, o NO parece ter efeito oposto aos vírus, sendo essencial no estabelecimento de inúmeras viroses. Além do seu efeito no processo de infecção por vírus, o NO também pode afetar a resposta imune celular, dado que a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) para a produção de NO acarreta na produção de espécies de óxido de nitrogênio reativas, como o peroxinitrito, que causam danos aos tecidos devido à ação oxidativa e reações de nitratação de várias biomoléculas (AKAIKE; MAEDA, 2000; BOGDAN, 2001).

A participação do NO como parte essencial do arsenal citotóxico de insetos no combate a agentes estranhos já havia sido observada em *Drosophila* parasitadas por *Leptopilina boulardi* e *Rhodnius prolixus* incubados com *Trypanosoma rangeli*, os quais, de forma semelhante a *D. saccharalis*-*C. flavipes*, apresentaram aumento nos níveis de NO apenas nos estágios iniciais do parasitismo (NAPPI et al., 2000; WHITTEN et al., 2001; FARALDO et al., 2005; WHITTEN et al., 2007).

As análises bioquímicas da hemolinfa de *D. saccharalis* evidenciaram a tentativa do hospedeiro em evitar o ataque do parasitóide, através da utilização do arsenal tóxico que as células de defesa são capazes de produzir. Porém, mesmo com a elevação da produção da enzima fenoloxidase ao longo do desenvolvimento, como de óxido nítrico no início do parasitismo, o parasitóide *C. flavipes* foi bem sucedido na exploração dos recursos nutricionais e na utilização do hospedeiro. Os meios pelos quais esse parasitóide consegue ultrapassar as barreiras impostas pelo seu hospedeiro, com a ajuda das secreções maternas, ainda constituem um campo a ser explorado.

6 CONCLUSÕES

- ❖ O vírus simbiote mais fluido do cálice em associação com o veneno afeta o desenvolvimento e crescimento de lagartas de *Diatraea saccharalis*;
- ❖ O veneno, sozinho, não influencia o crescimento do hospedeiro, mas induz alterações no desenvolvimento, resultando na deformação de pupas;
- ❖ *Cotesia flavipes* suprime a resposta imune do hospedeiro *Diatraea saccharalis* afetando sua resposta celular e resposta humoral.

REFERÊNCIAS

- ABT, M.; RIVERS, D.B. Characterization of phenoloxidase activity in venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 94, n. 2, p. 108-118, 2007.
- ADAMO, S.A. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? **Animal Behaviour**, London, v. 68, n. 6, p. 1443-1449, 2004.
- AKAIKE, T.; MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 300-308, 2000.
- ALLEYNE, M.; BECKAGE, N.E. Parasitism - induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, n. 4, p. 407-424, 1997.
- ALLEYNE, M.; WIEDENMANN, R.N. Suitability of lepidopteran stemborers for parasitization by novel- association endoparasitoids. **BioControl**, Dordrecht, v. 46, n.1, p. 1-23, 2001.
- ALLEYNE, M.; WIEDENMANN, R.N.; DIAZ, R.R. Quantification and development of teratocytes in novel-association host-parasitoid combinations. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n. 12, p. 1419-1427, 2001.
- AMAYA, K.E.; ASGARI, S.; JUNG, R.; HONGSKULA, M. Parasitization of *Manduca sexta* larva by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 51, n. 5, p. 505-512, 2005.
- ARMSTRONG, P.B. Humoral immunity in long-lived arthropods. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, n. 1, p.53-64, 1996.
- ASGARI, S. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interaction. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 61, n. 3, p. 146-156, 2006. Disponível em:< <http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 10 jan. 2007.
- ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 40, n. 9, p. 789-795, 1994.
- ASGARI, S.; ZHANG, G.; ZAREIE, R.; SCHMIDT, O. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, n. 10, p.1017-1024, 2003.

ASHIDA, M.; DOHKE, K. Activation of prophenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry**, London, v. 10, p. 37–47, 1980.

BAILEY, N W.; ZUK, M. Changes in immune effort of male field crickets infested with mobile parasitoid larvae. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, n. 1, p. 96–104, 2008.

BECK, M.H.; STRAND, M.R. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 49, p. 19267–19272, 2007.

BECK, M.H.; THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 46, n. 9, p.1275–1283, 2000.

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

_____. Parasitoids and polydnaviruses. **BioScience**, Washington, v. 48, n. 4, p. 305–311, 1998.

BECKAGE, N.E.; BURON, DE I. Lack of prothoracic gland degeneration in developmentally arrested host larvae of *Manduca sexta* parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 61, p. 103-106, 1993.

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.; TAN, F.F.; SCHLEIFER, K.W.; LANE, R.D.; CHERUBIN, L.L. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 26, n. 2/3, p. 165–195, 1994. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 05 mar. 2006.

BECKAGE, N.E.; METCALF, J.S.; NES, D.J.; SCHLEIFER, K.W.; ZETLAN, S.R.; BURON, I DE. Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnavirus. **Insect Biochemistry**, London, v. 20, n. 3, p. 285-294, 1990.

BELL, H.A.; KIRKBRIDE - SMITH, A.E.; MARRIS, G. C.; EDWARDS, J.P. Teratocytes of the solitary endoparasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae): morphology, numbers and possible functions. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 335–343, 2004.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S.(Ed.). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 25 p. 409-423.

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

BRAUDE, S.; TANG-MARTINEZ, Z.; TAYLOR, G.T. Stress, testosterone, and the immuno redistribution hypothesis. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 10, n. 3, p. 345–350, 1999.

BRODEUR, J.; BOIVIN, G. Functional ecology of immature parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 27- 49, 2004.

BURON, I. de; BECKAGE, N.E. Developmental changes in teratocytes of de braconid wasp *Cotesia congregata* in larvae of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, n. 10, p. 915-930, 1997.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, p. 116-126, 2004.

CHAPMAN, R.F. The insects (structure and function).In: _____. **Circulatory system, blood and immune systems**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. chap. 5, p. 95-131.

COLE, T.J.; BECKAGE, N.E.; TAN, F.F.; SRINIVASAN, A.; RAMASWAMY, S. B. Parasitoid host endocrine relations: self-reliance or co-optation? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 12, p.1673–1679, 2002.

CÔNSOLI, F. L.; KITAJIMA, E.W. Symbiofauna associated to the reproductive system of *Cotesia flavipes* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Sao Paulo, v. 23, p. 463-470, 2006.

CÔNSOLI, F.L.; VINSON, S.B. Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera, Braconidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 137B, n.4, p. 463-473, 2004.

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**, Oxford, v.142B, n. 2, p.181-191, 2005.

COUDRON, T.A.; KELLY, T.J.; PUTTLER, B. Developmental responses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to parasitism by the ectoparasite *Euplectrus plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 1/2, p. 83–94, 1990. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 25 mar. 2008.

CUSSON, M.; BELIVEAU, C.; LAFORGE, M.; BELLEMARE, G.; LEVASSEUR, A.; STOLTZ, D. Hormonal alterations and molecular mechanisms underlying the induction of host developmental arrest by endoparasitic wasps. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 6 p. 111–121

DAHLMAN, D.L. Teratocytes and host/parasitoid interactions. **Biological Control**, Orlando, v. 1, n. 2, p. 118-126, 1991.

DAHLMAN, D.L.; VINSON, S.B. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERIC, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. chap. 7 v.1, p.145-165.

DAVIES, D.H.; VINSON, S.B. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation *in vitro* by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 32, n. 12, p. 1003-1010, 1986.

DAVIES, D.H.; STRAND, M.R.; VINSON, S.B. Changes in differential haemocyte count and *in vitro* behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 33, n. 3, p. 143-153, 1987.

DONG, K.; ZHANG, D.; 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, n. 2, p. 237-248, 1996.

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, n. 1, p. 21-30, 1996a.

_____. Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 114A, n. 4, p. 311-317, 1996b.

DOVER, B.A.; DAVIES, D.H.; VINSON, S.B. Degeneration of last instar *Heliothis virescens* prothoracic glands by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 51, n.1, p. 80–91, 1988a.

_____. Dose-dependent influence of *Campoletis sonorensis* polydnavirus on the development and ecdysteroid titers of last-instar *Heliothis virescens* larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 8, n.2, p.113–26, 1988b.
Disponível em: < <http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

DOVER, B.A.; DAVIES, D.H.; STRAND, M.R.; GRAY, R.S.; KEELEY, L.L.; VINSON, S.B. Ecdysteroid-titre reduction and developmental arrest of last-instar *Heliothis virescens* larvae by calyx fluid from the parasitoid *Campoletis sonorensis*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 33, n. 5, p. 333-338, 1987

DUSHAY, M.S.; BECKAGE, N.E. Dose dependent separation of *Cotesia congregata*-associated polydnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 39, n. 12, p. 1029–1040, 1993.

EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. 314 p.

EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J.; MARRIS, G.C. Endocrine changes in lepidopteran larvae: potential challenges to parasitoid development and survival. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 1 p. 1-32.

FANG, F.C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 99, n. 12, p. 43-50, 1997.

FARALDO, A.C.; NUNES, A.S.; FACCIOLI, L.H.; DEL BEL, E.A.; LELLO, E. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 13, n. 4, p. 240-246, 2005.

GABIG, T.G.; BABIOR, B.M. The killing of pathogens by phagocytes. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v, 32, p. 313-326, 1981.

GILBERT, L.I.; GRANGER, N.A.; ROE, R.M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 8/9, p. 617-644, 2000.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEC, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 42, p. 611-643, 1997.

GLATZ, R.V.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 12, p. 545-554, 2004.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: behavioural and evolutionary ecology**. New Jersey: Princeton University Press, 1994. 473 p.

GREEN, L.C.; LUZURIAGA, K.R.; WAGNER, D.A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GROSSNIKLAUS-BÜRGIN, C.; PFISTER-WILHELM, R.; MEYER, V.; TREIBLMAYR, K. LANZREIN, B. Physiological and endocrine changes associated with polydnavirus/venom in the parasitoid–host system *Chelonus inanitus*-*Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 3/4, p. 305–321, 1998.

GUPTA, A.P. **Insect hemocytes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979.

GUPTA, P.; FERKOVICH, S.M. Interaction of calyx fluid and venom from *Microplitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Heliocoverpa zea*, and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 9, p. 713–719, 1998.

GUZO, D.; STOLTZ, D.B. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 33, n. 1, p. 19-31, 1987.

HAGSTRUM, D.W. Self-provisioning with paralyzed hosts and age, density, and concealment of hosts as factors influencing parasitization of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 12, n. 6, p. 1727–1732, 1983.

HAGSTRUM, D.W.; SMITTLE, B.J. Host utilization by *Bracon hebetor*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 596–600, 1978.

HARTZER, K.L.; ZHU, K.Y.; BAKER, J.E. Phenoloxidase in larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 59, n. 2, p. 67–79, 2005. Disponível em: < <http://www.interscience.wiley.com> >. Acesso em: 20 abr. 2008.

HARVEY, J.A. *Venturia canescens* parasitizing *Galleria mellonella* and *Anagasta kuehniella*: Is the parasitoid conformer or regulator? **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, n.11/12, p. 1017-1025, 1996.

HAYAKAWA, Y.; YAZAKI, K. Envelope protein of parasitic wasp symbiont virus, polydnavirus, protects the wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 246, n. 3, p. 820-826, 1997.

- HOPKINS, T.; KRAMER, K. Insect cuticle sclerization. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 71-93, 1992.
- HOTTA, M.; OKUDA, T.; TANAKA, T. *Cotesia kariyai* teratocytes: growth and development. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n.1, p. 31-41, 2001.
- HU, J.; ZHU, X.; FU, W. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guene'e (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 49, n. 4, p. 367–375, 2003.
- IBRAHIM, A.M.A; KIM, Y. Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 52, n. 9, p. 943–950, 2006.
- IWAMA, R.; ASHIDA, M. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry**, London, v. 16, n. 3, p. 547–555, 1986.
- JIANG, H.; WANG, Y.; CONGCONG, M.A.C.; KANOST, M.R. Subunit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO–P1. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 835–850, 1997.
- JONES, D. Endocrine interaction between host (Lepidoptera) and parasite (Hymenoptera: Cheloniinae). Is the host or the parasite in control? **Annals of the Entomological Society of América**, College Park, v. 78, n. 2, p.141–148, 1985.
- KADONO-OKUDA, K.; WEYDA, F.; OKUDA, T. *Dinocampus (=Perilitus) coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 11, p.1073-1080, 1998.
- KHAFAGI, W.E.; HEGAZI, E.M. Effects of juvenile hormones and precocenes on the immune response of *Spodoptera littoralis* larvae to supernumerary larvae of the solitary parasitoid, *Microplitis rufiventris* Kok. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n. 11, p. 1249–1259, 2001.
- KITANO, H.; WAGO, H.; ARAKAWA, T. Possible role of teratocytes of the gregarious parasitoid, *Cotesia (=Apanteles) glomerata* in the suppression of phenoloxidase activity in the larval host, *Pieris rapae crucivora*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 3/4, p.177-185, 1990. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 08 ago. 2007.

- KNOP-WRIGHT, M.; COUDRON, T.A.; BRANDT, S.L. Ecological and physiological relevance of biochemical changes in a host as a result of parasitism by *Euplectrus* spp.: a case study. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 9, p. 153–176.
- KROEMER, J.A.; WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 431–456, 2004.
- LACKIE, A.M. Hemocyte behaviour. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 21, p. 85–178, 1988.
- LAVINE, M.D.; BECKAGE, N.E. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, n. 1, p. 41–51, 1996.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n. 9, p. 965–974, 2001.
- _____. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1295–1309, 2002.
- LAWRENCE, P.O. Host-parasite hormonal interaction: an overview. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 32, n. 4, p. 295–298, 1986.
- LE, N.T.; ASGARI, S.; AMAYA, K.; TAN, F.F.; BECKAGE, N.E. Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 49, n. 5, p. 533–543, 2003.
- LI, X.; WEBB, B.A. Apparent functional role for a cysteine rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response, **Journal of virology**, Washington, v. 68, n. 11, p.7482–7489, 1994.
- LI, Y.; LU, J.; FENG, C.; KE, X.; FU, W. Role of venom and ovarian proteins in immune suppression of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid. **Insect Science**, Elmsford, v. 14, n. 2, p. 93–100, 2007.
- MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R.; MAGRINI, E.A. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**: manual de instrução. Piracicaba: IAA, Planalsucar, 1983. 22 p.

- MAITI, I.B.; DEY, N.; PATTANAIK, S.; DAHLMAN, D.L.; RANA, R.L.; WEBB, B.A. Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). **Plant Biotechnology Journal**, Sheffield, v.1, n. 3, p. 209-219, 2003.
- MARRIS, G.C.; BELL, H.A.; NAYLOR, J.M.; EDWARDS, J.P. The role of *Pimpla hypochondriaca* venom in the suppression of pupal noctuid host immunity. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 291-298, 1999.
- MARRIS, G.C.; WEAVER, R.J.; BELL, J.; EDWARDS, J. P. Venom from the ectoparasitoid wasp *Eulophus pennicornis* disrupts host ecdysteroid production by regulating host prothoracic gland activity. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 229-238, 2001.
- MULLEN, L.N.; GOLDSWORTHY, G.J. Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 52, n. 4, p. 389-398, 2006.
- NAKAMATSU, Y.; GYOTOKA, Y.; TANAKA, T. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n. 6, p. 573–584, 2001.
- NALINI, M.; KIM, Y. A putative protein translation inhibitory factor encoded by *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses host hemocyte-spreading behavior. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 53, n. 12, p. 1283–1292, 2007.
- NAPPI, A.J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **BioEssays**, Cambridge, v. 22, n. 5, p. 469–80, 2000. Disponível em: < <http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 05 fev. 2008.
- NAPPI, A.J.; VASS, E. Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 84, n. 6, p. 1150-1157, 1998.
- NAPPI, A.J.; VASS, E.; FREY, F.; CARTON, Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 68, n. 4, p. 450-456, 1995.
- _____. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 4, n. 4, p. 423-430, 2000.
- NIJHOUT, H.F.; WILLIAMS, C.M. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): growth of the last instar larva and the decision to pupate. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 61, p. 481–491, 1974. Disponível em :< <http://jeb.biologists.org>>. Acesso em: 25 jan. 2008.

NUSSBAUMER, C.; STRADNER, A; SCHOPF, A. Effects of parasitization or injection of parasitoid-derived factor from the endoparasitoid wasp *Glyptapanteles porthetriae* (Hym.: Braconidae), on the developmental host, *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 126, n. 1, p. 1-7, 2002.

OKUDA, T.; KADONO-OKUDA, K. *Perilitus coccinellae* teratocyte polypeptide; evidence for production of a teratocyte-specific 540 kDa protein. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 41, n. 9, p.819 – 825, 1995.

PARKINSON, N.M.; WEAVER, R.J. Noxious components of venom from the pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, n. 1, p. 74–83, 1999.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137 p.

PENNACCHIO, F.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 233-258, 2006.

PENNACCHIO, F.; MALVA, C.; VINSON, S. B. Regulation of the host endocrine system by the endophagous braconid, *Cardiochiles nigriceps*, and its polydnavirus. In: EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001. chap. 7 p. 123-132.

POPHAM, H.J.R.; SHELBY, K.S.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 85, n. 8, p. 2255-2261, 2004.

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

RICHARDS, E.H.; EDWARDS, J.P. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation in vivo. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 49, n. 2, p. 108-124, 2002. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 12 mar. 2007.

ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.A. Insects In: _____. **Invertebrate blood cels**. London: Academic Press, 1981. p. 421 - 488.

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.

SASS, M.; KISS, A.; LOCKE, M. Integument and hemocyte peptides. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 40, n. 5, p. 407–421, 1994.

- SCHAFELLNER, C.; MARKTL, R.C.; NUSSBAUMER, C.; SCHOPF, A. Parasitism-induced effects of *Glyptapanteles liparidis* (Hym., Braconidae) on the juvenile hormone titer of its host, *Lymantria dispar*, the role of the parasitoid larvae. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 50, n.12, p. 1181–1189, 2004.
- SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U.; STRAND, M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. **BioEssays**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 344-351, 2001. Disponível em < <http://www.interscience.wiley.com> > . Acesso em: 15 jan. 2006.
- SCHOPF, A.; REMBOLD, H. Changes in juvenile hormone titer of gypsy moth larvae by parasitism of *Glyptapanteles liparidis*. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 80, n.11, p. 527–528, 1993.
- SHELBY, K.S.; WEBB, B.A. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 45, n. 5, p. 507–514, 1999.
- SHELBY, K.S.; ADEYEYE, O.A.; OKOT-KOTBER, B.M. WEBB, B.A. Parasitism-linked block of host plasma melanization. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 75, n. 3, p. 218–225, 2000.
- STETTLER, P.; TRENCZEK, T.; WYLER, T.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 9, p.817–831, 1998.
- STOLTZ, D.B. Interactions between parasitoid-derived products and host insects: An overview. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 32, n. 4, p. 347-350, 1986.
- 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.
- STRAND, M.R.; WONG, E.A. The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 37, n. 7, p. 503-515, 1991.
- SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanism of arthropods: a review. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 6, n. 4, p. 601-611, 1982.
- SUGURAMAN, M.; KANOST, M. R. Regulation of insect hemolymph phenoloxidases. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERIC, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of Insects**. New York: Academic Press, 1993. v. 1, chap. 12, p. 317- 342.

- TANAKA, T. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanreles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 33, n. 6, p. 413-420, 1987.
- TANAKA, T.; VINSON, S.B. Depression of prothoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 37, n. 2, p. 139–144, 1991a.
- _____. Interactions of venoms with the calyx fluids of three parasitoids, *Cardiochiles nigriceps*, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in effecting a delay in the pupation of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 84, p. 87-92, 1991b.
- TERAMOTO, T.; TANAKA, T. Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 50, n. 12, p. 1103–1111, 2004.
- TURNBULL, M.; WEBB, B. Perspectives on polydnavirus origins and evolution. In: MARAMOROSCHI, K.; MURPHY, F. A.; SHATKIMAJ, A. J. (Ed.). **Advances in Virus Research**, San Diego: Academic Press, 2002. v. 58 p. 203–254.
- TURNBULL, M.W.; MARTIN, S. N.; WEBB, B.A. Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoletis sonorensis* parasitization. **Journal of Insect Science**, Elmsford, v. 4, n. 11, p. 11–25, 2004.
- TZOU, P.; DE GREGORIO, E.; LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 1, p.102–110, 2002.
- VINSON, S.B. Defence reaction and hemocytic changes in *Heliothis virescens* in response to its habitual parasitoid *Cardiochiles nigriceps*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 18, n. 1, p. 94–100, 1971.
- _____. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 21, p.109-113, 1976.
- 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 endocrine interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001. chap. 11 p. 187-206.

WANI, M.; IWABUCHI, K.; AGUI, N.; MITSUHASHI, J. Endocrine alteration and precocious premetamorphic behaviors in the greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*, parasitized by an endoparasitoid, *Apanteles galleriae*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 34, n. 3, p. 257–273, 1997. Disponível em: < <http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 25 jan. 2008.

WEAVER, R.J.; MARRIS, G.C.; BELL, H.A.; EDWARDS, J.P. Identity and mode of action of the host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps. In: EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 2, p. 33-58.

WEBB, B.A. Polydnavirus biology genome structure and evolution. In: MILLER, L.K.; BALL, A. (Ed.). **The insect viruses**. New York: Plenum Publishing, 1998. chap. 5 p. 105-139.

WEBB, B.A.; LUCKHART, S. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis 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. Disponível em: < <http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 02 fev. 2006

WEBB, B.A.; RANA, R.L.; DAHLMAN, D.L. Endoparasitoid mediated disruption of host endocrine systems: common themes through uncommon means. In: EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 4, p. 83–93.

WEISKE, J.; WIESNER, A. Stimulation of NO synthase activity in the Immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. **Nitric oxide**, Orlando v. 3, n. 2, p. 123–131, 1999.

WHITFIELD, J.B. Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera. **Advances in Parasitology**, London, v. 54, p. 69– 100, 2003.

WHITTEN, M.M.A.; MELLO, C.B.; GOMES, S.A.O.; NIGAM, Y.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 44–57, 2001.

WHITTEN, M.M.A.; SUN, F.; TEWA, I.; SCHAUBD, G.; SOUKOUD, C.; NAPPPIE, A.; RATCLIFFE, N. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, n. 5, p.440–452, 2007.

YOKOO, S.; GOETZ, P.; TOJO, S. Phagocytic activities of hemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Galleria mellonella*. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 30, p. 343–350, 1995.

YOSHIGA, T.; TOJO, S. Effects of a juvenile hormone analog, methoprene, on the hemolymph titers of biliverdin-binding proteins in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 36, n. 3, p. 337-343, 2001.

ZHANG, G.; LU, Z.; JIANG, H.; ASGARI, S. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 477–483, 2004.