

EFEITO DO PARASITISMO DE *Cotesia flavipes* (CAM.) (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS
EM *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

RESUMO

As espécies *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) representam um problema para cultura da cana-de-açúcar, sendo o endoparasitoide *Cotesia flavipes* (Cam.) introduzido em 1974 para o controle destas pragas. Nos últimos 30 anos houve inversão na população destas espécies de brocas no estado de Alagoas e hoje há predominância de *D. flavipennella* nos canaviais nordestinos, surgindo entre os produtores à idéia de que *C. flavipes* não controla satisfatoriamente esta praga. Como o parasitismo de larvas de lepidópteros por endoparasitoides esta associada com a supressão da imunidade e manipulação da fisiologia, do hospedeiro, para aumentar a disponibilidade de nutrientes. Neste trabalho investigou se a resposta imune (níveis de óxido nítrico, atividade da fenoloxidase, contagem total e diferencial dos hemócitos, capacidade de encapsulação e apoptose) em *D. flavipennella* seria suprimida por *C. flavipes* e se alterações no perfil bioquímico, da hemolinfa e do corpo gorduroso (proteínas, carboidratos e lipídeos), bem como modificações na citoquímica dos hemócitos, ocorreriam para garantir o parasitismo. Os resultados mostraram redução na produção de óxido nítrico, na atividade da fenoloxidase e no número total de hemócitos. Na contagem diferencial, observou-se aumento no número de plasmatócitos e redução de esferulócitos. A capacidade de encapsulação

foi afetada. Registrou-se apoptose nos hemócitos e corpo gorduroso. Ocorreu redução de proteínas e lipídeos na hemolinfa e proteína e carboidrato no corpo gorduroso. A citoquímica dos hemócitos foi alterada, tendo reduzido polissacarídeos ácidos nos prohemócitos e oenocitóides, mucina nos plasmatócitos e granulócitos e lipídeos nos adipohemócitos, granulócitos, e prohemócitos. Observou-se também uma drástica degeneração do corpo gorduroso. Já o perfil protéico revelou a presença de quatro proteínas específicas do parasitismo na hemolinfa. Concluiu-se, então, que *C. flavipes* é eficiente no controle de *D. flavipennella* por suprimir a resposta imunológica, humoral e celular, alterar o perfil bioquímico da hemolinfa e corpo gorduroso e citoquímica dos hemócitos.

PALAVRAS-CHAVE: Citoquímica, hemócitos, encapsulação, parasitoide, broca da cana-de-açúcar, nutrientes, corpo gorduroso.

EFFECT OF PARASITISM *Cotesia flavipes* (CAM.) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ON
IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND MORPHOPHYSIOLOGICAL IN *Diatraea*
flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

(Under the Direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

ABSTRACT

Lepidopteran larval parasitism by endoparasitoids is associated with immune suppression and manipulation of the host physiology. This study investigated if the immune response in *Diatraea flavipennella* (Box) is suppressed by *Cotesia flavipes* (Cam.) and if changes occur in biochemical profile, haemolymph, and fat body, cytochemistry of hemocytes to ensure parasitism. Levels concentration of nitric oxide, phenoloxidase, and protein was determined. Total number of hemocytes per microliter of hemolymph and the average percentage of these cells were verified. Capacity of melanization and encapsulation by injection and ultrastructural analysis of microbeads was evaluated. Presence of apoptotic cells in fat body was investigated using TUNEL technique. Levels of carbohydrate, lipid, and protein in hemolymph and fat body were quantified, as well as the proteic profile of hemolymph was characterized. Histological sections of stained caterpillars were obtained using PAS (Periodic acid/Schiff's) reaction. Marking of acidic polysaccharides, mucin, and lipids was investigated on hemocytes. Results showed reduction in nitric oxide production, phenol oxidase activity, and total number of hemocytes. In the differential count, increase in number of plasmatocytes and reduction of spherulocytes were observed. The encapsulation capacity was affected. Apoptosis in hemocytes and fat body was registered.

Reduction of proteins and lipids occurred in hemolymph and protein; reduction of carbohydrate occurred in body fat. Cytochemistry of hemocytes was changed, reducing the acidic polysaccharides in prohemocytes and oenocytoids, mucin in plasmatocytes and granulocytes, and lipids in adipohemocytes, granulocytes, and prohemocytes. It was also observed a drastic body fat degeneration. The proteic profile showed presence of four specific proteins of parasitism in the hemolymph. It is concluded that *C. flavipes* is effective for controlling *D. flavipennella* by suppressing the immune, humoral, and cellular response, altering the biochemical profile of hemolymph, fat body, and cytochemistry of hemocytes.

KEY WORDS: Citochemistry, hemocytes, encapsulation, parasitoid, sugarcane moth borer, nutrients, fat body.

EFEITO DO PARASITISMO DE *Cotesia flavipes* (CAM.) (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS
EM *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2013

EFEITO DO PARASITISMO DE *Cotesia flavipes* (CAM.) (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS
EM *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

EFEITO DO PARASITISMO DE *Cotesia flavipes* (CAM.) (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS
EM *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ELIANA MARIA DOS PASSOS

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

Fábio André B. dos Santos - CPqAM/FIOCRUZ

Tatiana Souza Porto – UFRPE

A meu Pai, Elísio Passos, exemplo de
honestidade e determinação;
e as minhas irmãs Edna, Ivanete e Neguinha,
pelo incentivo e apoio

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças, permitindo que eu chegasse até aqui, e pelo seu amor grandioso.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola pela realização deste curso.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudo.

A minha comissão de orientação, composta pelos professores, Valéria Wanderley, Edmilson Marques e Álvaro Teixeira pela ajuda indispensável concedida em etapas distintas do trabalho e pela amizade e confiança desenvolvidas.

Ao pesquisador Fábio Brayner, pela participação neste trabalho e pela forma como abraçava as idéias, sempre empolgado.

A toda equipe de direção do LABTECBIO, em especial as professoras Ana Porto e Tatiana Porto, pela confiança em disponibilizar o Laboratório. E aos alunos por me acolherem com tanto carinho, e pela auxílio dispensado no dia a dia, em especial a Milena Silva e Flávio Silva.

Aos professores da Área de Entomologia Agrícola do programa de pós-graduação e a prof.^a Auristela Albuquerque, obrigada pelo aprendizado.

Aos coleguinhas do Laboratório de Patologia de Insetos, Cinthia, Ellen, Jennifer, Ana Paula, Anderson, Rebeka, Lili, Ricardo e Flavinha, pela convivência e aprendizado. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido.

As meninas do Laboratório de Histologia, Ismaela, Veruska, Lilian, Andresa, Ana Janaína e Hilda, valeu por não deixarem eu me contar com o micrótomo.

A todos os colegas de curso pelo apoio mútuo na época das disciplinas e no decorrer do trabalho.

A Aleuny, Suêrda e Adelmo, muito obrigado pelo companheirismo e amizade.

A minha “pequena” família: Meu Pai, Elísio Passos, por me ensinar a ser determinada; Minhas irmãs, Edna, Ivanete e Neguinha pelo cuidado e amor; Aos meus nove irmãos e dois agregados (cunhados), e aos “trinta e pouco” sobrinhos, valeu pela torcida. E a minha família postiza aqui em Recife, os Ferro, obrigada pelo carinho recebido todo esse tempo.

Aos velhos e bons amigos da IASD de Campo do Brito-Se e aos novos amigos da IASD de Recife, obrigada mesmo pelas orações e amizade sincera.

SUMÁRIO

| | Páginas |
|--|---------|
| AGRADECIMENTOS | IX |
| CAPÍTULOS | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| LITERATURA CITADA..... | 12 |
| 2 <i>Cotesia flavipes</i> (CAM.) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) SUPRIME A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE <i>Diatraea flavipennella</i> (BOX) (LEPIDOPTERA) | 20 |
| RESUMO | 21 |
| ABSTRACT | 22 |
| INTRODUÇÃO | 23 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| RESULTADOS | 29 |
| DISCUSSÃO..... | 32 |
| LITERATURA CITADA..... | 36 |
| 3 <i>Cotesia flavipes</i> (CAM.) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ALTERA NUTRIENTES NA HEMOLINFA, CORPO GORDUROSO E CITOQUÍMICA DOS HEMÓCITOS EM <i>Diatraea flavipennella</i> (BOX) (LEPIDOPTERA:CRAMBIDAE) | 49 |
| RESUMO | 50 |
| ABSTRACT | 51 |

| | |
|--------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 52 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 53 |
| RESULTADOS | 57 |
| DISCUSSÃO | 58 |
| LITERATURA CITADA..... | 61 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar no país data do período colonial, hoje devido aos avanços tecnológicos e investimentos destinados a esta cultura, o Brasil se apresenta no cenário mundial como maior produtor de cana-de-açúcar e etanol. Além disso, conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (MAPA 2012). Segundo o terceiro levantamento anual realizado pelo Ministério da Agricultura, através da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2013), estima-se uma colheita de 595,13 milhões de toneladas de cana para a safra 2012/2013, das quais 48,93% são para a fabricação de açúcar e 51,0% para a produção de álcool. A estimativa é que sejam produzidos 37,66 milhões de toneladas de açúcar e 23,62 bilhões de litros de álcool. Esta cultura continua ainda em expansão aqui no país, com progressivo aumento na região Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

A exemplo, do que ocorre com as demais áreas canavieiras do mundo as brocas *Diatraea* spp constituem problemas para todas as regiões canavieiras do Brasil, ocasionando perdas significativas no rendimento (Lima & Marques 1985). As lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius), presente em todo o continente Americano, provocam danos diretos e indiretos. Os danos diretos decorrem da alimentação do inseto e caracterizam-se por: perda de peso, devido à abertura de galerias, morte da gema apical, encurtamento de entrenó, quebra da cana, enraizamento aéreo e germinações das gemas laterais, reduzindo assim, a produção de cana e conseqüentemente, de seus produtos (Mendonça 1996, Gallo *et al.* 2002, Botelho & Macedo 2002). Os danos indiretos também são consideráveis, as galerias e orifícios deixados pelas

lagartas servem como porta de entrada para microorganismos, predominantemente fungos que causam a podridão vermelha - *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), estes invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e o rendimento em açúcar (Gallo *et al.* 2002).

Danos semelhantes são ocasionados por outra espécie de *Diatraea*, a *Diatraea flavipennella* (Box). Conhecida como broca da cabeça amarela da cana-de-açúcar, é uma praga de ocorrência restrita ao Brasil, com grande importância econômica principalmente nos Estados da Região Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba) (Mendonça 1996).

Os parasitoides larvais da broca são os mais utilizados como método de controle no Brasil e no mundo, especialmente o braconídeo *Cotesia flavipes* (Cameron) (Pinto *et al.* 2006). No período de 1974 a 1976 este parasitoide larval foi introduzido nos estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Alagoas, Bahia e Rio de Janeiro para o controle de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* e em São Paulo e Amapá para o controle de *D. saccharalis* (Risco 1976, Pereira *et al.* 1977, Mendonça Filho *et al.* 1977, Botelho & Macedo 2002). O Programa Nacional de Controle Biológico de *Diatraea* spp, na cana-de-açúcar no Brasil, implantado em 1974 pelo Instituto do Açúcar e do Alcool - IAA, através do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar - PLANALSUCAR, produziu e liberou aproximadamente 4,4 bilhões da vespa *C. flavipes*, em todo o país, atingindo uma área de 800.000 ha durante o período de 1974 a 1985, reduzindo a intensidade de infestação da praga em 57,14% e mantendo inferior ao nível crítico (PLANALSUCAR/CONOR 1975 -1986).

Em Pernambuco, Sergipe, Bahia, Paraíba e no Rio Grande do Norte segundo relatórios anuais da Cordenadoria Regional do Norte – CONOR do PLANALSUCAR (1975 -1986) sempre houve predominância da espécie *D. flavipennella* entre 1975 a 1986. Enquanto no estado de

Alagoas, entre as décadas de 70 e início de 80 havia a dominância específica de *D. saccharalis* (70,12%) sobre *D. flavipennella* (29,88) (Risco *et al.* 1975). No entanto, em meados da década de 80, já foi evidenciada uma inversão na dominância destas espécies, segundo relatório do PLANALSUCAR (1985), havendo uma predominância *D. flavipennella* (89,80%) sobre *D. saccharalis* (10,20%), neste período. Em levantamento realizado no estado de Alagoas de setembro de 2003 a fevereiro de 2004 verificou-se que 97,67% da população amostrada consistia de *D. flavipennella* e somente 2,33% de *D. saccharalis*. Confirmando assim a inversão na dominância destas espécies nos últimos 30 anos no Estado de Alagoas (Freitas *et al.* 2006).

Hoje, no Estado de Pernambuco, segundo Silva (2013) dados não publicados, continua a predominância de *D. flavipennella*, agora com quase 100% de dominância o que fez surgir entre os plantadores de cana a idéia de que *C. flavipes* por algum motivo não é capaz de parasitar, desenvolver e conseqüentemente controlar a lagarta *D. flavipennella*. Além disso, desde que foi introduzido no Brasil, em meados de 1974, o endoparasitoide *C. flavipes* é criado em laboratório sobre *D. saccharalis* e liberado em campo para o controle das duas brocas.

Em geral, linhagens dos parasitoides surgem frequentemente em paralelo a mudanças em seus hospedeiros. Os endoparasitoides apresentam um contato mais íntimo com fatores imunes e de desenvolvimento do hospedeiro favorecendo uma maior especialização, particularmente de coinobiontes, parasitoides que permitem o desenvolvimento do hospedeiro, os quais apresentam uma capacidade de adaptar-se ao meio hospedeiro mais especializado (Pennacchio & Strand 2006). A família Braconidae apresenta um grupo específico de hospedeiros o que sugere fortemente que o padrão de diversificação tem sido influenciado pela filogenia do hospedeiro (Wharton 1993). Dentro desta família, *C. flavipes* apresenta uma diversidade de fatores de evasão em diferentes tempos após o parasitismo, os quais podem não ser idênticos entre parasitoides

congenéricos porque eles têm evoluído em resposta fisiológica a diferentes hospedeiros habituais (McEvoy 1996, Strand & Obrycki 1996).

O sucesso do parasitoide está estritamente relacionado aos mecanismos de interação hospedeiro-parasitoide, que se desenvolve ao longo do processo evolucionário e que permite a regulação da fisiologia do hospedeiro para o benefício do parasitoide (Pinto *et al.* 2006). Assim, os imaturos do parasitoide enfrentam uma série de desafios fisiológicos que pode 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 *et al.* 2001).

O sistema imune natural dos insetos é comumente dividido em defesas celulares e resposta humoral. A resposta humoral resulta principalmente da ação de proteínas que estão sempre presentes ou são produzidas, sendo em geral associadas à infecção de microorganismos. Entre as moléculas mais importantes do sistema humoral, estão os peptídeos antimicrobianos, produzidos por diversos tecidos e normalmente detectados na hemolinfa algumas horas após a infecção. Os insetos também liberam oxigênio citotóxico e reativo, assim como uma gama de outras moléculas de defesa, como lisozimas (Hoffman 2003, Garcia *et al.* 2004, Büyükgüzel *et al.* 2007, Lopes 2008). Enquanto as reações celulares ocorrem na hemolinfa quando os hemócitos circulantes entram em contato com o corpo estranho desencadeando o processo de fagocitose, agregação, nodulação ou encapsulação (Gillespie *et al.* 1997, Lavine & Strand 2002).

Em geral os hospedeiros incompatíveis eliminam os endoparasitoides por mecanismos de encapsulação, processo no qual os hemócitos formam uma série de capas envoltórias sobre a estrutura invasora, que neste caso são os ovos introduzidos pela fêmea do parasitoide na hemocele

do hospedeiro (Strand & Pech 1995, Schmidt *et al.* 2001, Lavine & Strand 2002). Dois tipos de encapsulação são descritos: a encapsulação celular, que ocorrer sem a melanização, e a encapsulação melanótica, que ocorre com ou sem hemócitos (Gillespie *et al.* 1997). A melanina depositada sobre os ovos, que previne ou retarda o crescimento do invasor, é formada principalmente durante a oxidação e polimerização de fenóis, como a tirosina e a dopamina, por enzimas denominadas coletivamente por fenoloxidasas (Nappi *et al.* 1991, Nappi *et al.* 1992, Blumberg 1997a e b, Beckage 1998).

O complexo bioquímico da melanização de nódulos e cápsulas inicia-se quando a tirosina é convertida em dihidroxifenilalanina (DOPA) por meio da ação da enzima monofenoloxidase (tirosinase). DOPA é então convertido em quinona-DOPA por difenoloxidase e daí para melanina através de uma série de intermediários tóxicos. Precusores de fenoloxidase (pré e profenoloxidase) podem está associado aos hemócitos ou circular livremente no plasma, antes de serem ativados por proteases de serina, e fragmentos de peptídeos são removidos das moléculas precursoras (Beckage 2006). Outras enzimas participam no processo de encapsulação melanótica, como é o caso da monofenol oxidase, da fenilalanina hidroxilase e da glicose desidrogenase (Nappi *et al.* 1991, Li *et al.* 1992, Hillyer & Christensen 2002, Johnson *et al.* 2003).

Após a encapsulação os ovos ou larvas de parasitoides ficam isolados da hemolinfa do hospedeiro, e podem morrer pela atuação de uma soma de fatores tais como asfixia, fome, inibição física do desenvolvimento ou pela liberação de substâncias tóxicas (Blumberg 1990, Godfray & Hassell 1993, Blumberg 1997a e b, Kraaijeveld *et al.* 1998; Nappi & Vass 1998). As moléculas citotóxicas geradas durante a resposta imune estão associadas à atividade enzimática e incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) assim como de quinóides intermediários da melanina, os quais são liberados via cascata de profenoloxidase (Nappi & Ottaviani 2000).

A produção de óxido nítrico (NO), por exemplo, resulta da interação ligante-receptor, onde a óxido nítrico sintase (NOS) converte L-arginina em NO e L-citrulina na presença de cofatores, como o NADPH (Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio) (Moncada *et al.* 1991). Em hospedeiros imunorreativos ocorre o aumento na produção de óxido nítrico (NO), o qual se comporta como molécula efetora na interação com reativos intermediários, como o O_2^- ou H_2O_2 , para iniciar a atividade citotóxica empregada na defesa contra invasores (Nappi *et al.* 2000). A demonstração da produção de NO na hemolinfa é feita de forma indireta utilizando a concentração de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Green *et al.* 1981).

Em casos de ocorrer um encapsulamento parcial dos ovos ou das larvas do parasitoide, estes podem sobreviver e continuar o seu desenvolvimento, o que é demonstrado pela ocorrência de larvas de parasitoide ligadas a restos do córion de ovos encapsulados (Blumberg & Goldberg 1992, Blumberg & van Driesche 2001). Assim, o sucesso na encapsulação depende do reconhecimento e da presença de quantidade suficientemente grande de hemócitos para a formação da cápsula. O reconhecimento do invasor é mediado por um grupo de proteínas denominadas moléculas de adesão e citocinas (Strand & Pech 1995, Lavine & Strand 2002, Carton *et al.* 2005). Estas reconhecem e se ligam a moléculas na superfície dos corpos estranhos, consistindo na resposta hemocítica primária, a qual se traduz na amplificação da população de hemócitos (Eslin *et al.* 1998, Yu *et al.* 2002). Como ocorre em interações hospedeiro-parasitoide, logo após o parasitismo (Guzo & Stoltz 1987, Alleyne & Wiedenmann 2001, Reed *et al.* 2007).

A outra condição é a presença, nos hospedeiros parasitados, de quantidade suficientemente grande de hemócitos para que a cápsula celular seja completada antes do ovo do parasitoide se proteger, através do envolvimento pelos tecidos do hospedeiro. Assim, o êxito da reação de defesa contra os ovos de endoparasitoides foi considerado relacionado, pelo menos em parte, com o

número de hemócitos circulando na hemolinfa poucas horas após o parasitismo (Eslin & Prevost 1996, Bauer *et al.* 1998).

Normalmente, na encapsulação de ovos ou larvas de parasitoides, inicialmente, os granulócitos são as primeiras células a fazer reconhecimento do corpo estranho. Estes fixam-se a superfície deste corpo e libera o seu conteúdo, em uma reação de desgranulação, formando uma matriz adesiva na superfície do alvo que induz a deposição de múltiplas camadas de plasmatócitos, que compreendem a maior parte da cápsula (Beckage 2006). A finalização da cápsula é marcada pelo decréscimo na desgranulação, migração de hemócitos das camadas excedentes exteriores da cápsula e aparecimento de granulócitos vagamente aderentes na superfície exterior da cápsula (Pech & Strand 2000, Wiegand *et al.* 2000). Estas células acabam por morrer devido a substâncias liberados pelos plasmatócitos (Pech & Strand 2000).

As cápsulas podem, então, aderir a tecidos e órgãos do hospedeiro, tais como o corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, glândulas salivares, ou intestino e assim, são retirados da hemolinfa. Embora seja raro, o material encapsulado pode ser totalmente expulso da hemocele com a epiderme liberada com a exuvial da cutícula do hospedeiro durante a ecdise. Este fenômeno é chamado de "encistamento cuticular,"o qual ocorre quando um parasitoide se desenvolve em um hospedeiro não compatível (Beckage 2006).

A reação de defesa celular, através dos hemócitos, pode ser controlada por ação hormonal. Por exemplo, a aplicação de anti-hormônios juvenis causa fortes reações de encapsulação, sendo a melanização bastante pronunciada (Khafagi & Hegazi 2001). Diferentemente, quando os níveis de ecdisona são baixos ou o sinal da ecdisona é bloqueado, a resposta de encapsulação é seriamente comprometida. A ecdisona é um hormônio-chave na síntese da melanina, uma vez que regula a expressão da fenoloxidase. A ativação deste hormônio potencializa os precursores dos hemócitos a responderem ao parasitismo por meio da proliferação e diferenciação (Sorrentino *et al.* 2002).

Além dos vários mecanismos de defesa imunológica os imaturos do parasitoide enfrentam variações do sistema endócrino. Assim, 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 & Iwantsch 1980). Os principais grupos hormonais responsáveis pela regulação do crescimento, desenvolvimento, metamorfose e reprodução são os ecdisteróides e o hormônio juvenil, produzidos pelas glândulas protorácicas e pelos *corpora allata*, respectivamente. Estes têm sua produção e liberação regulada pelos neurohormônios, sintetizados em células secretoras de vários órgãos. A manipulação da fisiologia do hospedeiro realizada pelos parasitoides ocorre em grande parte através da alteração na síntese, liberação, metabolismo e ação desses hormônios (Edwards *et al.* 2001, Beckage & Gelman 2004).

Parasitoides podem liberar na hemolinfa do hospedeiro ecdisteróides e hormônio juvenil para ajustar os níveis desses hormônios a fim de satisfazer suas necessidades (Cole *et al.* 2002). Em hospedeiros parasitados por *Cotesia* spp, os efeitos endócrinos se tornam evidentes no último instar do hospedeiro, quando os sintomas da metamorfose são suprimidos e este vive por muitos dias em um estado de pós-emergência, sem se alimentar (Alleyne & Beckage 1997). Em geral, os coinobiontes, induzem uma série de mudanças fisiológicas em seus hospedeiros para garantir sucesso na colonização e desenvolvimento. Muitas dessas mudanças são sincronizadas com o desenvolvimento do imaturo do parasitoide, assim como a indução de alterações no ambiente interno do hospedeiro para atender ao requerimento do estágio específico de desenvolvimento do parasitoide (Pinheiro *et al.* 2010).

Por depender completamente de seu hospedeiro para a aquisição de nutrientes, os endoparasitoides larvais evoluíram e suas larvas manipulam a fisiologia do hospedeiro para aumentar a disponibilidade de nutrientes (Rivers & Denlinger 1994, Jervis *et al.* 2008). Estudos

revelaram que o parasitoide regula quantitativa e qualitativamente o nível de nutrientes do hospedeiro, a fim de atender suas necessidades nutricionais (Nakamatsu & Tanaka 2004, Kaeslin *et al.* 2005, Salvador & Cónsoli 2008).

Como a maior parte do metabolismo intermediário do inseto ocorre no corpo gorduroso, incluindo metabolismo de lipídios e de carboidratos, síntese de proteínas, e de aminoácidos (Visser *et al.* 2010), alterações metabólicas no corpo gorduroso são comumente atribuídas ao parasitismo (Thompson 2001, Beckage & Gelman 2004). Larvas de parasitoides gregários usam o corpo gorduroso e nutriente da hemolinfa do hospedeiro na proporção do número de parasitoides da progênie (Nakamatsu & Tanaka 2004). Entretanto, a regulação do hospedeiro pelo parasitoide é espécie – específica entre as espécies de parasitoide ficando difícil generalizar (Nakamatsu *et al.* 2002).

O conjunto de mecanismos usados pelos parasitoides para suprimir o sistema imune e manipular os aspectos fisiológicos e bioquímicos de seus hospedeiros incluem desde proteínas, sintetizadas pelas fêmeas e introduzidas durante a oviposição (venenos e proteínas ovarianas), vírus simbiotes (polidnavírus-PDV) e células liberadas pelo ovo do parasitoide no final do desenvolvimento embrionário (teratócitos), assim como secreções liberadas pela própria larva do parasitoide em desenvolvimento (Dahlman & Vinson 1993, Strand & Pech 1995, Beckage & Gelman 2004).

O veneno consiste numa mistura complexa de diversos componentes protéicos e não protéicos. Muitas dessas proteínas apresentam estrutura e função similares a moléculas endógenas que estão envolvidas no processo fisiológico e bioquímico em animais (Fry *et al.* 2009, Asgari & Rivers 2011). Os vírus simbiotes, presentes nas células do cálice do trato reprodutivo da fêmea, e liberados juntamente com o ovo do parasitoide, também são partículas endógenas contendo um filamento duplo de DNA, denominados polidnavírus devido ao seu genoma polidisverso. Eles

invadem os tecidos do hospedeiro, inclusive o corpo gorduroso, penetram nos hemócitos e expressam um complemento de genes virais específicos (Strand & Pech 1995, Beckage 1998, Lavine & Strand 2002, Turnbull & Webb 2002).

Os teratócitos são grandes células que tem origem a partir das células serosas que rodeiam o embrião do parasitoide, as quais, após a eclosão da larva se dissociam e dispersam-se na hemolinfa do hospedeiro (Dahlman 1990, Dahlman 1991, Webb *et al.* 2001). Sofrem alterações citológicas como aumento do número de microvilosidades e vesículas. O número por hospedeiro varia de cerca de 10 a 1000, podendo diminuir devido a degeneração, ingestão pelas larvas do parasitoide ou expulsão pelo hospedeiro (Basio & Kim 2005). Sintetizam produtos que servem como nutrientes para o imaturo do parasitoide e que podem atuar na regulação do desenvolvimento e crescimento do hospedeiro, além de contribuir com supressão do mecanismo de resposta imunológica do hospedeiro, como a encapsulação (Dahlman & Vinson 1993).

O papel de cada um desses componentes utilizados pelo parasitoide, para manipular aspectos fisiológicos e suprimir a defesa do hospedeiro, varia com as espécies envolvidas na interação hospedeiro-parasitoide, podendo atuar de forma sinérgica ou independente. Além disso, o mecanismo pelo qual esses componentes atuam ainda não se encontra completamente esclarecido (Asgari & Rivers 2011). No geral esses componentes suprimem a resposta imune, modulam o ambiente nutricional e alteraram o desenvolvimento do hospedeiro mediante interferência no sistema endócrino, indução de efeitos citotóxicos e modulação das células de defesa (Weaver *et al.* 2001). Por exemplo, ao intervir na cascata proteolítica, reduzindo a atividade da fenoloxidase, evita a melanização (Asgari *et al.* 2003). E na ausência da melanização, os radicais tóxicos e compostos intermediários que reagem com o oxigênio não são formados, e, portanto, o parasitoide é protegido (Richards & Edwards 2000).

A característica mais comum compartilhada pela ação de secreções da vespa e produtos virais é indução de morte celular em tecidos selecionados do inseto hospedeiro (Rivers *et al.* 2007). Sendo descrita como um dos meios necessários para manipular o hospedeiro e garantir o desenvolvimento do parasitoide (Nakamatsu & Tanaka 2003, Zhang *et al.* 2005, Asgari 2006). Em hemócitos leva a conseqüente redução no número destas células e a interrupção da resposta de encapsulação (Strand & Pech 1995, Teramoto & Tanaka 2004, Luo & Pang 2006, Suzuki & Tanaka 2006, Richards & Dani 2007).

A habilidade dos parasitoides para se desenvolver em diferentes espécies de hospedeiro está correlacionada com a síntese de proteínas específicas do parasitismo-PSP (Harwood *et al.* 1998). Essas proteínas são provavelmente produtos de genes polydnávirus uma vez que também são produzidas quando as larvas são injetadas com vírus purificado (Harwood & Beckage 1994).

Os parasitoides, além dos mecanismos de imunossupressão mencionados, podem utilizar ainda estratégias passivas, como oviposição e desenvolvimento em tecidos que são inacessíveis aos hemócitos do hospedeiro (Pennacchio & Strand 2006). Ou mesmo, põem seus ovos na hemocele do hospedeiro, no entanto a superfície de sua progênie apresenta características que não são reconhecidas como intrusos pelos hemócitos (Schmidt *et al.* 2001).

Para comprovar o efeito imunossupressor e estudar o papel de cada mecanismo utilizado pelo parasitoide, pesquisadores têm injetado partículas abióticas, tais como micro-esferas tipo Sefadex, em lagartas parasitadas, nas quais, tem sido constatada uma menor melanização e porcentagem de encapsulação destas partículas pelos hemócitos, em comparação ao que ocorre em lagartas não parasitadas (Lavine & Beckage 1996, Levin *et al.* 2005).

Parasitoides da ordem Hymenoptera, na prática, são de valor inestimável ao controle biológico de pragas de insetos diversos. E do ponto de vista evolutivo, os mecanismos das vespas que evoluíram para garantir o desenvolvimento de sua progênie são fenomenais. Alguns dos

componentes envolvidos em tais adaptações podem ser utilizados, no futuro, para melhorar o controle biológico de pragas de insetos por modificação genética dos parasitoides, seus hospedeiros, ou culturas (Asgari & Rivers 2011). Como por exemplo, a identificação e caracterização de genes e produtos de genes associados com o veneno de parasitoides e atividade dos teratócitos são valiosas para compreender e aplicar a sua capacidade reguladora, para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de insetos (Beckage & Gelman 2004). Além disso, ao explorar os mecanismos envolvidos na evasão / supressão do sistema imune do hospedeiro ajuda a esclarecer como o sistema imunológico dos insetos funciona (Asgari & Rivers 2011).

Diante do exposto, em decorrência da predominância da broca *D. flavipennella* e da falta de estudos sobre a interação hospedeiro-parasitoide para essa espécie e *C. flavipes* o presente trabalho visou investigar a resposta imune e alterações fisiológicas em *D. flavipennella* desencadeadas pelo parasitoide *C. flavipes*, procurando assim contribuir para o aperfeiçoamento do programa de controle desta praga de grande importância na cultura da cana-de-açúcar.

Literatura Citada

- Alleyne, M. & N.E. Beckage. 1997.** Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. J. Insect Physiol. 43:407-24.
- Alleyne, M. & R.N. Wiedenmann. 2001.** Encapsulation and hemocyte numbers in three lepidopteran stemborers parasitized by *Cotesia flavipes*-complex endoparasitoids. Entomol. Exp. Appl. 100: 279-293.
- Asgari, S. & D.B. Rivers. 2011.** Venom Proteins from Endoparasitoid Wasps and Their Role in Host-Parasite Interactions. Annu. Rev. Entomol. 56: 313-335.
- Asgari, S. 2006.** Venom proteins from the polydnavirusproducing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. Arch. Insect Biochem. 61: 146-156.

- Asgari, S., G. Zhang, R. Zareie & O. Schmidt. 2003.** A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:1017-24.
- Basio, N.A. & Y. Kim. 2005.** A Short Review of Teratocytes and Their Characters in *Cotesia plutellae* (Braconidae: Hymenoptera) *J. Asia-Pacific Entomol.* 8: 211-217.
- Bauer, E., T. Trenczek & S. Dorn. 1998.** Instar-dependent hemocyte changes in *Pieris brassicae* after parasitization by *Cotesia glomerata*. *Entomol. Exp. Appl.* 88: 49-58.
- Beckage, N.E. & D.B. Gelman. 2004.** Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 299-330.
- Beckage, N.E. 1998.** Parasitoids and polydnviruses. *Bioscience* 48: 305-311.
- Beckage, N.E. 2006.** Insect Immunology, p. 243-270. In T.D. Schowalter (ed.), *Insect Ecology: An Ecosystem Approach*. Academic Press, 572 p.
- Blumberg, D. & R.G. Van Driesche. 2001.** Encapsulation Interactions. *Israel J. Entomol.* 25: 57-65.
- Blumberg, D. & S. Goldberg. 1992.** Encapsulation of eggs of two species of *Encyrtus* (Hymenoptera: Encyrtidae) by soft scales (Homoptera: Coccidae) in six parasitoid-host rates of three Encyrtid Parasitoids by three Mealybug species (Homoptera: Pseudococcidae) found commonly as pests in commercial greenhouses. *Biol. Control* 22: 191-199.
- Blumberg, D. 1990.** Host resistance: encapsulation of parasites, p. 221-228. In D. Rosen (ed), *The armored scale insects, their biology, natural enemies and control*. Amsterdam-Netherlands, Elsevier Science Publishers, 383p.
- Blumberg, D. 1997a.** Encapsulation of Parasitoids, p. 375-387. In Y. Ben-Dov & C.J. Hodgson (eds), *Soft scale Insects - their biology, natural enemies and control*. Amsterdam - Netherlands, Elsevier Science Publishers, 688p.
- Blumberg, D. 1997b.** Parasitoid encapsulation as a defense mechanism in the Coccoidae (Homoptera) and its importance in biological control. *Biol. Control* 8: 225-236
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 477-494. In J.R.P Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), *Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores*. São Paulo, Manole, 635p.
- Büyükgüzel, E., H. Tunaz, D. Stanley & K. Büyükgüzel. 2007.** Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.* 53: 99-105.
- Carton, Y., A.J. Nappi & M. Poirié. 2005.** Genetics of antiparasite resistance in invertebrates. *Develop. Comp. Immunol.* 29: 9-32.

- Cole, T.J., N.E. Beckage, F.F. Tan, A. Srinivasan, & S.B. Ramaswamy. 2002.** Parasitoid host endocrine relations: Self-reliance or co-optation? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1673-79.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2013.** Safra da cana-de-açúcar. Fonte consultada: www.conab.gov.br/download/safra. Acesso dia 20/01/2013.
- Dahlman, D.L. 1990.** Evaluation of teratocyte functions: an overview. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 13: 159-66.
- Dahlman, D.H. & S.B. Vinson. 1993.** Teratocytes: developmental and biochemical characteristics, p. 145-165. In N.E. Beckage, S.N. Thompson & B.A. Federici (eds.), *Parasites and pathogens of insects*. San Diego, Academic Press, 294p.
- Dahlman, D.L. 1991.** Teratocytes and host/ parasitoid interactions. *Biol. Control* 1: 118-26.
- Edwards, J.P., R.J. Weaver & G.C. Marris. 2001.** Endocrine changes in lepidopteran larvae: Potential challenges to parasitoid development and survival, p. 1-32. In J.P. Edwards & R.J. Weaver (eds.) *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. Oxford, UK: BIOS Sci. Publ., 309p.
- Eslin, P. & G. Prevost. 1996.** Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. *J. Insect Physiol.* 42: 549-555.
- Eslin, P., G. Prevost & B. Lanzrein. 1998.** Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J. Insect Physiol.* 44: 807-816.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'Ana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Fl. Entomol.* 89: 539-540.
- Fry, B.G., J. Roelants, & J.A. Norman. 2009.** Tentacles of venom: toxic protein convergence in the kingdom Animalia. *J. Mol. Evol.* 68: 311-21.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Garcia, E.S., E.M.M. Machado & P. Azambuja. 2004.** Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect Physiol.* 50: 157-165.
- Gillespie, J.A., M.R. Kanost & T. Trenzcek. 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev. Entomol.* 47: 611-643.

- Godfray, H.C.J. & M.P. Hassell. 1993.** Encapsulation and host-parasitoid population biology, p. 131-147. In C.A. Toft, A. Aeschlimann & L. Bolis (eds.), Parasite-hosts associations-coexistence or conflict? Oxford, Oxford University Press, 384p.
- Green, L.C., K.R. de Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7764-7768.
- Guzo, D. & D.B. Stoltz. 1987.** Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. J. Insect Physiol. 33: 19-31.
- Harwood, S.H. & N.E. Beckage. 1994.** Purification and characterization of an abundant polydnavirus-induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 24: 685-698.
- Harwood, S.H., J.S. McElfresh, A. Nguyen, C.A. Conlan & N.E. Beckage. 1998.** Production of early expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*. J. Invert. Pathol. 71: 271-279.
- Hillyer, J.F. & B.H. Christensen. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochem. Cell Biol. 117: 431-440.
- Hoffman, J.A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. Nature. 426: 33-38.
- Jervis, M.A., J. Ellers, & J.A. Harvey. 2008.** Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. Annu. Rev. Entomol. 52: 361-385.
- Johnson, J.K., T.A. Rocheleau, J.F. Hillyer, C.C. Chen, J. Li & B.M. Christensen. 2003.** A potential role for phenylalanine hydroxylase in mosquito immune responses. Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 345-354.
- Kaeslin, M., R. Pfister-Wilhelm, D. Molina & B. Lanzrein. 2005.** Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implications. J. Insect Physiol. 51: 975-988.
- Khafagi, W.E. & E.M. Hegazi. 2001.** Effects of juvenile hormones and precocenes on the immune response of *Spodoptera littoralis* larvae to supernumerary larvae of the solitary parasitoid, *Microplitis rufiventris* Kok. J. Insect Physiol. 47: 1249-1259.
- Kraaijeveld, A.R., J.J.M. Van Alphen & H.C.J. Godfray. 1998.** The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. Parasitology 116: 29-45.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol. Biol. 32: 1295-309.
- Lavine, M.D. & N.E. Beckage. 1996.** Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. J. Insect Physiol. 42: 41-51.

- Levin, D., L.N. Breuer, S. Zhuang, S.A. Anderson, J.B. Nardi & M.R. Kanost. 2005.** A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 369-80.
- Li, J., J.W. Tracy, B.M. Christensen & J.Y. Li. 1992.** Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Develop. Comp. Immunol.* 16: 41-48.
- Lima, R.O.R. & E.J. Marques. 1985.** Controle biológico das pragas da cana-de-açúcar no Nordeste. Piracicaba, MIC- Instituto do açúcar e do álcool, p.5-8 (Boletim técnico).
- Lopes, C.S. 2008.** Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 73p.
- Luo, K. & Y. Pang. 2006.** *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *J. Insect Physiol.* 52: 795-806.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2010.** Cultura: Cana-de-açúcar. Fonte consultada: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acessado em 11em novembro de 2012.
- McEvoy, P. B. 1996.** Host specificity and biological pest control. *BioScience* 46: 401-405.
- Mendonça Filho, A.F., S.H. Risco & J.M.B. Costa. 1977.** Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. *Anais da ISSCT* 1: 703-710.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A. F. Mendonça (ed.), *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Moncada, S., R.M.J. Palmer & E.A. Higgs. 1991.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Nakamatsu, Y. & T. Tanaka. 2003.** Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. *J. Insect Physiol.* 49: 149-159.
- Nakamatsu, Y. & T. Tanaka. 2004.** Correlation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*). *J. Insect Physiol.* 50: 135-141.
- Nakamatsu, Y., S. Fujii & T. Tanaka. 2002.** Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with help of teratocytes. *J. Insect Physiol.* 48: 1041-1052.

- Nappi, A.J. & E. Vass. 1998.** Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *J. Parasitol.* 84: 1150-1157.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469–80.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 4: 423-430.
- Nappi, A.J., Y. Carton & F. Frey. 1991.** Parasite-induced enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. *Archives Insect Biochem. Physiol.* 18: 159-168.
- Nappi, A.J., Y. Carton, J. Li & E. Vass. 1992.** Reduced cellular immune competence of a temperature sensitive dopa decarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina bouvardi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101: 453-460.
- Pech, L.L. & M.R. Strand. 2000.** Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J. Insect Physiol.* 46: 1565-1573.
- Pennacchio, F. & M.R. Strand. 2006.** Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 233–58.
- Pereira, C.E.F., R.O.R. Lima & A.M. Vilas Boas. 1977.** Introdução e adaptação de *Apanteles flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), parasito de *Diatraea* spp nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. In Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Entomologia, Goiânia.
- Pinheiro, D.O., G.D. Rossi & F.L. Cônsoli. 2010.** External morphology of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) during larval development. *Zoologia* 6: 986-992.
- Pinto, A.S., J.F. Garcia & P.S.M. Botelho. 2006.** Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In: A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (eds.), Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba, FEALQ, 287p.
- PLANALSUCAR (Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-açúcar), 1985.** Entomologia. p. 36-40. In. Relatório anual. MIC- Instituto do açúcar e do álcool. Piracicaba, SP. 167p.
- PLANALSUCAR/CONOR (Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-açúcar/ Coordenadoria Regional Norte), 1975-1986.** Entomologia. In. Relatório anual. MIC- Instituto do açúcar e do álcool. Carpina, PE.
- Reed, D.A., K.A. Lühring, C.A. Stafford, A.K. Hansen, J.G. Millar, L.M. Hanks & T.D. Paine. 2007.** Host defensive response against an egg parasitoid involves cellular encapsulation and melanization. *Biol. Control* 41: 214-222.

- Richards, E.H. & J.P. Edwards. 2000.** Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 127: 289-298.
- Richards, E.H. & M.P. Dani. 2007.** Venom-induced apoptosis of insect hemocytes, p. 19-36. In D.B. Rivers & J.A. Yoder (eds.), *Recent advances in the biochemistry, toxicity, and mode of action of parasitic wasp venoms.* Kerala - India, Research SignPost, 178p.
- Risco, S.H.B. 1976.** Control biológico de la broca de La cana de azúcar *Diatraea* spp en el Brasil. Relatório de lãs pesquisas y resultados obtenidos durante el período enero/abril/76. Alagoas Planalsucar – Coordenadoria Regional do Nordeste, 37p
- Risco, S.H.B., C.E. Ferreira, A.F. Mendonça, J.M. Brandão, S.M. Sobral & H.D. Souza. 1975.** Observaciones em relacion a La distribucion populacional de *Diatraea* spp em La region cañavelera Del Nordeste de Brasil. Relatório Técnico do PLANALSUCAR, Maceió, Alagoas, 35p.
- Rivers, D.B., and & D.L. Denlinger. 1994.** Developmental fate of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, envenomated by the pupal ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis*. *J. insect Physiol.* 40: 121-127.
- Rivers, D.B., E. Ergin & F. Uçkan. 2007.** Cell death in the host–parasitoid relationship, p. 69–96. In: A.J. Corvin (ed), *New developments in cell apoptosis research.* NY- USA , Nova Science Publishers, 287p.
- Salvador, G. & F.L. Cônsoli. 2008.** Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control* 45: 103-110.
- Silva, C.C.M. 2013.** Associação de *Cotesia flavipes* (Cam.) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 52p.
- Schmidt, O., U. Theopold & M. Strand. 2001.** Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays* 23: 344-51.
- Sorrentino, R.P., Y. Carton & S. Govind. 2002.** Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Develop. Biol.* 243: 65-80.
- Strand, M.R. & J.J. Obrycki, 1996.** Host specificity of insect parasitoids and predators. *BioScience* 46: 422-429.
- Strand, M.R. & L.L. Pech. 1995.** Immunological basic for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 31-56.

- Suzuki, M. & T. Tanaka. 2006.** Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis. *J. Insect Physiol.* 52: 602–611.
- Teramoto, T. & T. Tanaka. 2004.** Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. *J. Insect Physiol.* 50: 1103-1111.
- Thompson, S.N. 2001.** Parasitism enhances the induction of gluconeogenesis by the insect *Maduca sexta* L. *J. Biochem. Cell Biol.* 33: 163-173.
- Turnbull, M. & B. Webb. 2002.** Perspectives on polydnavirus origins and evolution. *Adv. Virus Res.* 58: 203-254.
- Vinson, S.B. & G.F. Iwantsch. 1980.** Host regulation by insect parasitoids. *Q. Rev. Biol.* 55: 143-65.
- Visser, B., C.L. Lann, F.J. Blanken, J.A. Harvey, J.J.M.V. Alphen & J. Ellers. 2010.** Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8677-8682.
- Weaver, R.J., G.C. Marris, H.A. Bell & J.P. Edwards. 2001.** Identity and mode of action of the host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps, p. 33-58. In J.P. Edwards & R.J. Weaver (eds.), *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. Oxford, UK: BIOS Sci.Publ., 309p.
- Webb, B.A., R.L. Rana & D.L. Dahlman. 2001.** Endoparasitoid-mediated disruption of host endocrine systems: common themes through uncommon means, p. 83-93. In J.P. Edwards & R.J. Weaver (eds.), *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. Oxford, UK: BIOS Sci.Publ., 309p.
- Wiegand, C., D. Levin, J.P. Gillespie, E. Willott, M.R. Kanost & T. Trenczek. 2000.** Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 45: 95-108.
- Wharton, R.A. 1993.** Bionomics of the Braconidae. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 121-43.
- Yu, X.Q., Y.F. Zhu, C. Ma, J.A. Fabrick & M.R. Kanost. 2002.** Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1287-1293.
- Zhang, Z., G. Ye, J. Cai & C. Hu 2005.** Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells. *Toxicon* 46: 337-349.

CAPÍTULO 2

Cotesia flavipes (CAM.) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) SUPRIME A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)¹

ELIANA M. PASSOS², VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA³, EDMILSON J. MARQUES², ÁLVARO A.
C. TEIXEIRA³, FÁBIO A. B. SANTOS⁴

²Departamento de Agronomia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de
Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - Universidade Federal de Pernambuco e
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM, Av. Moraes Rego s/n 50670-420, Recife, PE.

¹Passos, E.M., V. Wanderley-Teixeira, E.J. Marques, A.A.C. Teixeira & F.B. Santos. *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) suprime a resposta imunológica de *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). A ser submetido ao Journal Insect Physiology.

RESUMO: A presente pesquisa visou elucidar quais aspectos da resposta imune em *Diatraea flavipennella* (Box) são suprimidos pelo parasitoide *Cotesia flavipes* (Cam.), para garantir o sucesso do parasitismo. Assim, determinou-se a concentração dos níveis de óxido nítrico, fenoloxidase e proteína total. Verificou-se o número total de hemócitos por microlitro de hemolinfa e a porcentagem média destas células. Avaliou-se a capacidade de melanização e encapsulação através da injeção e análise em ultra-estrutura de micro-esferas. Investigou-se a presença de células em apoptose no corpo gorduroso pela técnica de TUNEL. De acordo com os resultados verificou-se redução nos níveis de óxido nítrico e redução na atividade da fenoloxidase nas lagartas parasitadas, aos três dias, e redução do número total de hemócitos aos três e sete dias. Na contagem diferencial, observou-se aumento no número de plasmatócitos e redução de esferulócitos, no terceiro dia de parasitismo. O número de micro-esferas melanizadas, nas lagartas parasitadas, foi inferior mostrando uma melanização menos intensa. A análise ultra-estrutural comprovou o efeito imunossupressor de *C. flavipes* para suprimir a resposta de encapsulação em *D. flavipennella*, pois, somente foi evidenciado a formação de cápsula de hemócitos, aderidas à superfície das micro-esferas, nas lagartas não parasitadas. Como efeito do parasitismo, foi registrado ainda no terceiro dia presença de hemócitos e células do corpo gorduroso em apoptose, além deste último apresentar aspecto de degeneração. Assim, conclui-se que *C. flavipes* é eficiente no controle biológico de *D. flavipennella* por suprimir a resposta imunológica celular e humoral, além de afetar drasticamente o tecido gorduroso.

PALAVRAS-CHAVE: Hemócitos, encapsulação, parasitoide, broca da cana-de-açúcar e resposta humoral

Cotesia flavipes (CAM) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) SUPPRESSES THE IMMUNE
RESPONSE OF *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ABSTRACT: This research aimed to elucidate which aspects of the immune response in *Diatraea flavipennella* (Box) are suppressed by *Cotesia flavipes* (Cam.) parasitoid to ensure the parasitism success. Thus, concentration of nitric oxide levels, phenoloxidase, and total protein were determined. Total number of hemocytes per microliter of hemolymph and the average percentage of these cells were verified. Capacity of melanization and encapsulation by injection and ultrastructural analysis of microbeads were evaluated. Presence of apoptotic cells in fat body was investigated using TUNEL technique. According to results, there was reduction of nitric oxide levels and activity on parasitized larvae at the third day; and in the total number of hemocytes, at the third and seventh days. In differential count, an increase in the number of plasmatocytes and reduction of spherulocytes at the third day of parasitism were observed. The number of melanized microspheres in parasitized larvae was low, showing a less intense melanization. The ultrastructural analysis confirmed the immunosuppressive effect of *C. flavipes* in suppressing the encapsulation response in *D. flavipennella*, because only formation of hemocytes capsule was evidenced adhered to the microspheres surface of the unparasitized larvae. At the third day, presence of hemocytes and fat body cells undergoing apoptosis was also recorded as a parasitism effect; in addition, fat body cells undergoing apoptosis showed degenerative aspect. Thus, it is concluded that *C. flavipes* is efficient for biological control of *D. flavipennella* because it suppresses the cellular and humoral immunological response, in addition to affecting drastically fat tissue.

KEY WORDS: Hemocytes, encapsulation, parasitoid, sugarcane moth borer and humoral response

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, produzindo açúcar e etanol para o mercado interno e externo (MAPA 2012). No entanto, o complexo de brocas *Diatraea* representa um dos principais problemas para esta cultura em todas as regiões de cultivo. As espécies que ocorrem no Brasil são *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Diatraea flavipennella* (Box) (Mendonça 1996). O controle biológico das brocas-da-cana com *Cotesia flavipes* (Cameron) constitui-se em um método de controle eficiente (Pinto *et al.* 2006).

Nos últimos 30 anos houve uma inversão na predominância destas espécies de brocas no estado de Alagoas (Freitas *et al.* 2006) e hoje há predominância de *D. flavipennella*, nos canaviais nordestinos. Tal fato fez surgir entre produtores de cana-de-açúcar à idéia de que *C. flavipes* não é suficiente para controlar esta praga. Além disso, desde que foi introduzido no Brasil, em meados de 1974, o endoparasitoide *C. flavipes* é criado em laboratório sobre *D. saccharalis* e liberado em campo para o controle das duas brocas.

As brocas *D. saccharalis* e *D. flavipennella* apresentam similaridades bioecológicas e a vespa *C. flavipes* não demonstra preferência entre os dois hospedeiros, sendo, capaz de localizar as duas espécies (Freitas *et al.* 2006; Silva *et al.* 2012). Contudo, após a aceitação hospedeira, os imaturos do parasitoide enfrentam uma série de desafios fisiológicos, que podem diminuir suas chances de sobrevivência, sendo os mecanismos de defesa imunológica os maiores desafios enfrentados (Edwards *et al.* 2001).

A encapsulação é o mecanismo de defesa mais usado pelos hospedeiros contra ovos ou imaturos do parasitoide, onde os hemócitos os reconhecem como invasor, fixam-se e formam uma cápsula ao seu redor (Strand & Pech, 1995). A deposição de melanina que ocorre sobre as capsulas ou sobre o próprio invasor é formada durante a oxidação e polimerização de fenóis, por enzimas denominadas fenoloxidasas (Nappi *et al.* 1991, Nappi *et al.* 1992, Beckage 1998).

Moléculas citotóxicas, geradas neste processo, incluem espécies reativas de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNS) assim como de quinóides, intermediários da melanina (Nappi & Ottaviani 2000). Em hospedeiros imunorreativos ocorre o aumento na produção de óxido nítrico (NO), que funciona como molécula efetora na interação com reativos intermediários iniciando a atividade citotóxica empregada na defesa contra invasores (Nappi *et al.* 2000).

A indução da apoptose em tecidos do inseto hospedeiro é descrita como um dos meios necessários para manipular o hospedeiro e garantir o desenvolvimento do parasitoide (Nakamatsu & Tanaka 2003, Zhang *et al.* 2005, Asgari 2006, Rivers *et al.* 2007). Além disso, em hemócitos leva a consequente redução no número destas células e a interrupção da resposta de encapsulação (Teramoto & Tanaka 2004, Luo & Pang 2006, Suzuki & Tanaka 2006, Richards & Dani 2007).

Nesse contexto, não há estudos desta natureza para *C. flavipes* e *D. flavipennella* que contribua para o entendimento da interação hospedeiro-parasitoide. Desta forma, o presente trabalho investigou a resposta imunológica, celular e humoral, além da apoptose no corpo gorduroso, tecido de reservas nutricionais, desencadeadas pelo parasitoide *C. flavipes* sobre o hospedeiro *D. flavipennella*, procurando assim contribuir para a continuidade do programa de controle biológico desta praga nos canaviais nordestinos.

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Patologia de Insetos e de Interação Insetos-Tóxicos, do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ.

Criação de *Diatraea flavipennella*. Inicialmente a criação de *D. falvipennella* foi estabelecida a partir de material biológico, larvas e pupas, coletadas em canaviais da Usina Central Olho D'água,

no Município de Camutanga-Pe. A criação das lagartas foi realizada em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de 70% e fotofase de 12 h) e mantidas sob dieta artificial de Hansley & Hammond (1968) modificada por Araújo *et al.* (1985), constituída de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, sais de Wesson, ácido ascórbico, solução vitamínica, água e anticontaminantes (metilparabeno, formol e ácido nalidixico). Ao formarem pupas, estas foram transferidas para câmara úmida até a emergência dos adultos, os quais foram confinados em gaiolas de PVC (15x22cm) revestida com papel sulfite, como substrato para oviposição, e como substrato alimentar foi oferecido solução de mel (5%). Os ovos coletados foram esterilizados por cinco minutos em formol (3%) e em sulfato de cobre (1%), secos e armazenados em câmara úmida, até eclosão das neonatas, distribuídas para tubos de ensaio contendo dieta de alimentação. Após trinta dias, as lagartas foram transferidas para caixas plásticas, com dieta de realimentação, constituída de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, ácido ascórbico, solução vitamínica, água e anticontaminantes (metilparabeno, formol, ácido nalidixico e ácido acético). Esses procedimentos foram realizados até a obtenção do número de insetos adequados para realização dos experimentos.

Parasitismo. Os parasitoides utilizados foram fornecidos pela ASPLAN-PB (Associação dos Plantadores de Cana-de-açúcar da Paraíba) ainda na fase de pupa (massas). As quais foram depositadas dentro de copos, com orifício de inoculação na parte superior. Para o parasitismo foram utilizados adultos de *C. flavipes*, com 24h de idade, onde lagartas de *D. flavipennella* (sexto ínstar) foram levadas próximas ao orifício procurando-se a fêmea, que depositava seus ovos no interior das lagartas. Lagartas parasitadas e não parasitadas foram individualizadas em potes plásticos com dieta de realimentação, para posterior utilização nos experimentos.

Análise dos Níveis de Óxido Nítrico, Fenoloxidase e Proteínas Totais na Hemolinfa. A concentração de óxido nítrico foi determinada com base no reagente de Griess (Green *et al.* 1981), seguindo o protocolo da Promega Corporation. Inicialmente, 20 μL de hemolinfa foram

misturados a 90 μL de sulfanilamida (1%) em H_3PO_4 (5%), em microtubos. Imediatamente, após a coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização. Para determinar as concentrações de NO_2^- , uma alíquota de 30 μL de cada amostra foi depositada em placa de fundo chato de 96 poços em triplicata, aos quais acrescentaram-se 30 μL de sulfanilamida (1%) em H_3PO_4 (5%). Estas placas foram mantidas ao abrigo da luz, por 10 minutos, e em seguida adicionou-se 30 μL de naphthylenediamine dihydrochloride (NEED, Sigma, St. Louis, MO), sendo mais uma vez mantida ao abrigo da luz por 10 minutos. Após este intervalo a absorbância foi medida em leitor de microplacas (Biotek®) com filtro de 562 nm. A quantidade de nitrito (NO_2^-) nas amostras foram correlacionadas com valores de absorbância obtidos a partir da curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) como referência. Na avaliação dos níveis de fenoloxidase, 10 μL de hemolinfa coletada foi depositado em microtubos contendo 100 μL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 (PBS), constituindo a amostra. Imediatamente, após a coleta, as amostras também foram armazenadas a -20°C até a dosagem. No momento da dosagem 30 μL da amostra foi depositada em placa de fundo chato, em triplicata, as quais foram adicionadas 30 μL de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). As medidas de absorbância da atividade da fenoloxidase (PO) foram lidas, durante 31 minutos com intervalos de um minuto, em filtro de 490 nm em leitora (Biotek®). Assim determinou-se a atividade cinética da fenoloxidase por μL de hemolinfa, o V_{max} , obtido utilizando o Software Gen 5. Onde uma unidade da enzima foi definida como a mudança de 0,001 na densidade óptica, a 490 nm, por minuto. A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada através de teste colorimétrico, utilizando-se o Kit comercial (Comassie Plus Protein, Pierce Biotechnology), baseado no teste de Bradford (1976) e albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão. Para tanto 10 μL da amostra, utilizada para a análise da fenoloxidase, foi mistura a 300 μL de reagente, em placa de fundo chato, e lida a absorbância de 595 nm, após 10 minutos. A concentração dos níveis de óxido nítrico, fenoloxidase e proteína

total foram comparadas entre lagartas não parasitada e parasitada, no período de zero, três e sete dias. Para o tempo zero dia, a coleta da hemolinfa foi realizada após quatro horas da inoculação da lagarta pelo parasitoide. Esses períodos foram estudados em virtude da resposta humoral ser mais rápida que a resposta celular. Desta forma, procurou-se verificar a resposta desses componentes em diferentes momentos do parasitismo. Para estas dosagens utilizaram-se 10 repetições, por tratamento e intervalo de tempo, sendo cada repetição representada pela hemolinfa coletada de uma lagarta. A hemolinfa foi coletada com ajuda de uma micropipeta (Kacil) após incisão, com tesoura oftalmológica, na região meso-pleural da lagarta. Os dados de óxido nítrico, fenoloxidase e proteína total foram submetidos à análise de variância, sendo transformados quando necessário em $\sqrt{(x + 0,5)}$. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e/ou pelo teste t a 5% de probabilidade, empregando o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Contagem Diferencial e Total dos Hemócitos. Um volume de 5 μL de hemolinfa foi coletado seguindo a metodologia descrita acima. Em seguida, o material foi misturado a 20 μL de tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,2 (PBS) em microtubos. Deste, amostras de 10 μL foram transferidas para câmara de Neubauer e o número total de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado. Para contagem diferencial dos hemócitos, depositou-se 5 μL de hemolinfa sobre 5 μL de PBS diretamente em lâmina de vidro e realizado o esfregaço, os quais foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 min permitindo adesão dos hemócitos à lâmina. O material foi fixado em metanol (PA) por cinco minutos, sendo em seguida submetido à coloração pelo Giemsa, também por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram cuidadosamente lavadas com água destilada para retirar excesso de corante da amostra, e deixadas para secar em temperatura ambiente para posterior montagem com Entellan. A quantificação das diferentes células foi realizada em microscópio de luz OLYMPUS® BX-49, utilizando-se a objetiva de 100X. A média do percentual dos tipos de células, presentes na hemolinfa, foi determinado a

partir da contagem de 300 células, por repetição, seguindo metodologia de Falleiros *et al.* (2003). Em ambas as contagens de hemócitos utilizaram-se 10 repetições, para cada tratamento e intervalo de tempo, sendo cada repetição representada pela hemolinfa coletada de uma lagarta. Os intervalos de tempo avaliados foram zero, um, três, cinco, sete e nove dias após a exposição das lagartas ao parasitoide, para a contagem total dos hemócitos. A contagem diferencial foi realizada apenas nos intervalos que apresentaram diferenças na contagem total. Os resultados da contagem total e diferencial foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial. As médias foram comparadas através do teste de *t* a 5% de probabilidade, sendo os dados da contagem total e de esferulócitos transformados em $\sqrt{(x + 0,5)}$. Todas as análises foram conduzidas empregando o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Teste de Melanização. Para verificar a capacidade de supressão de *C. flavipes* sobre a resposta de encapsulação de *D. flavipennella*, micro-esferas tipo Deae Sephadex A-50 (Sigma), com diâmetro variando de 40 a 120 μm , foram suspensas em PBS (0,1M; pH 7,2) na concentração 20 mg/ml. Cerca de 15 μl desta suspensão foi injetada, com seringa de insulina em lagartas, de 6^o instar, não parasitadas e parasitadas com 1 e 5 dias, esses intervalos foram utilizados visando analisar a encapsulação antes e após a eclosão da larva e com a presença dos teratócitos. A avaliação foi feita, sob estereoscópico, vinte e quatro horas após a injeção da suspensão, e as micro-esferas coletadas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) para posterior análise em ultra-estrutura. Neste bioensaio utilizou-se 15 repetições, cada repetição representada por uma lagarta, para cada período estudado, nas lagartas parasitadas e não parasitadas, totalizando 60 lagartas. Os dados de contagem das esferas melanizadas foram comparados pelo Mann-Whitney's U-test ($p < 0,05$), pelo programa Instat.

Teste de Encapsulação. Com o objetivo de investigar se houve ou não a formação de camadas de células foi realizada a análise em ultra-estrutura das esferas coletadas no bioensaio anterior. As

micro-esferas recuperadas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, PFA 4% e tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e pós-fixada em tetróxido de Ósmio (OsO_4) a 2% (1:1), por 1h. Em seguida procedeu-se mais três lavagens em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e a desidratação em séries crescentes de acetona (de 30, 50, 70, 90 e 3x de 100%) por 30 min cada, a temperatura ambiente. A infiltração foi realizada em resina EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) e acetona em temperatura ambiente. O material foi emblocado em moldes flexíveis e posto para polimerizar a 70°C por 72h. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (Reichert Ultracut), contrastados em acetato de uranila por 1h e em citrato de chumbo por 10 min e analisado em microscópio Zeiss[®] EM109.

Apoptose no Corpo Gorduroso. Inicialmente para a obtenção dos cortes histológicos lagartas inteiras, com 3 e 9 dias de parasitismo e não parasitadas, foram fixadas em formol tamponado a 10%, seccionadas e diafanizados em xilol e incluídos em parafina, de onde obteve-se cortes com 7 μm da região mediana da lagarta. Apartir dos cortes a presença da apoptose no corpo gorduroso em lagartas de *D. flavipennella* parasitadas por *C. flavipes* foi verificada utilizando a técnica de TUNEL para cortes histológicos em parafina, segundo o protocolo ApopTag[®] Plus.

Resultados

Análise dos Níveis de Óxido Nítrico, Fenoloxidase e Proteínas Totais na Hemolinfa. Os níveis de óxido nítrico na hemolinfa das lagartas parasitadas diferiram das não parasitadas, aos três e sete dias. Registrou-se uma redução nos níveis de oxido nítrico nas lagartas parasitadas aos três dias após o parasitismo (Tabela 1). A atividade da enzima fenoloxidase na hemolinfa de *D. flavipennella* foi alterada pelo parasitismo de *C. flavipes*, na Figura 1 observa-se mudanças nos

níveis da enzima na hemolinfa durante 31 minutos, e na Figura 2 verifica-se as diferenças na atividade cinética (V_{max}) da fenoloxidase. Em ambos foi evidenciada uma redução na atividade da enzima aos três dias nas lagartas parasitadas em comparação as lagartas não parasitadas. Verificou-se redução significativa nos níveis de proteínas totais na hemolinfa de *D. flavipennella* parasitada por *C. flavipes*, aos sete dias (Fig. 3).

Contagem Total e Diferencial de Hemócitos. A dinâmica hemocitária de *D. flavipennella* foi alterada pelo parasitismo de *C. flavipes* ($F_{11, 83} = 6,05$; $P < 0,0001$). Havendo diferenças no número total de hemócitos entre as lagartas parasitadas e não parasitadas, no período avaliado ($F_{1,83} = 8,41$; $P = 0,0049$), e uma variação na quantidade de hemócitos com o tempo, nos tratamentos testados ($F_{5,83} = 9,52$; $P < 0,0001$). Contudo, não houve interação entre tempo e tratamento ($F_{5,83} = 2,11$; $P = 0,0738$). As diferenças no número de hemócitos totais entre os tratamentos ocorrem nos intervalos de três e sete dias após a exposição ao parasitoide, com redução no número de hemócitos nas lagartas parasitadas (Fig. 4). Dentre os tipos de hemócitos encontrados, os plasmatócitos e esferulócitos foram os mais frequentes, enquanto os demais, prohemócitos, granulócitos, oenocitóides e adipohemócitos, ocorreram em proporções muito baixas, inferior a 5 e 2% aos três e sete dias, respectivamente. Assim, somente a porcentagem média de plasmatócitos e esferulócitos diferiu em função do tratamento, tendo registrado aumento no número de plasmatócitos e redução de esferulócitos, aos três dias de parasitismo (Fig. 5).

Teste de Melanização. A análise estereomicroscópica mostrou a presença de melanização das micro-esferas nas lagartas não parasitadas e parasitadas, no entanto, essa reação foi mais intensa nas lagartas não parasitadas (Figs. 6A, 6B e 6C). Nas lagartas com cinco dias de parasitismo foi possível observar a presença de larvas do parasitoide na hemocele da lagarta (Fig. 6D). O número de micro-esferas melanizadas nos dois períodos de parasitismo avaliados, primeiro e quinto dia,

diferiu entre as lagartas parasitadas e não parasitadas, observando-se redução progressiva ao longo do tempo (Fig. 7).

Teste de Encapsulação. A análise ultra-estrutural comprovou o efeito imunossupressor dos mecanismos utilizados pelo parasitoide *C. flavipes* para suprimir a resposta imune celular em *D. flavipennella*. Tendo sido revelado a formação de camadas de hemócitos, aderidas à superfície da micro-esfera formando uma cápsula, nas lagartas não parasitadas no primeiro e quinto dia. Essa cápsula é constituída basicamente por plasmatócitos, células com morfologia alongada, extremamente justapostas, apresentando projeções citoplasmáticas (Figs. 8A, 8B, 9A e 9B). Diferentemente, nas lagartas com um e cinco dias de parasitismo, injetadas com as micro-esferas, não houve formação de uma cápsula de hemócitos ao redor do corpo estranho. Os granulócitos foram às células mais frequentes no primeiro dia, mostrando intenso processo de degranulação, e algumas com núcleo picnótico, porém, no quinto dia essas células foram pouco frequentes, sem degranular. Verificou-se ainda a presença de granulócito binucleado (Figs. 8C, 8D, 8E, 8F, 9C e 9D). Os teratócitos só foram evidenciados no quinto dia de parasitismo apresentando formato elíptico com microvilos, núcleo irregular bastante eucromático com áreas de heterocromatina. No citoplasma evidenciou-se retículo endoplasmático bem desenvolvido e vesículas. (Fig. 9C, 9E e 9F).

Apoptose no Corpo Gorduroso. Verificou-se a presença de núcleos apoptóticos, marcados positivamente pela técnica de TUNEL, no corpo gorduroso de lagartas não parasitadas e parasitadas três dias após o parasitismo. Nestes, a marcação ocorreu tanto no corpo gorduroso parietal, logo abaixo do tegumento, quanto no corpo gorduroso perivisceral, em torno do tubo digestivo. Vale ressaltar que a marcação foi mais frequente no corpo gorduroso nas larvas parasitadas, além dos mesmos apresentarem-se com aspecto de degeneração. Evidenciou-se ainda

nas lagartas parasitadas a presença de hemócitos próximos ao corpo gorduroso parietal com núcleos marcados positivamente, o que indica a sua fragmentação (Figs. 10A-D). Aos nove dias após o parasitismo a hemocele da lagarta é ocupada basicamente pelas larvas do parasitoide e o corpo gorduroso se restringe basicamente a uma fina camada na região parietal, no qual não foi verificada a presença de núcleos em apoptose (Figs. 10E e 10F).

Discussão

O parasitismo de larvas de lepidópteros por endoparasitoides geralmente esta associada com a supressão da imunidade, humoral e celular, do hospedeiro (Bae & Kim 2004). Entretanto, o papel de cada um dos componentes utilizados pelo parasitoide para manipular aspectos fisiológicos, e suprimir a defesa do hospedeiro, varia com as espécies envolvidas na interação hospedeiro-parasitoide (Asgari & Rivers 2011). Verificou-se pelos aspectos imune estudados neste trabalho, que o endoparasitoide *C. flavipes* garante o seu desenvolvimento em *D. flavipennella* não só mediante a supressão da resposta imunológica, celular e humoral, bem como por ocasionar apoptose e degradação do corpo gorduroso.

A interferência nos níveis de óxido nítrico, ativação da fenoloxidase e dinâmica hemocitária somente foi evidenciada a partir do terceiro dia de parasitismo, Este fato provavelmente é devido a liberação dos teratócitos, provenientes do ovo do parasitoide, que ocorre de dois a três dias após o parasitismo, como verificado em *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* (Conte *et al.* 1995). Entretanto, a capacidade de encapsulação das micro-esferas pelo hospedeiro parasitado foi afetada 24 horas após parasitismo, e suprimida após cinco dias. De acordo com a literatura no primeiro dia de parasitismo ocorre supressão da melanização e da encapsulação, devido aos fatores imunossupressores de origem materna, como proteínas ovarianas, veneno, e polydnavirus. Contudo, ela se torna mais acentuada com a presença, de fatores imunossupressores de origem

embrionária, como os teratócitos e da própria larva do parasitoide (Dahlman & Vinson 1993, Strand & Pech 1995, Bae & Kim 2004, Beckage & Gelman 2004), fato que justifica o comportamento de parasitismo de *C. flavipes* em *D. flavipennella*.

A produção de óxido nítrico (NO) foi suprimida pelo parasitoide, visto que em hospedeiro imunorreativo ocorre um aumento na produção de NO, o qual se comporta como molécula efetora na interação com reativos intermediários, iniciando a atividade citotóxica contra o invasor (Nappi *et al.* 2000). Além disso, o NO atua como molécula de sinalização no recrutamento de hemócitos para o sítio de infecção (Foley & O` Farel 2003, Nappi 2010). Da mesma forma, foi observado redução na atividade da fenoloxidase em decorrência do parasitismo, o que tem sido registrada em outras espécies (Bae & Kim 2004, Mabiala-Moundougou *et al.* 2010). Inclusive, Mahmoud *et al.* (2012) demonstraram que *C. flavipes* inibe a atividade enzimática da fenoloxidase em *D. saccharalis*. A redução da atividade dessa enzima tem sido acompanhada pela redução na melanização, onde a melanina, principal produto da ativação do sistema de profenoloxidase, deixa de agir sobre o invasor (Carton & Nappi 1997, Lavine & Beckage 1995, Bae & Kim 2004). Segundo Ashida & Brey (1998) o sistema de profenoloxidases (proPO) pode está ainda envolvido na produção de opsoninas, desta forma, a sinalização da presença do corpo estranho também poderia está sendo comprometida. Assim, evidencia-se a interação entre os fatores imunes, humoral e celular, onde hemócitos são importantes produtores de moléculas humorais e os fatores humorais afetam a função dos hemócitos, como o NO e PO no recrutamento destas células (Lavine & Strand 2002, Ribeiro & Brehélin 2006).

A maneira mais direta de prevenção da encapsulação, resposta imune esperada frente ao parasitismo, é destruir, retirar de circulação, ou alterar o comportamento dos hemócitos que medeiam a encapsulação (Strand & Pecch 1995). O que foi verificado na presente pesquisa pela redução do número total dessas células, semelhante ao registrado em outros insetos após o

parasitismo (Alleyne & Wiedenmann 2001, Ibrahim & Kim 2006, Mabiala-Moundougou *et al.* 2010).

Plasmatócitos e granulócito são os hemócitos que participam mais ativamente da resposta de encapsulação (Ibrahim & Kim 2006). Na contagem diferencial dos hemócitos, realizada neste trabalho, registraram-se aumento no número de plasmatócitos e redução de esferulócitos, aos três dias de parasitismo. Ling & Yu (2006), também encontraram esferulócitos participando da encapsulação de corpo estranho, em *Maduca sexta*. (Linnaeus). E ainda, segundo Sass *et al.* (1994) estes hemócitos estão envolvidos no transporte de componentes cuticulares.

Para assegurar o efeito imunossupressor de *C. flavipes* sobre a resposta imune de encapsulação em *D. flavipennella* foram injetadas micro-esferas nas lagartas, e visualizadas poucas micro-esferas melanizadas, nas lagartas parasitadas. Estudos têm mostrado a deficiência na melanização e formação de nódulos ao redor de partículas estranhas, ou mesmo de microorganismos, em decorrência do comprometimento do sistema imune, na presença de fatores imunossupressores do parasitoide (Er *et al.* 2010, Mahmoud *et al.* 2011 e 2012). Em *D. saccharalis*, por exemplo, a melanização e encapsulação, de micro-esferas foram suprimidas pelo parasitoide *C. flavipes*, contudo, esse mesmo parasitoide ao parasitar um hospedeiro considerado “refratário”, como *M. sexta*, tem seus ovos encapsulados e melanizados pelos hemócitos (Rodrigues-Pérez *et al.* 2005, Mahmoud *et al.* 2011).

Por meio das eletromicrografias das esferas melanizadas, foi confirmado o comprometimento da resposta imune nas lagartas parasitadas, onde registrou-se somente uma tentativa de encapsulação. Visto que, no processo de encapsulação, os granulócitos são as primeiras células a fazer reconhecimento do corpo estranho, as quais se fixam a ele e liberam o seu conteúdo, formando uma matriz adesiva, na superfície do alvo, que induz a deposição de múltiplas camadas de plasmatócitos (Beckage 2006). Desta forma, o sucesso na encapsulação

depende do reconhecimento do invasor e da presença de quantidade suficientemente grande de hemócitos, para a formação da cápsula (Strand & Pech 1995, Lavine & Strand 2002, Carton *et al.* 2005).

A ineficácia no processo de encapsulação, devido à redução no número de hemócitos circulantes, vem sendo atribuída a ocorrência de apoptose nos hemócitos e histólise do órgão hematopoiético (Teramoto & Tanaka 2004, Luo & Pang 2006, Suzuki & Tanaka 2006, Richards & Dani 2007). Foram visualizados alguns hemócitos com núcleos apoptóticos, em lagartas parasitadas aos três dias de parasitismo. Contudo, devido a pequena quantidade de amostra, não nos é permitido atribuir a falha na encapsulação em *D. flavipennella* parasitada por *C. flavipes* à apoptose dos hemócitos.

A apoptose pode ocorrer também em tecidos selecionados do inseto hospedeiro (Rivers *et al.* 2007). Foi verificado no presente estudo, a presença de células em apoptose no corpo gorduroso de lagartas não parasitadas e parasitadas, três dias após o parasitismo. Nas lagartas não parasitadas a apoptose deve ser resultado da proximidade com o período pupal, visto que em lepidopteros ocorre a degradação, autofágica, de órgãos larvais durante a metamorfose, a qual é considerada como uma forma de morte celular programada (Müller *et al.* 2004). Além disso, observou-se uma diferenciação no aspecto estrutural do tecido gorduroso, o qual quando parasitado se mostra menos desenvolvido e com aspecto de degeneração e segundo Teramoto & Tanaka (2004), alterações morfológicas no corpo gorduroso, como núcleo fortemente atrofiado, ocorre devido ao parasitismo. Assim, pode-se concluir que *C. flavipes* é eficiente no controle biológico de *D. flavipennella* por suprimir a resposta imunológica celular e humoral, além de afetar drasticamente o corpo gorduroso, tecido de reserva

Literatura Citada

- Alleyne, M. & R.N. Wiedenmann. 2001.** Encapsulation and total hemocyte numbers in three lepidopteran stemborers parasitized by *Cotesia flavipes* – complex endoparasitoids. *Entomol. Exp. Appl.* 100: 279-293.
- Araújo, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC, Rev. Tecnol. Indúst. Açuc. Alcool.* 36:45-48.
- Asgari, S. & D.B. Rivers. 2011.** Venom Proteins from Endoparasitoid Wasps and Their Role in Host-Parasite Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 313-335.
- Asgari, S. 2006.** Venom proteins from the polydnavirusproducing endoparasitoids: their role in host–parasiteinteractions. *Arch. Insect Biochem.* 61: 146-156.
- Ashida, M. & P.T. Brey, 1998.** Recent advances in research an the insect prophenoloxidase cascade. p.135-172. In P. Brey & D. Hultmark (eds.). *Molecular mechanisms of immune responses in insects.* Chapman & Hall, London, 340p.
- Bae, S. & Y. Kim. 2004.** Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Comp. Biochem. Physiol.* 138: 39-44.
- Beckage, N.E. & D.B. Gelman. 2004.** Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 299-330.
- Beckage, N.E. 1998.** Parasitoids and polydnaviruses. *Bioscience* 48: 305-311.
- Beckage, N.E. 2006.** *Insect Immunoloy*, p. 243-270. In T. D. Schowalter, *Insect Ecology: An Ecosystem Approach.* Academic Press, 572 p.
- Bradford, M.M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Carton, Y. & A.J. Nappi. 1997.** *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasit. Today* 13: 218-227.
- Carton, Y., A.J. Nappi & M. Poirié. 2005.** Genetics of antiparasite resistance in invertebrates. *Develop. Comp. Immunol.* 29: 9-32.
- Conte, H., S.B. Vinson, C. Cruz-Landim. 1995.** Ultrastructure of teratocytes in the hemolymph of *Diatraea saccharalis* (Lep.; Pyralidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Hym.; Braconidae). *Acta Microsc.*4: 154-154.

- Dahlman, D.H. & S.B. Vinson. 1993.** Teratocytes: developmental and biochemical characteristics, p. 145-165. In N.E. Beckage, S.N. Thompson & B.A. Federici (eds.), *Parasites and pathogens of insects*. San Diego, Academic Press, 294p.
- Edwards, J.P., R.J. Weaver & G.C. Marris. 2001.** Endocrine changes in lepidopteran larvae: Potential challenges to parasitoid development and survival, p. 1-32. In J.P. Edwards & R.J. Weaver (eds.), *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. Oxford, UK: BIOS Sci. Publ., 309p.
- Er, A., F. Uçkan, D.B. Rivers & O. Sak. 2010.** Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*. *J. Appl. Entomol.* 135: 225-236.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Technol.* 46: 287-294.
- Foley, P.H. & F.E. O' Farel. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Devel.* 17: 115- 125.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'Ana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Fl. Entomol.* 89: 539-540.
- Green, L.C., K.R. de Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7764-7768.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond Jr. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743.
- Ibrahim, A.M.A. & Y. Kim. 2006.** Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *J. Insect Physiol.* 52: 943-950.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol. Biol.* 32:1295–309.
- Lavine, M.D. & Beckage, N.E. 1995.** Polydnviruses, potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitol. Today* 11, 368-378.
- Ling, E. & X.Q. YU. 2006.** Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 289-299.
- Luo, K. & Y. Pang. 2006.** *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirusinhibits *Microplitis bicoloratus* polydnvirus-induced host granulocytes apoptosis. *J. Insect Physiol.* 52: 795-806.

- Mabiala-Moundougou, A.D.N., G. Doury, P. Eslin, A. Cherqui & G. Prévost. 2010.** Deadly venom of *Asobara japonica* parasitoid needs ovarian antidote to regulate host physiology. *J. Insect Physiol.* 56: 35-41.
- Mahmoud, A.M.A., E.J. Luna-Santillana & M.A. Rodríguez-Pérez. 2011.** Parasitism by the endoparasitoid wasp *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances the susceptibility of *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Sci.* 11:119 available online: insectscience.org/11.119.
- Mahmoud, A.M.A., E.J. Luna-Santillana, X. Guo, F. Reyes-Villanueva & M.A. Rodríguez-Pérez. 2012.** Development of the braconid wasp *Cotesia flavipes* in two Crambids, *Diatraea accharalis* and *Eoreuma loftini*: Evidence of host developmental disruption. *J. Asia Pac. Entomol.* 15: 63-68.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2012.** Cultura: Cana-de-açúcar. Fonte consultada: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acessado em 11em novembro de 2012.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Mendonça (ed.), *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Müller, F., C. Ádori & M. Sass. 2004.** Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Eur. J. Cell Biol.* 83: 67-78.
- Nakamatsu, Y. & T. Tanaka. 2003.** Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separate* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. *J. Insect Physiol.* 49: 149-159.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469-80.
- Nappi, A.J. 2010.** Cellular immunity and pathogen strategies in combative interactions involving *Drosophila* hosts and their endoparasitic wasps. *ISJ*: 198-210.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 4: 423-430.
- Nappi, A.J., Y. Carton & F. Frey. 1991.** Parasite-induced enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 18: 159-168.
- Nappi, A.J., Y. Carton, J. Li & E. Vass. 1992.** Reduced cellular immune competence of a temperature sensitive dopa decarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina boulardi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101: 453-460.

- Pinto, A.S., J.F. Garcia & P.S.M. Botelho. 2006.** Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (eds.), Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba, FEALQ, 287p.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect haemocytes: What type of cell is that? J. Insect Physiol. 52: 417-429.
- Richards, E.H. & M.P. Dani. 2007.** Venom-induced apoptosis of insect hemocytes, p. 19-36. In D.B. Rivers & J.A. Yoder (eds.), Recent advances in the biochemistry, toxicity, and mode of action of parasitic wasp venoms. Kerala - India, Research SignPost, 178p.
- Rivers, D.B., E. Ergin & F. Uçkan. 2007.** Cell death in the host–parasitoid relationship, p. 69–96. In A.J. Corvin (ed), New developments in cell apoptosis research. NY- USA , Nova Science Publishers, 287p.
- Rodríguez-Pérez, M.A, R.F. Dumpit, J.M. Lenz, E.N. Powell, S.Y. Tam & N.E. Beckage. 2005.** Host refractoriness of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, to the braconid endoparasitoid *Cotesia flavipes*. Arch Insect Biochem Physiol. 60: 159-71.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Sass, M., A. Kiss & M. Locke. 1994.** Integument and hemocyte peptides. J Insect Physiol 40: 407-421.
- Silva, C.C.M., E.J. Marques, J.V.Oliveira e & E.C.N. Valente. 2012.** Preference of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) for *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae). Acta Sci. Agron. 34: 23-27.
- Strand, M.R. & L.L. Pech. 1995.** Immunological basic for compatibility in parasitoid-host relationships. Annu. Rev. Entomol. 40: 31-56.
- Suzuki, M. & T. Tanaka. 2006.** Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis. J. Insect Physiol. 52: 602–611.
- Teramoto, T. & T. Tanaka. 2004.** Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. J. Insect Physiol. 50: 1103-1111.
- Zhang, Z., G. Ye, J. Cai & C. Hu. 2005.** Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells. Toxicon 46: 337-349.

Tabela 1. Concentrações de óxido nítrico (μM de NO_2^- / μL de hemolinfa) em lagartas de *Diatraea flavipennnella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*.

| Tempo | Parasitada | Não parasitada | <i>t</i> -estatística ^{P1} |
|--------------------------|---|--|-------------------------------------|
| 0 dia | 8,7 ± 1,02 Aa | 10,1 ± 0,89 Aa | -1,06 ^{0,3047} |
| 3 ^o dia | 5,4 ± 0,26 Ab | 9,4 ± 0,93 Ba | -4,05 ^{0,0021} |
| 7 ^o dia | 10,7 ± 1,16 Aa | 7,2 ± 0,90 Ba | 2,27 ^{0,0353} |
| Estatística ² | F _{2,29} = 11,46 ^{P=0,0002} | F _{2,29} = 2,81 ^{P=0,0782} | |

¹Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem pelo teste *t* ($P>0,05$);

²Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$);

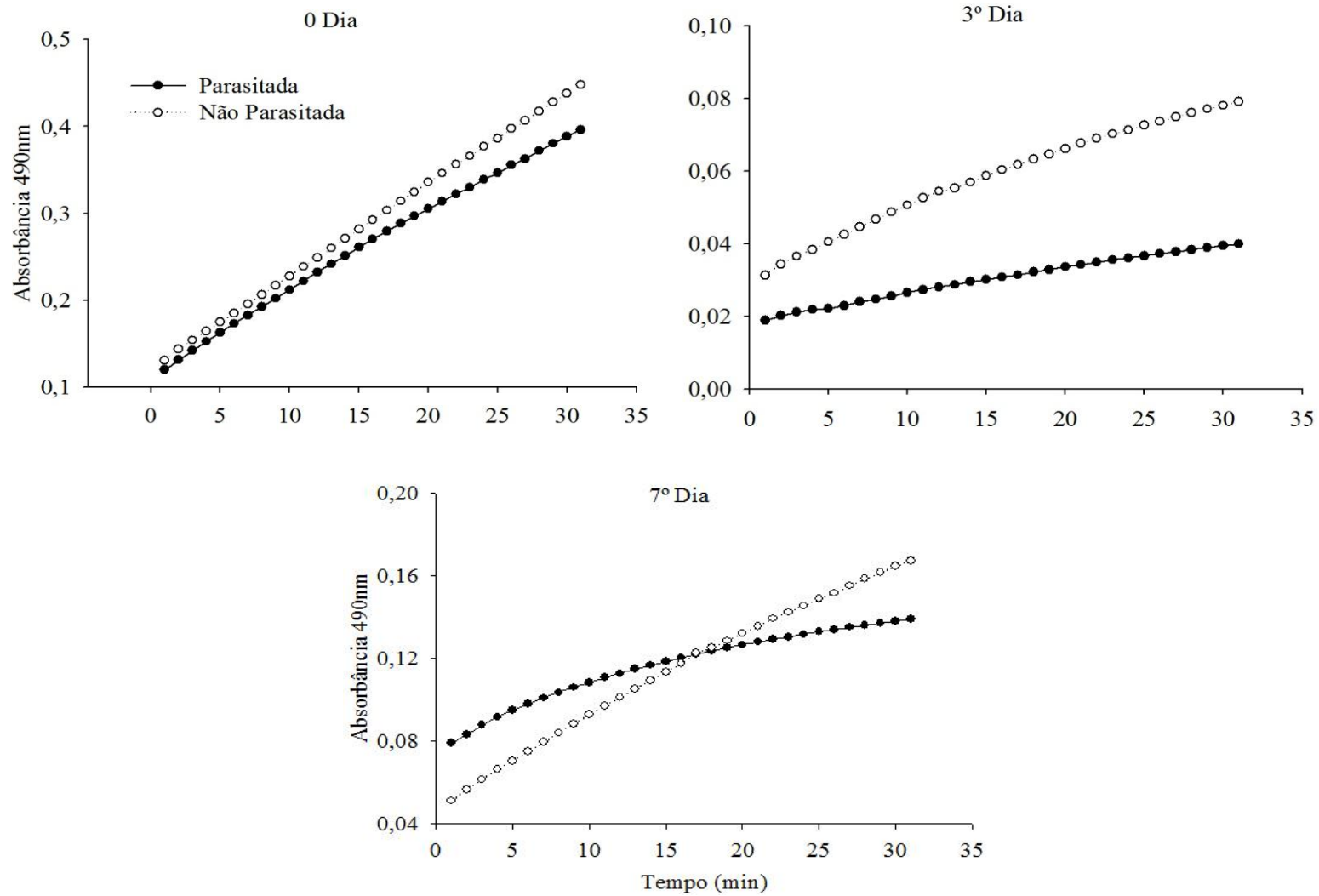


Figura1. Atividade da fenoloxidase, absorbância a 490 nm, em diferentes períodos de avaliação, em lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*.

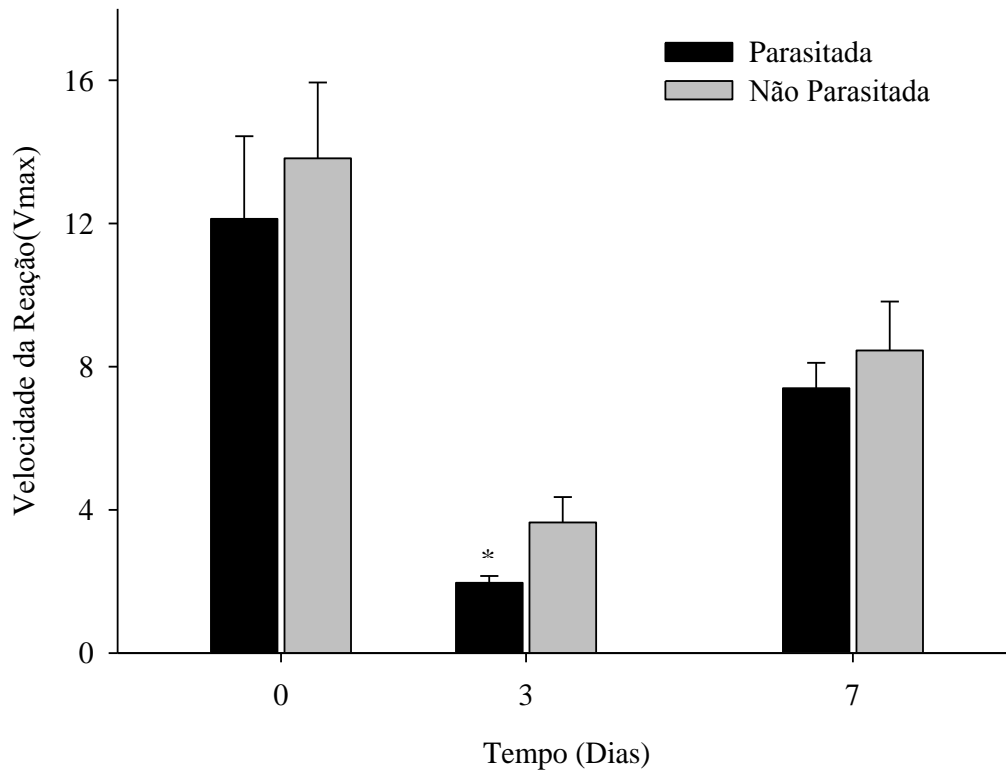


Figura 2. A atividade cinética da fenoloxidase, velocidade da reação ($\Delta \text{Abs}/\text{min}^{-1}$) em lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*. *Diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($P < 0,05$).

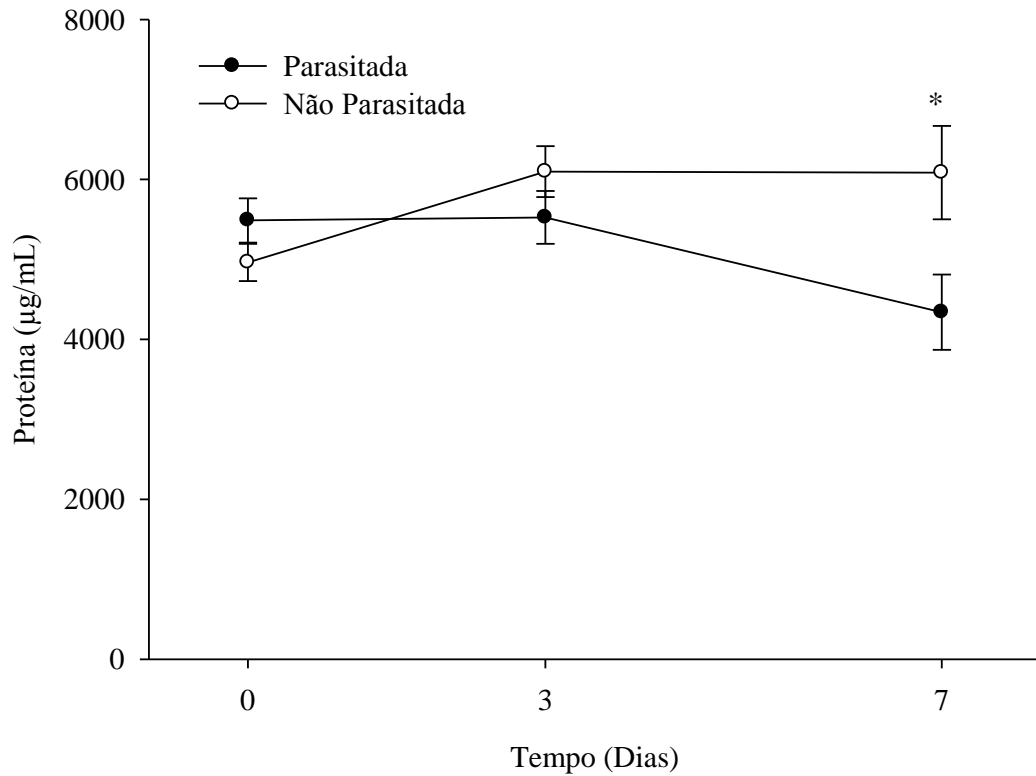


Figura 3. Concentrações de proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$ de hemolinfa) em lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*. *Diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($P < 0,05$).

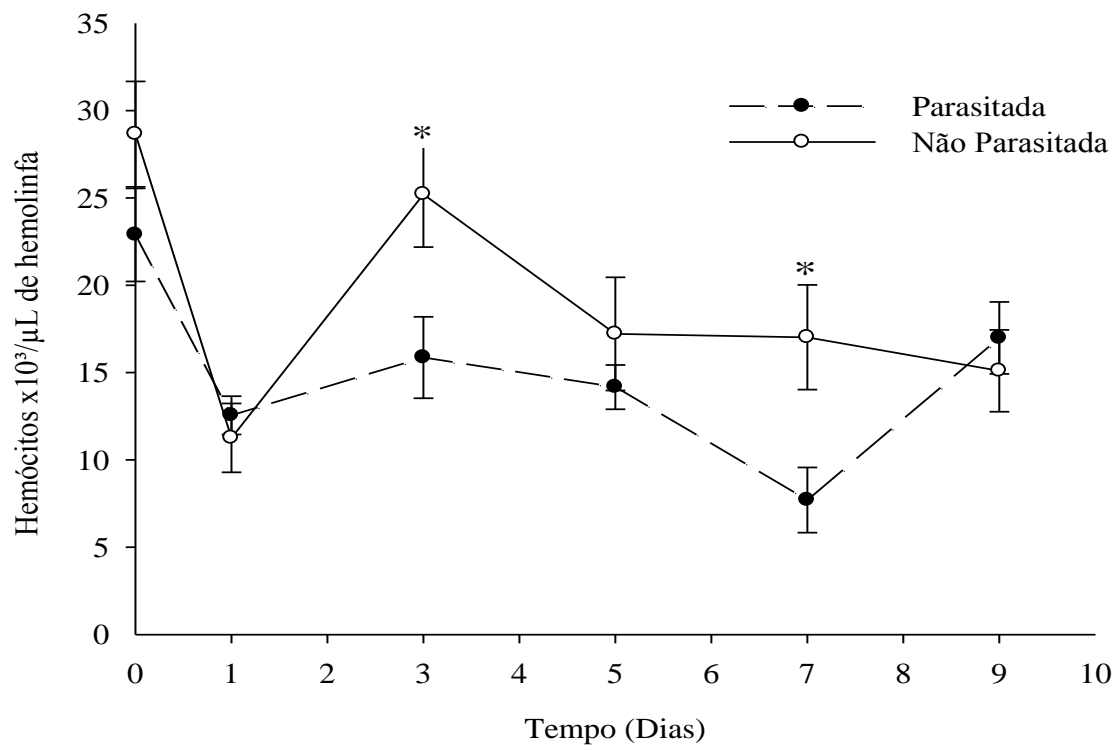


Figura 4. Número total de hemócitos de lagartas de *Diatraea flavipennella* (Média ± EP), não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*. *Diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($P < 0,05$).

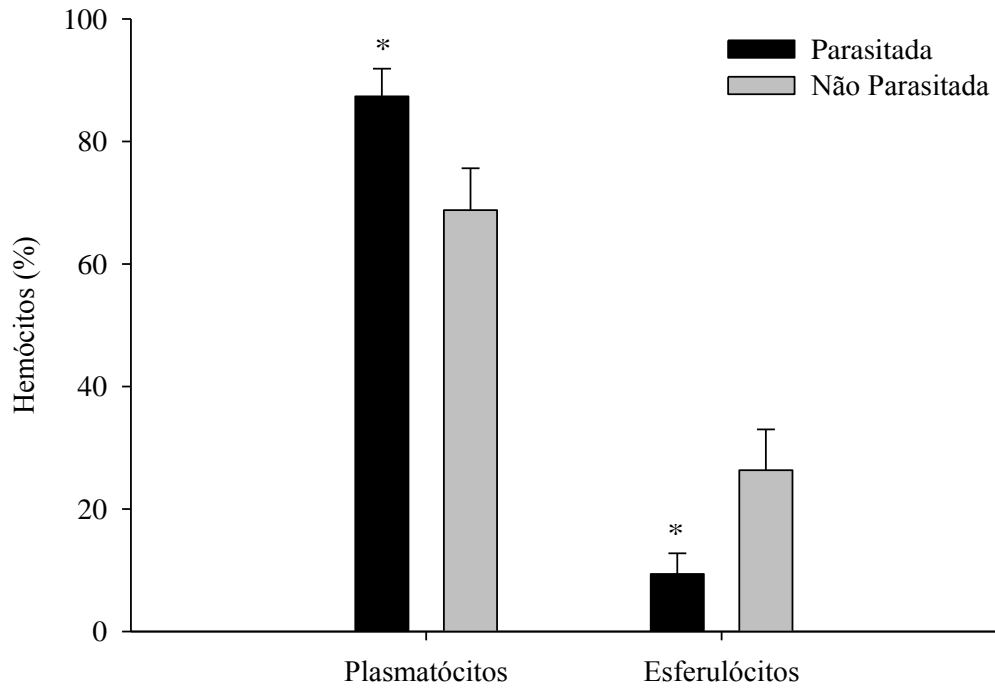


Figura 5. Média (+EP) da contagem diferencial (%) dos hemócitos de lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*, no terceiro dia de parasitismo.

*Diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($P < 0,05$).

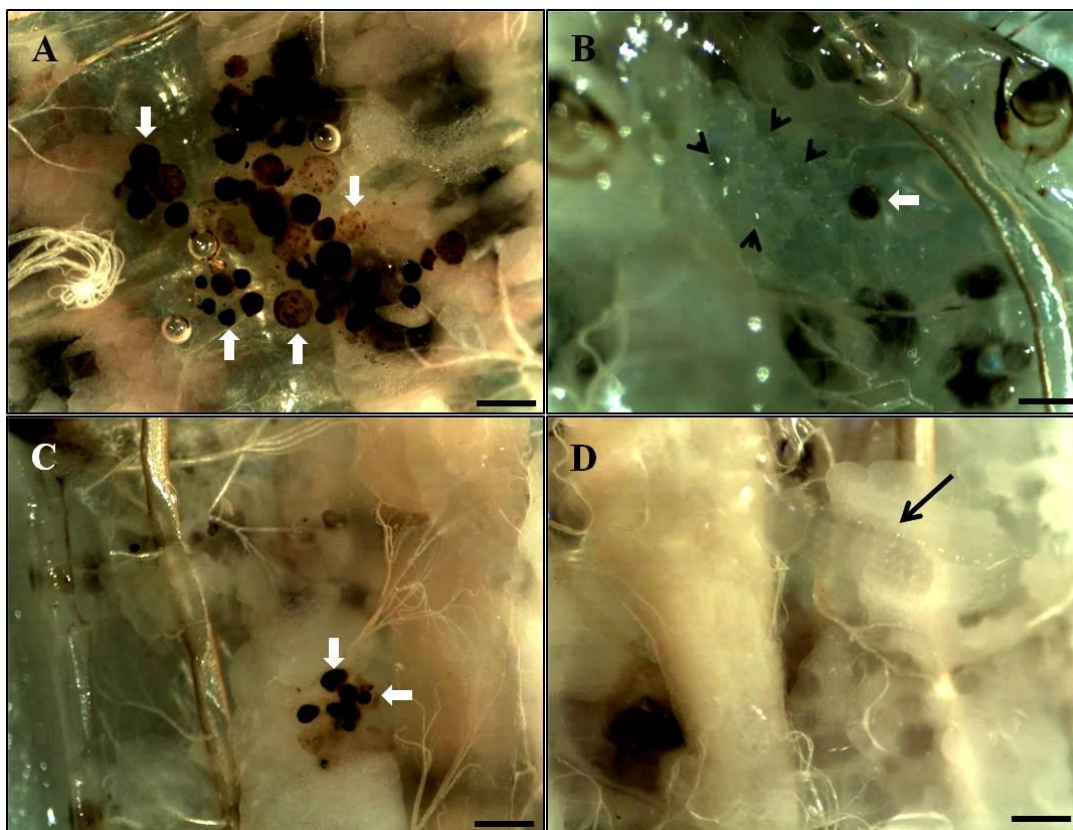


Figura 6. Lagartas de *Diatraea flavipennella* injetadas com micro-esfera. A e C não parasitada (testemunha) e B e D parasitadas no primeiro e quinto dia, respectivamente. Seta curta – micro-esfera não melanizadas, Seta grossa – micro-esferas melanizadas e Seta longa – larva do parasitoide. Barras = 100 μm .

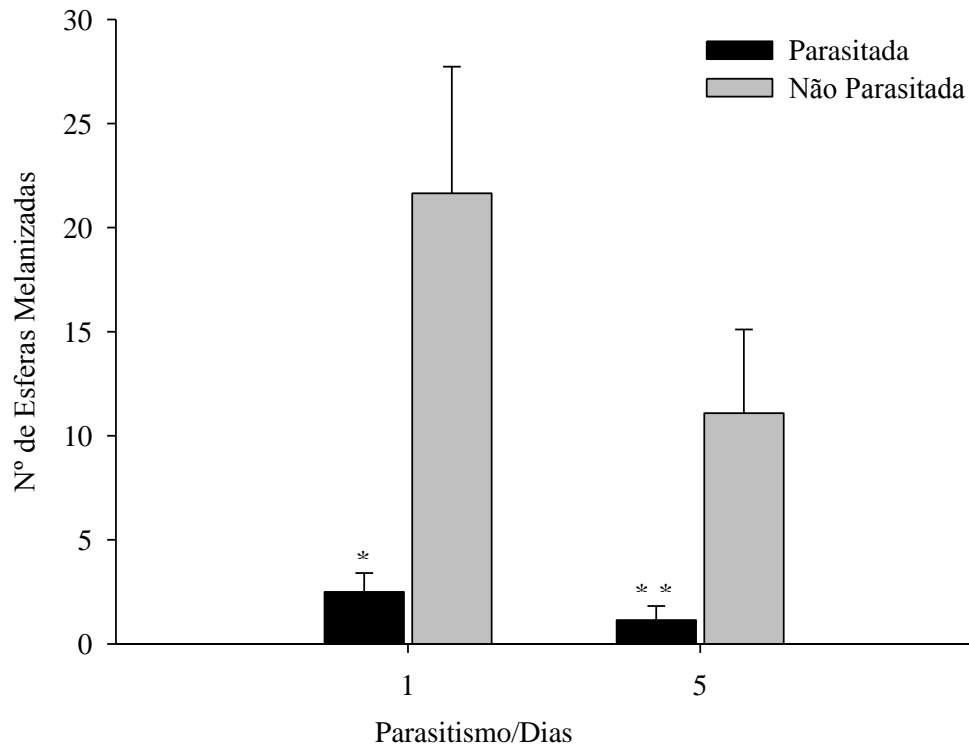


Figura 7. Média (\pm EP) de micro-esferas (Sephadex) melanizadas por lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*, avaliadas após 24h de injeção. Diferença significativa entre os tratamentos (*) e dentro do tratamento parasitada (**) pelo Mann-Whitney's U-test ($P < 0,05$).

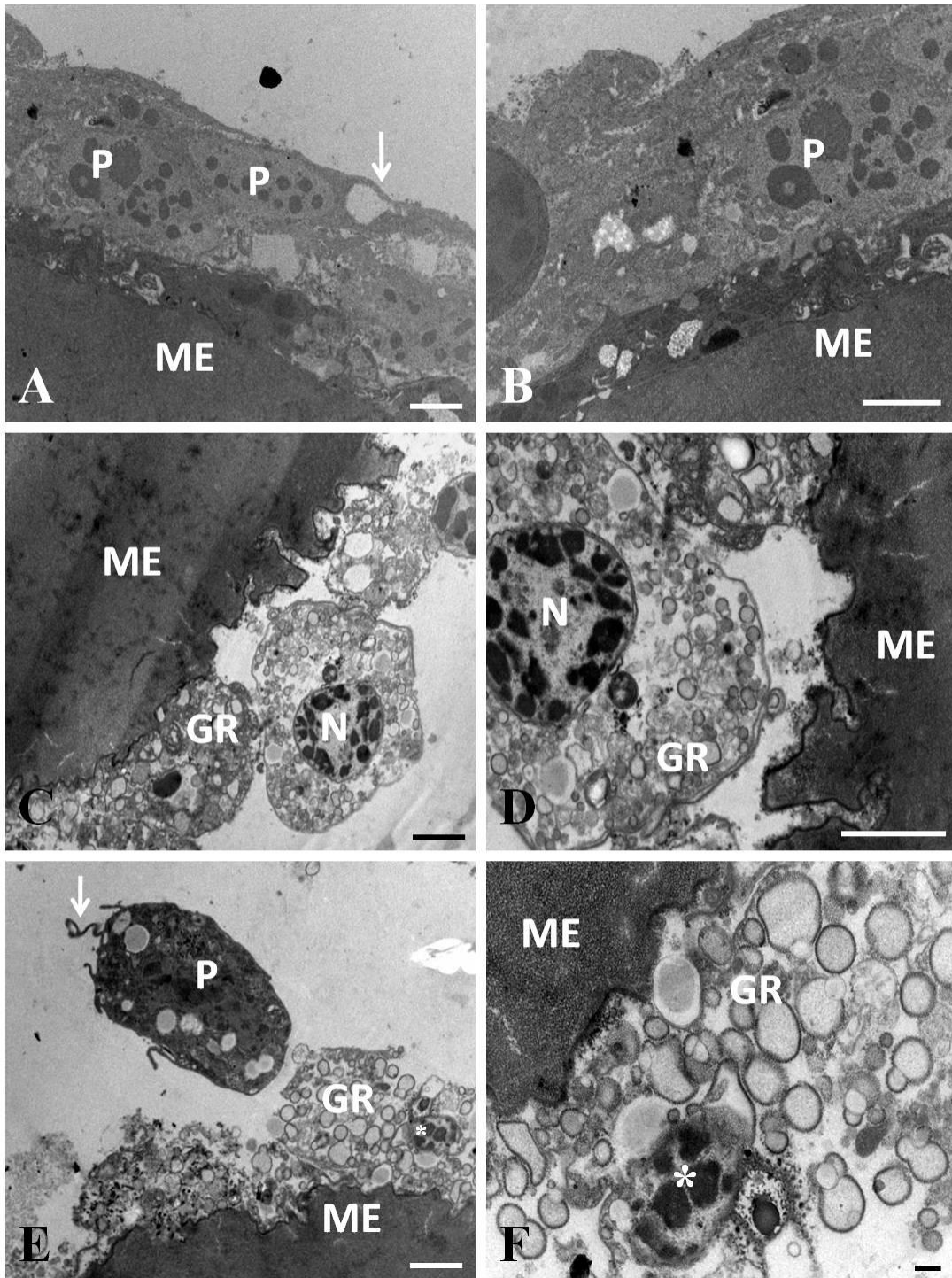


Figura 8. Eletromicrografias de transmissão de micro-esferas coletadas da hemocele de lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitadas (A e B) e com um dia de parasitismo por *Cotesia flavipes* (C, D, E e F). ME- Micro-esferas, P- Plasmatócitos, GR – Granulócito. Seta - Projeções citoplasmáticas, N - Núcleo e * - Núcleo picnótico. Barras = 1 μ m.

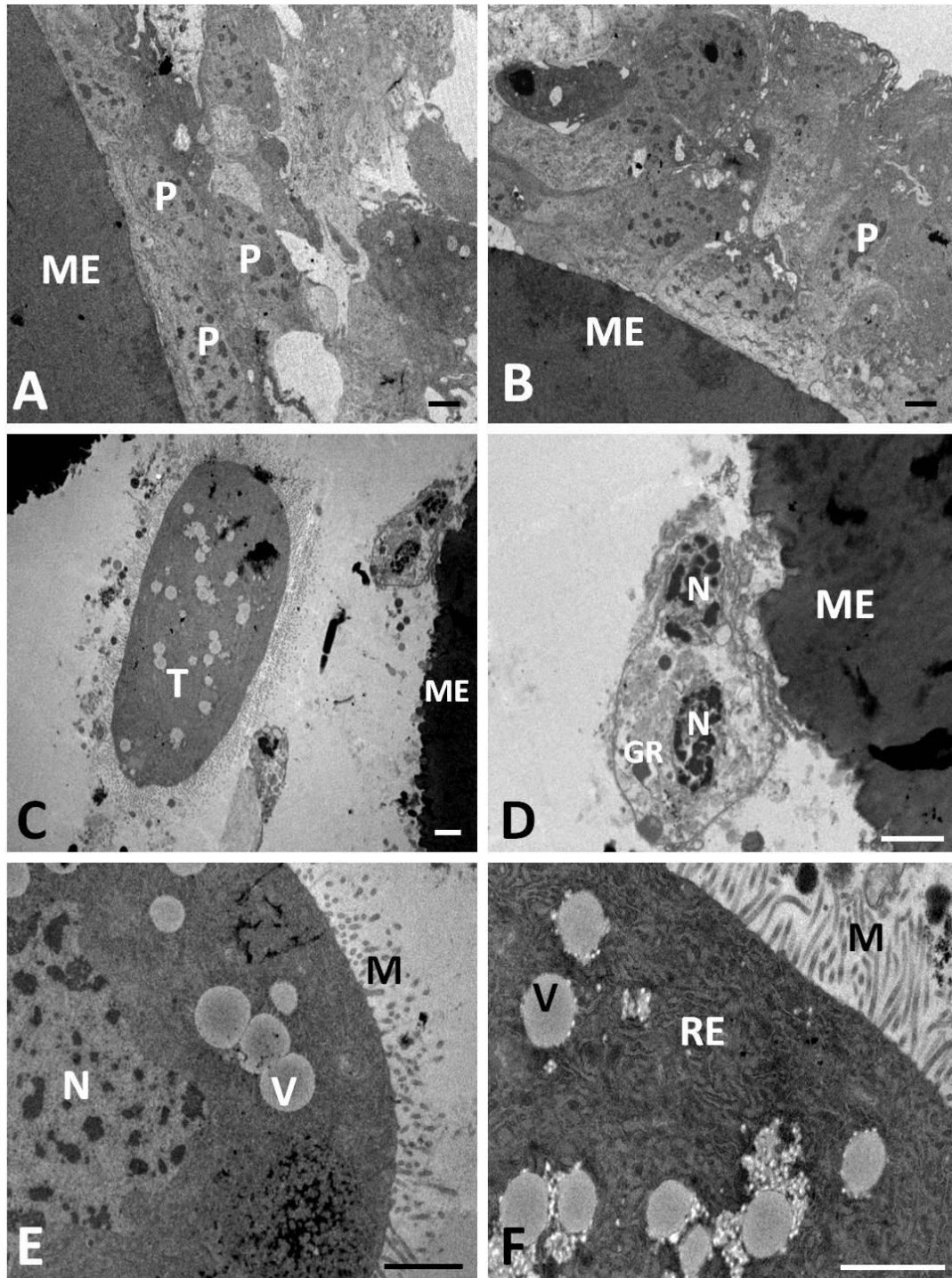


Figura 9. Eletromicrografias de transmissão de micro-esferas coletadas da hemocele de lagartas de *Diatraea flavipennella* não parasitadas (A e B) e com cinco dias de parasitismo por *Cotesia flavipes* (C, D, E e F). ME – micro-esfera, P - Plasmatócitos, T – Teratócitos, N - Núcleo, M - Microvilos, V - Vesícula, RE - Reticulo endoplasmático. Barras = 1 μ m

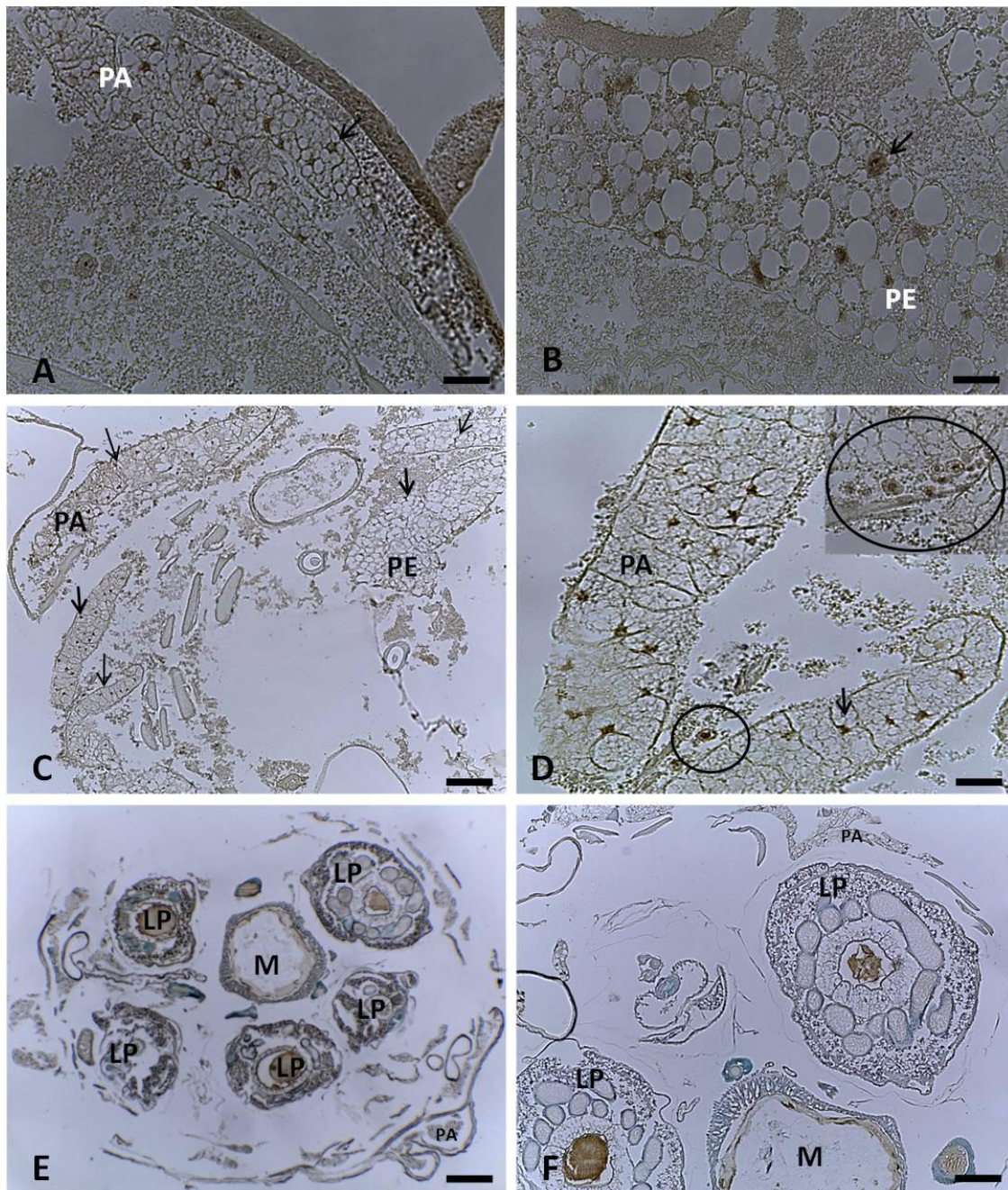


Figura 10. Corpo gorduroso de *Diatraea flavipennella* não parasitada (A e B) parasitada aos três dias (C e D) e aos nove dias (E e F) por *Cotesia flavipes*. Setas - Indicam a marcação dos pontos apoptóticos no tecido gorduroso e Círculos - nos hemócitos, PA - Corpo gorduroso parietal, PE - Corpo gorduroso perivisceral, LP = Larva do parasitoide, M - Mesêntero. (A, B e F Barras = 50 μm ; C Barra = 100 μm e E Barra = 200 μm).

CAPÍTULO 3

Cotesia flavipes (CAM.) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ALTERA NUTRIENTES NA HEMOLINFA, CORPO GORDUROSO E CITOQUÍMICA DOS HEMÓCITOS EM *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)¹

ELIANA M. PASSOS², VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA³, ANA L.F. PORTO³, EDMILSON J. MARQUES², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA³, MILENA F. SILVA³ E FLÁVIO O. SILVA³

² Departamento de Agronomia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE.

¹Passos, E.M., V. Wanderley-Teixeira, A.L.F. Porto, E.J. Marques, A.A.C. Teixeira, M.F. Silva & F.O. Silva. *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) altera nutrientes da hemolinfa, corpo gorduroso e citoquímica dos hemócitos em *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). A ser submetido à Comparative Biochemistry and Physiology.

RESUMO: A regulação nutricional na interação hospedeiro-parasitoide é espécie-específica, assim, neste trabalho, investigou alterações nos nutrientes da hemolinfa, corpo gorduroso e citoquímica dos hemócitos em *Diatraea flavipennella* (Box), após parasitismo. A partir da hemolinfa e corpo gorduroso extraídos aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias, quantificou-se os níveis de carboidrato, lipídeo e proteína total, por teste colorimétrico e caracterizou-se o perfil proteico da hemolinfa. Obtiveram-se cortes histológicos das lagartas, aos 9 dias de parasitismo, corados com P.A.S. Investigou-se nos hemócitos, aos 0 (4h), 3 e 7 dias de parasitismo, a marcação de polissacarídeos ácidos, mucina e lipídios. Os resultados mostraram redução na concentração de proteína, aos dez dias, e nos níveis de lipídeo, aos seis dias na hemolinfa das lagartas parasitadas. No corpo gorduroso, o parasitismo reduziu os níveis de carboidrato no sexto e décimo dia e os de proteína no décimo dia. Observou-se ainda uma drástica redução no volume do corpo gorduroso das lagartas parasitadas. O perfil protéico revelou a presença de quatro proteínas específicas do parasitismo aos nove dias, as quais apresentam peso molecular de 127,39; 124,5; 118,3 e 35,42 KDa. O parasitismo alterou a citoquímica dos hemócitos, tendo reduzido polissacarídeos ácidos nos prohemócitos e oenocitóides, mucina nos plasmatócitos e granulócitos e lipídeos nos adipohemócitos, granulócitos, e prohemócitos. Conclui-se, que na interação *C. flavipes-D. flavipennella* o parasitoide ocasiona alterações de forma diferenciada no perfil bioquímico da hemolinfa e do corpo gorduroso, além de alterar a citoquímica dos hemócitos e ocasionar uma redução drástica do tecido de reserva.

PALAVRAS-CHAVE: Broca da cana-de-açúcar, parasitoide, perfil bioquímico, tecido de reserva, hemócito

Cotesia flavipes (Cam) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ALTERS THE NUTRIENTS
HEMOLYMPH, FAT BODY AND HEMOCYTES EM CYTOCHEMISTRY OF *Diatraea*
flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ABSTRACT: The nutritional regulation in host-parasitoid interaction is a specific species. This study aimed to investigate changes in haemolymph nutrients, fat body, and cytochemistry of the hemocytes in *Diatraea flavipennella* (Box) after parasitism. Considering the hemolymph and fat body extracted at the second, fourth, sixth, eighth, and tenth days of parasitism, levels of carbohydrate, lipids, and total protein were quantified using colorimetric test; and protein profile of hemolymph was characterized. Histological sections of caterpillars were obtained at the ninth day of parasitism stained by PAS (Periodic acid/Schiff's) reaction. Marking of acidic polysaccharides, mucin, and lipids was investigated on hemocytes at the zero (4h), third, and seventh days of parasitism. Results showed reduction in protein concentration at the tenth day and in lipid levels at the sixth day in the hemolymph of parasitized larvae. In the body fat, parasitism reduced the carbohydrate levels at the sixth and tenth days and the protein levels at the tenth day. It was observed also a drastic reduction in the fat body volume of parasitized larvae. The proteic profile showed the presence of four specific proteins of parasitism at the ninth day, showing a molecular weight of 127.39, 124.5, 118.3, and 35.42 kDa. Parasitism changed the cytochemistry of hemocytes and reduced acidic polysaccharides in prohemocytes and oenocytoids, mucin in plasmatocytes and granulocytes, and lipids in adipohemocytes, granulocytes, and prohemocytes. It is concluded that in *C. flavipes*-*D. flavipennella* interaction the parasitoid causes changes differently in biochemical profile of hemolymph and fat body, in addition to change the cytochemistry of hemocytes and cause a drastic reduction in the reserve tissue.

KEY WORDS: Sugarcane moth borer, parasitoid, biochemical profile, reserve tissue, hemocyte.

Introdução

Parasitoides que se desenvolvem dentro do hospedeiro, durante a fase larval, dependem completamente de seu hospedeiro para a aquisição de nutrientes. Estes, então, manipulam a fisiologia do mesmo para aumentar a disponibilidade de nutrientes, a fim de atender suas necessidades nutricionais (Kaeslin *et al.* 2005, Salvador & Cônsoli 2008, Jervis *et al.* 2008).

A princípio as larvas do parasitoide usam os nutrientes disponíveis na hemolinfa do hospedeiro (Nakamatsu & Tanaka 2004). Contudo, o corpo gorduroso é responsável pelo metabolismo de lipídios, carboidratos, síntese de proteínas e de aminoácidos (Arrese & Soulages 2010, Visser *et al.* 2010), sendo o seu contato com a hemolinfa vital para o organismo ajustar adequadamente as alterações na concentração de precursores de energia em circulação (Gullan & Cranston 2007, Arrese & Soulages 2010). Assim alterações metabólicas no corpo gorduroso em insetos parasitados são comumente atribuídas ao parasitismo (Beckage & Gelman 2004).

Ainda, durante o parasitismo, se modula a expressão de proteínas do hospedeiro e se promove a expressão de proteínas codificadas pelo parasitoide. Essas proteínas, denominadas como proteínas específicas do parasitismo (PSP), estão correlacionadas à habilidade do parasitoide de se desenvolver em diferentes espécies de hospedeiro e podem ser detectadas nos hemócitos ou livres na hemolinfa (Harwood *et al.* 1998, Le *et al.* 2003).

O endoparasitoide larval, *Cotesia flavipes* (Cameron), foi introduzido no Brasil em 1974 para o controle do complexo de brocas *Diatraea*, as quais ocasionam danos à cultura da cana-de-açúcar, resultando em perdas significativas na receita (Mendonça *et al.* 1977, Freitas *et al.* 2006). As duas espécies predominantes são a *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Diatraea flavipennella* (Box), esta última de ocorrência restrita ao Brasil (Mendonça 1996).

Estudos têm demonstrado a regulação da fisiologia, do hospedeiro pelo parasitoide, através das alterações metabólicas, tais como mudanças nos níveis de proteína, carboidrato e lipídio, além

da liberação de proteínas específicas do parasitismo (PSP) (Bae & Kim 2004, Cónsoli *et al.* 2005, Lee *et al.* 2005, Salvador & Cónsoli 2008). Porém, não há relatos da participação dos componentes dos hemócitos na interação parasito-hospedeiro. Sabe-se, no entanto, que a interação nutricional e fisiológica depende da história evolutiva dessa interação, já que a regulação do hospedeiro pelo parasitoide é espécie-específica (Whitfield 1998, Nakamatsu *et al.* 2002).

Diante do exposto e da falta de estudos sobre a interação *C. flavipes-D. flavipennella*, o presente trabalho investigou alterações nos nutrientes da hemolinfa, corpo gorduroso e citoquímica dos hemócitos em *D. flavipennella*, após parasitismo, para responder como esse parasitoide é capaz de manipular a fisiologia do hospedeiro a fim de atender suas necessidades nutricionais. As informações obtidas nessa pesquisa contribuirão para o aperfeiçoamento do programa de controle biológico dessa praga na cultura da cana-de-açúcar.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Patologia de Insetos (Departamento de Agronomia), no LABTECBIO – Laboratório de Tecnologia de Bioativos (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal) ambos pertencentes à Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Criação de *Diatraea flavipennella*. Inicialmente a criação de *D. flavipennella* foi estabelecida a partir de material biológico, larvas e pupas, coletadas em canaviais da Usina Central Olho D'água, no Município de Camutanga-Pe. A criação das lagartas foi realizada em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de 70% e fotofase de 12 h) e mantidas sob dieta artificial de Hansley & Hammond (1968) modificada por Araújo *et al.* (1985), constituída de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, sais de Wesson, ácido ascórbico, solução vitamínica, água e anticontaminantes (metilparabeno, formol e ácido nalidixico). Ao formarem pupas, estas foram transferidas para câmara úmida até a

emergência dos adultos, os quais foram confinados em gaiolas de PVC (15x22cm) revestida com papel sulfite, como substrato para oviposição, e como substrato alimentar foi oferecido solução de mel (5%). Os ovos coletados foram esterilizados por cinco minutos em formol (3%) e em sulfato de cobre (1%), secos e armazenados em câmara úmida, até eclosão das neonatas, distribuídas para tubos de ensaio contendo dieta de alimentação. Após trinta dias, as lagartas foram transferidas para caixas plásticas, com dieta de realimentação. Após trinta dias, as lagartas foram transferidas para caixas plásticas, com dieta de realimentação, constituída de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, ácido ascórbico, solução vitamínica, água e anticontaminantes (metilparabeno, formol, ácido nalidixico e ácido acético). Esses procedimentos foram realizados até a obtenção do número de insetos adequados para realização dos experimentos.

Parasitismo. Os parasitoides utilizados foram fornecidos pela ASPLAN-PB (Associação dos Plantadores de Cana-de-açúcar da Paraíba) ainda na fase de pupa (massas). As quais foram depositadas dentro de copos, com orifício de inoculação na parte superior. Para o parasitismo foram utilizados adultos de *C. flavipes*, com 24h de idade, onde lagartas de *D. flavipennella* (sexto ínstar) foram levadas próximas ao orifício procurando-se a fêmea, que depositava seus ovos no interior das lagartas. Lagartas parasitadas e não parasitadas foram individualizadas em potes plásticos com dieta de realimentação, para posterior utilização nos experimentos.

Extração da Hemolinfa e do Corpo Gorduroso. A extração da hemolinfa e do corpo gorduroso foi realizada ao longo do período do parasitismo, aos dois, quatro, seis, oito e dez dias. A cada intervalo foram utilizadas 16 lagartas, sendo oito parasitadas e oito não parasitadas. O material coletado foi agrupado, sendo cada amostra composta pelo pool de duas lagartas, perfazendo assim um total de quatro repetições por tratamento. A hemolinfa foi coletada com ajuda de uma micropipeta após incisão de uma perna abdominal da lagarta. Amostra de 10 µL de hemolinfa de cada lagarta foi misturada com 590 µL de tampão anticoagulante (98 mM NaOH; 0.19 M NaCl;

1.7 mM EDTA; 41 mM ácido cítrico, pH 4.5) em tubo de centrifuga de 1,5 mL, e centrifugada a 4.900 rpm/120s. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise bioquímica. Essas mesmas lagartas foram dissecadas usando o mesmo anticoagulante gelado, sob estereoscópio, e o corpo gorduroso removido com uma pinça, lavado em tampão anticoagulante e pesado. Em seguida o corpo gorduroso foi transferido para um microtubo para centrifuga, ao qual foi adicionado 20 mg de sulfato de sódio e 200 µL de metanol (75%). A amostra foi macerada com ajuda de um pistilo plástico, o qual foi lavado com 600 µL de clorofórmio-metanol (1:1), adicionado ao tubo. O material foi então centrifugado a 7 400 rpm/3min e o sobrenadante armazenado a -20°C para uso posterior.

Dosagem de Carboidrato, Lipídeo e Proteína. A determinação das dosagens dos nutrientes na hemolinfa e corpo gorduroso foram feitas em triplicata. A quantificação de carboidrato foi realizada usando o reagente antrona (Roe 1955). Onde 70 µL da amostra homogeneizada a 700 µL de reagente e aquecida a 100°C por 15 min foi lida a absorvância de 620 nm em espectrofotômetro. A glicose foi usada como padrão para a confecção da curva de calibração. A concentração de lipídeos totais foi determinada pelo reagente vanilina (Van Handel 1985). Amostras (50 µL) de hemolinfa e do corpo gorduroso foram colocadas em tubo de vidro, ao qual foi adicionado 200 µL de clorofórmio-metanol (1:1) e levados para evaporar a 100°C. Logo em seguida, 30 µL de ácido sulfúrico foi colocado no tubo e mais uma vez levados a 100°C durante 10 minutos para produzir derivados do ácido sulfônico. Após esfriar adicionou-se o reagente vanilina (1,72 mL) e a amostra foi imediatamente levada a vórtex para mistura e obtenção uniforme da cor. A absorvância utilizada na leitura em espectrofotômetro foi de 525 nm e o óleo de soja comercial foi usado como padrão. A concentração de proteínas na amostra foi determinada através de teste colorimétrico, utilizando-se de kit comercial (Comassie Plus Protein, Pierce Biotechnology), baseado no teste de Bradford (1976). As amostras (10 µL) da hemolinfa e do

corpo gorduroso foram misturadas a 300 µL de reagente de Bradford e lida a absorvância de 595 nm, após 10 minutos. A albumina de soro bovino foi utilizada para a determinação da curva padrão. Os dados gerados para a concentração de todos os nutrientes dosados foram comparados pelo teste t ($P < 0,05$), utilizando o programa computacional SAS (SAS - Institute 2001).

Análise da Hemolinfa em Eletroforese. As amostras da hemolinfa das repetições de cada tratamento utilizadas nas dosagens dos nutrientes foram misturadas formando um pool correspondente a hemolinfa de oito lagartas. Essas amostras foram dosadas e alicotadas na concentração de 25mg/mL de proteínas, as quais foram utilizadas para traçar o perfil de proteínas empregando-se o gel de poliacrilamida desnaturante 10% (SDS-PAGE), corados em prata. Os géis foram fotografados e as imagens foram analisadas pelo software LABImage 1D.

Histologia do Corpo Gorduroso. Lagartas do sexto ínstar parasitadas e não parasitadas aos nove dias foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24h. Após o período de fixação as lagartas foram seccionadas transversalmente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, e os cortes submetidos ao P.A.S (Ácido Periódico de Schiff), conforme a metodologia descrita por Junqueira & Junqueira (1983).

Citoquímica dos Hemócitos. A coleta da hemolinfa seguiu a mesma metodológica descrita anteriormente. Os hemócitos foram analisados nos intervalos de zero, três e sete dias, onde o tempo zero dia, corresponde a quatro horas após a inoculação da lagarta pelo parasitoide. A marcação de substâncias presentes nos hemócitos foi realizada utilizando-se diferentes técnicas de coloração. Sendo a técnica de coloração com Azul de Toluidina utilizada para marcação de polissacarídeos ácidos. Enquanto, mucina e lipídios foram detectados pelo uso dos corantes Tricrômico de Mallory e Sudan Black, respectivamente (Junqueira & Junqueira, 1983). As imagens foram capturadas por meio de câmera de vídeo Sony[®], acoplada a microscópio Olympus[®] BX50.

Resultados

Perfil Bioquímico da Hemolinfa. O parasitoide *C. flavipes* ocasionou alterações de forma diferenciada nos níveis de proteína e lipídeo livres na hemolinfa de *D. flavipennella* (Fig. 1). Os efeitos do parasitismo foram observados sobre os níveis de proteína e lipídeo, não sendo verificadas diferenças nos níveis de carboidrato entre as lagartas parasitadas e não parasitadas, durante o período avaliado. As alterações na concentração de proteína foram visualizadas a partir do oitavo dia de parasitismo, sendo significativa aos dez dias de avaliação, ocorrendo uma redução na concentração protéica nas lagartas parasitadas, em contraste com o aumento expressivo verificado na testemunha. Entretanto, os níveis de lipídios nas lagartas parasitadas foram reduzidos apenas aos seis dias de parasitismo, voltando aos níveis similares aos das lagartas não parasitadas nos dois últimos períodos de avaliação.

Perfil Bioquímico do Corpo Gorduroso. Os níveis de carboidratos, proteínas e lipídios detectados no corpo gorduroso de *D. flavipennella* parasitada e não parasitada estão representados na Figura 2. De acordo com a análise bioquímica o parasitismo alterou significativamente os níveis de carboidrato e de proteína, não ocorrendo mudanças nos níveis de lipídeos. Inicialmente, no segundo dia, a concentração de carboidrato na lagarta parasitada foi superior a da testemunha caindo significativamente no sexto e décimo dia de parasitismo. Os níveis de proteína no segundo dia também foram maiores nas lagartas parasitadas, decrescendo a partir do oitavo dia de parasitismo, diferentemente da testemunha que aumentou durante os períodos avaliados.

Embora nenhuma diferença tenha sido detectada na concentração de lipídeo no corpo gorduroso durante o parasitismo (Fig. 2). Observou-se uma drástica redução no volume deste tecido nas lagartas parasitadas à medida que o parasitoide se desenvolvia (Figs. 3 e 4).

Análise da Hemolinfa em Eletroforese. O perfil protéico, em gel de poliacrilamida desnaturante, da hemolinfa de lagartas de *D. flavipennella* não-parasitada e parasitada por *C. flavipes*, revelou a

presença de quatro proteínas diferentes nas lagartas parasitadas após nove dias, as quais apresentaram os seguintes pesos moleculares: 127,39 KDa (PSP1), 124,5 KDa (PSP2), 118,3 KDa (PSP3) e 35,42 KDa (PSP4) (Fig. 5).

Citoquímica dos Hemócitos. Histoquimicamente os prohemócitos e oenocitóides reagiram positivamente ao Azul de Toluidina nas lagartas não parasitadas (Figs 6A, e 6C). No entanto verificou-se fraca reação nessas células nas lagartas com sete dias de parasitismo (Figs 6B e 6D). A reação pelo tricromico de Mallory revelou marcação positiva nos plasmatócitos e granulócitos da hemolinfa de lagartas não parasitadas (Figs.6E e 6G), porém com 0 dia de parasitismo os plasmatócitos reagiram fracamente ao corante e os granulócitos reagiram fracamente em todos os períodos de avaliação (Figs. 6F e 6H). Reações positivas para o Sudan Black foram visualizadas para os granulócitos, prohemócitos e adipohemócitos na lagartada não parasitada (Figs. 7A, 7C e 7E). Nas lagartas parasitadas houve fraca reação para os granulócitos ao 3^o dia, ao 7^o dia para os prohemócitos, e em todos os períodos de avaliação para os adipohemócitos (Figs. 7B, 7D e 7F). A reação de todos os tipos celulares presentes na hemolinfa de *D. flavipennella* aos corantes, encontra-se sumarizado na Tabela 1.

Discussão

As reduções nos níveis de nutrientes livres na hemolinfa e estocados no corpo gorduroso de *D. flavipennella* ocorreram a partir do sexto dia de parasitismo por *C. flavipes*, quando a maioria das larvas do parasitoide encontra-se no segundo instar larval. Este fato pode está relacionado à fase de desenvolvimento do parasitoide em virtude de existir uma necessidade maior de nutrientes, pois na ausência de condição nutricional adequada do hospedeiro a larva do parasitoide permanece no primeiro instar (Sato *et al.* 1986, Nakamatsu *et al* 2001).

Na hemolinfa as alterações ocorridas nos níveis de proteína e lipídeos, são explicadas por esses macronutrientes serem elementos construtores essenciais na morfogênese, requeridos em demanda elevada, tanto pelos imaturos do parasitoide quanto pelos tecidos do hospedeiro, ambos em processo de desenvolvimento (Chapman 1998). Assim, ocorre uma constante competição entre eles pelos recursos circulantes na hemolinfa (Vinson *et al.* 2001). A drástica redução na quantidade de proteína na hemolinfa, exatamente no final do parasitismo, sugere que as larvas do parasitoide consomem toda proteína, da hemolinfa do hospedeiro, antes da emergência (Nakamatsu & Tanaka 2004). Enquanto a elevação nos níveis de proteína na testemunha deve-se ao fato de que proteínas específicas para armazenamento são sintetizadas pelo corpo gorduroso durante o último ínstar larval e acumuladas na hemolinfa para serem usadas durante a metamorfose (Kanost *et al.* 1990, Haunerland 1996, Gullan & Cranstron 2007). Quanto aos lipídeos, são fontes de ácidos graxos que servem como precursores na síntese de eicosanóides e feromônios, necessárias em quantidades substanciais para a síntese de fosfolípidos (Lockey 1988, Stanley 2006). Podem, ainda ser mobilizados em uma resposta imune, na forma de lipoproteína, e utilizados como uma fonte de energia e ou para síntese de membrana nos locais de infecção ou em hemócitos (Mullen & Golsworthy 2003, Whitten *et al.* 2004, Rahman *et al.* 2006, Arrese e Soulages 2010). Assim, o efeito na mobilização de lípidos em função do parasitismo em *D. flavipennella* parece não ser restrita apenas a hemolinfa, como observado em *Diatraea saccharalis* (Fabricius) parasitada por *C. flavipes* (Salvador & Cônsoli 2008), pois foi verificado que alguns hemócitos reagiram fracamente ao corante Sudan Black, principalmente os adipohemócitos nos três períodos avaliados, uma vez que estas células estão relacionadas com reservas energéticas (Hillyer & Christensen 2002).

O corpo gorduroso está ligado, essencialmente, à função de utilização e estoque de energia, sendo que suas reservas energéticas podem ser mobilizadas em resposta a demanda por outros

tecidos (Arrese & Soulages 2010). Assim, as alterações nos níveis de proteína deve estar associado a grande demanda deste nutriente na hemolinfa, a qual provavelmente pode está sendo suprida pela liberação deste nutriente pelo corpo gorduroso. Além disso, o acúmulo de proteínas de armazenamento no corpo gorduroso é geralmente inibida em lagartas parasitadas (Beckage & Kanost 1993, Shelby & Webb 1997, Zhang *et al.* 1997). De forma semelhante, pode-se inferir que a demanda por carboidrato na hemolinfa, para as atividades metabólicas da lagarta e do imaturo do parasitoide, estão sendo supridas pela liberação deste nutriente não somente pelo corpo gorduroso, mas também pelos hemócitos, prohemócitos e oenocitóides, que apresentaram redução de polissacarídeos ácidos no sétimo dia de parasitismo. A mobilização de carboidrato para suprir as necessidades de outros tecidos é feita principalmente na forma de trealose, açúcar circulante na hemolinfa (Thompson 2003). Estudos citam ainda a existência de uma correlação entre os níveis de glicose e do principal regulador da glicólise mostrando que a glicose da hemolinfa, é um indicador da condição de metabolismo de carboidrato no corpo gorduroso, controlando o seu metabolismo (Arrese e Soulages 2010).

Histoquimicamente ainda evidenciou-se redução de mucinas principalmente pelos granulócitos nas lagartas parasitadas, sugerindo uma interferência no mecanismo de defesa, pois sabe-se que as mucinas são glicoproteínas poliméricas cuja principal função é proteger o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos (Deplancke & Gaskins 2001, Myers *et al.* 2008).

A redução drástica no tamanho do corpo gorduroso, observados neste trabalho, já foi registrada em outros lepidopteros parasitados por *Cotesia ssp* (Nakamatsu *et al.* 2002). Acredita-se que a captação direta de lipídeos a partir do tecido do hospedeiro é mais vantajosa para os endoparasitoides larvais, porque evitam os custos metabólicas que estão associados com a lipogênese (Garrett & Grisham 1999). Essa captação ocorre por meio dos teratócitos que se fixa ao invólucro exterior do corpo gorduroso liberando enzimas, tais como colagenases, que atuam

dissociando o tecido e tornando o conteúdo das células disponíveis para que a larva de segundo instar do parasitoide possa ingerir o seu conteúdo (Qin *et al.* 2000, Nakamatsu *et al.* 2002, Falabella *et al.* 2009). Várias outras proteínas tem sido identificadas, incluindo carboxylesterase específicas dos teratócitos, envolvidas na hidrólise dos lipídeos do hospedeiro (Gopalapillai *et al.* 2005).

Proteínas específicas do parasitismo (PSP) podem ser encontradas na hemolinfa no início ou final do parasitismo, e tem uma função específica de acordo com o período que é liberada (Beckage 1993, Jones 1996). Assim, neste trabalho elas aparecem no final do parasitismo, podendo estar envolvidas com o fornecimento de nutrientes as larvas do parasitoide (Kadono-Okuda *et al.* 1998) ou ainda associadas a suspensão do desenvolvimento do hospedeiro, visto ser o período de pupação (Cônsoi *et al.* 2005). As PSPs aqui encontradas possuem peso molecular próximo ao das PSPs relatadas em outras interações hospedeiro parasitoide que registraram proteínas com peso molecular de 38, 43, 46 56, 114, 116 e 138 KDa, algumas destas originadas dos teratócitos (Cônsoi *et al.* 2005, Lee *et al.* 2005, Salvador & Cônsoi 2008). Contudo, outros estudos são necessários para confirmação da origem e funções das proteínas específicas do parasitismo na interação entre *C. flavipes* e *D. flavipennella*. Dessa forma, conclui-se, que na interação *C. flavipes*-*D. flavipennella* o parasitoide ocasiona alterações de forma diferenciada no perfil bioquímico da hemolinfa e do corpo gorduroso, além de alterar a citoquímica dos hemócitos e ocasionar uma redução drástica do tecido de reserva, resultando em sucesso no parasitismo.

Literatura Citada

Araújo, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985. Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Saccharum APC, Rev. Tecnol. Ind. Açuc. Alcool. 36: 45-48.

- Arrese, E.L. & J.L. Soulages. 2010.** Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 207-225.
- Bae, S. & Y. Kim. 2004.** Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Comp. Biochem. Physiol.* 138: 39-44.
- Beckage, N.E. & D.B. Gelman. 2004.** Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 299-330.
- Beckage, N.E. & M.R. Kanost. 1993.** Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 643-653.
- Beckage, N.E., 1993.** Games parasites play: the dynamic roles of proteins and peptides in the relationship between parasite and host. p. 25-57. In N.E. Beckage, S.N. Thompson, B.A. Federici (Eds.), *Parasites and Pathogens of Insects*, vol. 1. San Diego – CA, Academic Press, 364p.
- Bradford, M.M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chapman, R.F. 1998.** *The insects: structure and function*. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 770p
- Cônsoli, F.L., S.L. Brandt, T.A. Coudron & S.B. Vinson. 2005.** Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*–*Heliothis virescens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 142: 181-191.
- Deplancke B & H.R. Gaskins. 2001.** Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nut.* 73: 1131-1141.
- Falabella, P., P. Riviello, M.L. Stradis, P. Varricchio, A. Grimaldi, M. Eguileor, F. Graziani, S. Gigliotti & F. Pennacchio. 2009.** *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 801-813.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant’Ana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Fl. Entomol.* 89: 539-540.
- Garrett, R., Grisham, C., 1999.** *Biochemistry*. Orlando, Saunders College Publishing.

- Gopalapillai, R., K. Kadono-Okuda & T. Okuda. 2005.** Molecular cloning and analysis of a novel teratocyte-specific carboxylesterase from the parasitic wasp *Dinocampus coccinellae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1171-1180.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2007.** Os Insetos: Um resumo de Entomologia. São Paulo, Roca, 3 ed. 440p.
- Harwood, S.H., J.S. McElfresh, A. Nguyen, C.A. Conlan & N.E. Beckage. 1998.** Production of early expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*. *J. Invert. Pathol.* 71: 271-279.
- Hauerland, N. H. 1996.** Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 755-765.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond Jr. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.* 61: 1742-1743.
- Hillyer, J.F. & B.M. Christensen. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.* 117: 431-440
- Jervis, M.A., J. Ellers & J.A. Harvey. 2008.** Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 361-385.
- Jones, D. 1996.** Biochemical interaction between Chelonine wasps and their lepidopteran hosts: after a decade of research – the parasite is in control. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26: 981-996.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p
- Kadono-Okuda, K., F. Weyda & T. Okuda. 1998.** *Dinocampus* (= *Perilitus*) *coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. *J. Insect Physiol.* 11: 1073-1080.
- Kaeslin, M., R. Pfister-Wilhelm, D. Molina & B. Lanzrein. 2005.** Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implications. *J. Insect Physiol.* 51: 975–988.
- Kanost, M.R., J.K. Kawooya, J.H. Law, R.O. Ryan, M.C.V. Heusden & R. Ziegler. 1990.** Insect haemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22: 299-396.
- Le, N.T., S. Asgari, K. Amaya, F. Tan & N. Beckage. 2003.** Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 49: 533-43.
- Lee, S., N.A. Basio, D.S. Kim & Y. Kim. 2005.** Proteomic Analysis of Parasitization by *Cotesia plutellae* against Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 8: 53-60.

- Lockey, K.H. 1988.** Lipids of the insect cuticle-origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*B 89: 595-645.
- Mendonça, A. F., S.H. Risco & J.M.B. Costa. 1977.** Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. *PISSCT* 1: 703-710.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Mendonça (ed.), *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Mullen L. & G. Goldsworthy. 2003.** Changes in lipophorins are related to the activation of phenoloxidase in the haemolymph of *Locusta migratoria* in response to injection of immunogens. *Insect Biochem. Mol.Biol.* 33: 661-670.
- Myers, B.M., J.L. Fredenburgh. & W.E Grizzle. 2008.** Carbohydrates, p. 161-187. In J.D. Bancroft & M. Gamble (eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques*. Philadelphia, Elsevier, 744 p.
- Nakamatsu, Y. & T. Tanaka. 2004.** Correlation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*). *J. Insect Physiol.* 50: 135-141.
- Nakamatsu, Y., S. Fujii & T. Tanaka. 2002.** Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with help of teratocytes. *J. Insect Physiol.* 48: 1041-1052.
- Nakamatsu, Y., Y. Gytoku & T.Tanaka. 2001.** The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. *J. Insect Physiol.* 47: 573-584.
- Qin, Q.L., H. Gong & T. Ding. 2000.** Two collagenases are secreted by teratocytes from *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) cultured *in vitro*. *J. Invert. Pathol.* 76: 79-80.
- Rahman, M.M, M.G. Roberts & H.L.S. Schmidt O. 2006.** Cell-free immune reactions in insects. *J. Insect Physiol.* 52: 754-762.
- Roe, J.H. 1955.** The determination of sugar in blood fluid and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 212: 335-343.
- Salvador, G. & F.L. Cônsoli. 2008.** Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control* 45: 103-110.
- SAS Institute. 2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sato, Y., J. Tagawa & T. Hidaka. 1986.** Affects of the gregarious parasitoids *Apanteles rufricus* and *A. Kariyai* on host growth and development. *J. Insect Physiol.* 32: 281-286.

- Shelby K.S. & Webb B.A. 1997.** Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:263-270.
- Stanley D. 2006.** Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51:25-44.
- Thompson SN. 2003.** Trehalose: the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31: 205-285.
- Van Handel, E. 1985.** Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302-304.
- Vinson, S.B., F. Pennacchio & F.L. Cônsoli. 2001.** The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective, p. 187-206. In J.P. Edwards & R.J. Weaver (eds.), *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. Oxford, UK: BIOS Sci.Publ., 309p.
- Visser, B., C.L. Lann, F.J. Blanken, J.A. Harvey, J.J.M.V. Alphen & J. Ellers. 2010.** Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8677-8682.
- Whitfield, J.B. 1998.** Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 129-151.
- Whitten, M.M.A, I.F. Tew, B.L. Lee & N.A. Ratcliffe. 2004.** A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in β -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J. Immunol.* 172: 2177-2185.
- Zhang, Z., D.L. Dahlman & U.E. Järlfors. 1997.** Effect of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. *J. Insect Physiol.* 43: 577-585.

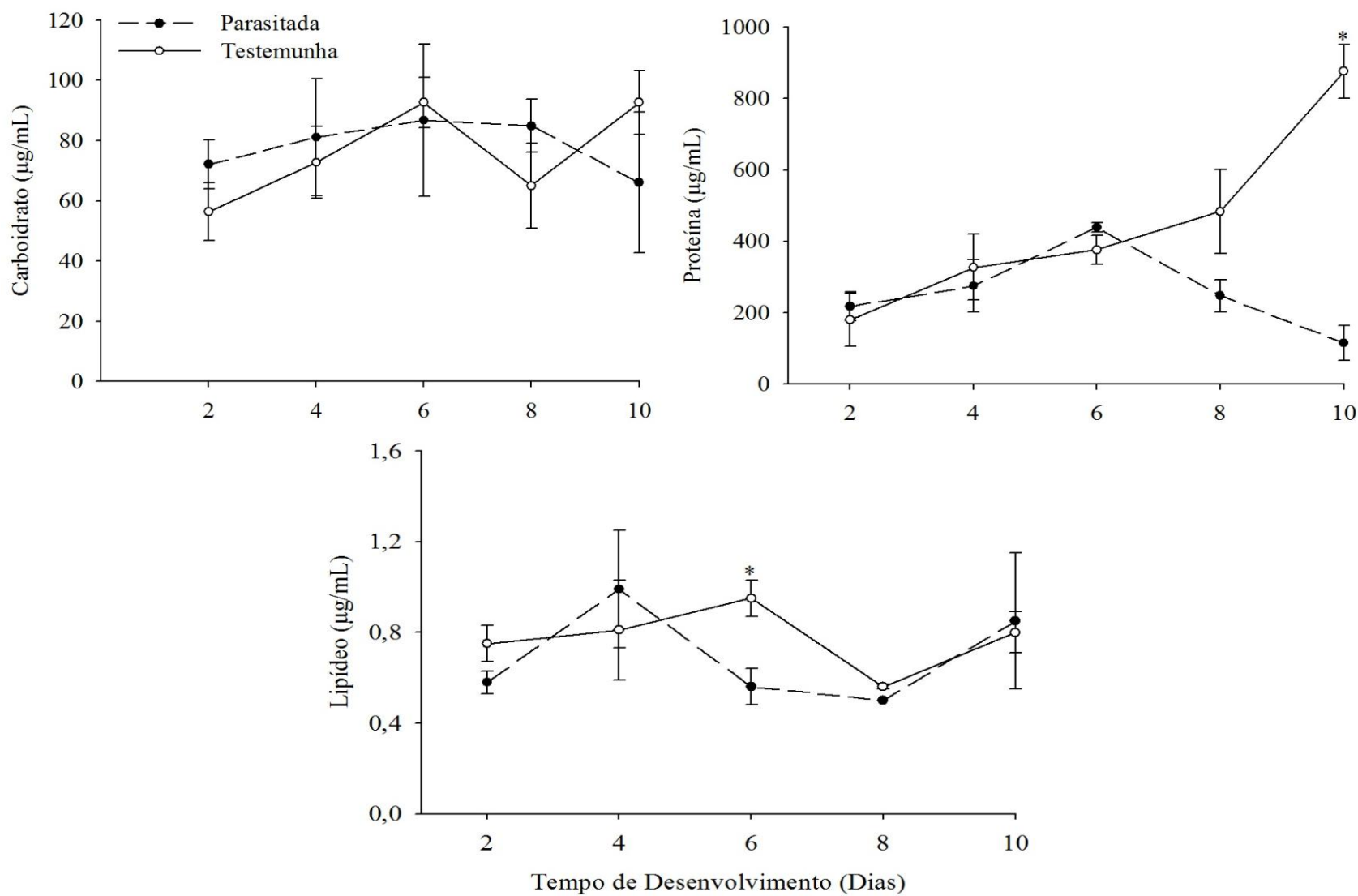


Figura 1. Níveis de carboidrato, proteína e lipídeo na hemolinfa de lagartas de *Diatraea flavipennella* (6^o instar) não parasitadas (testemunha) e parasitadas por *Cotesia flavipes*. (* diferença significativa, P < 0,05).

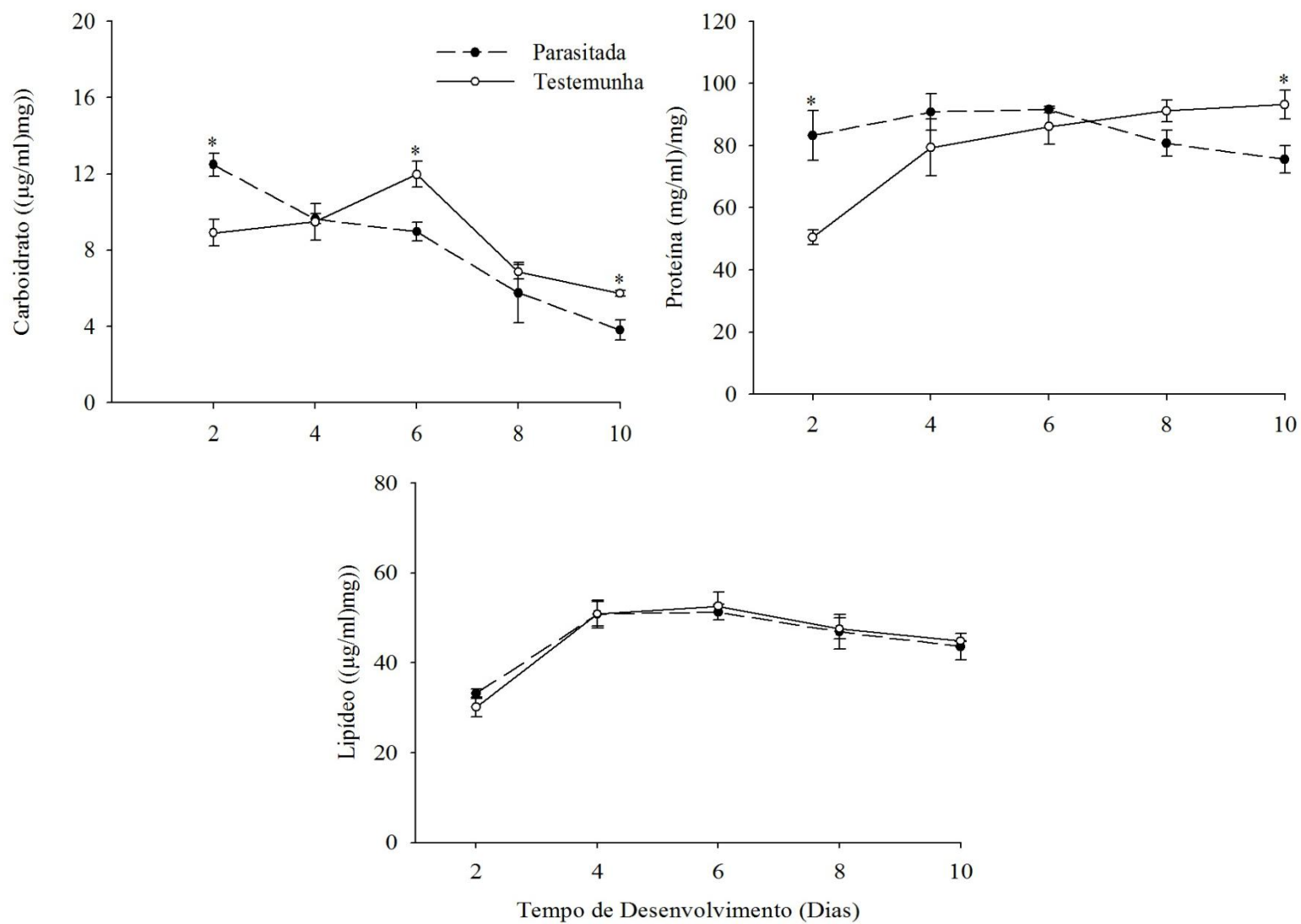


Figura 2. Níveis de carboidrato, proteína e lipídeo no corpo gorduroso de lagartas de *Diatraea flavipennella* (6^o instar) não parasitadas (testemunha) e parasitadas por *Cotesia flavipes*. (*Diferença significativa, P < 0,05).

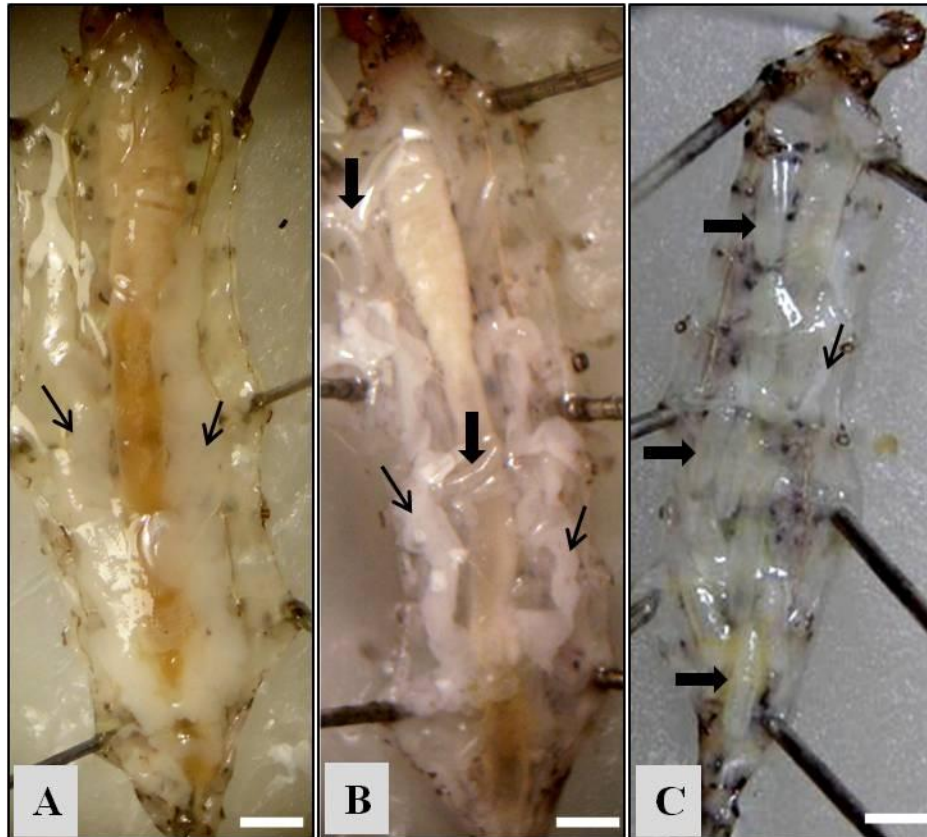


Figura 3. Lagartas de sexto instar de *Diatraea flavipennella*, não parasitada (A) e parasitada por *Cotesia flavipes*, aos 7 (B) e 10 (C) dias de parasitismo, mostrando alterações no corpo gorduroso. Setas finas - indicam a localização do corpo gorduroso e setas grossas - indicam a presença de larvas do parasitóide. Barras = 200 μ m.

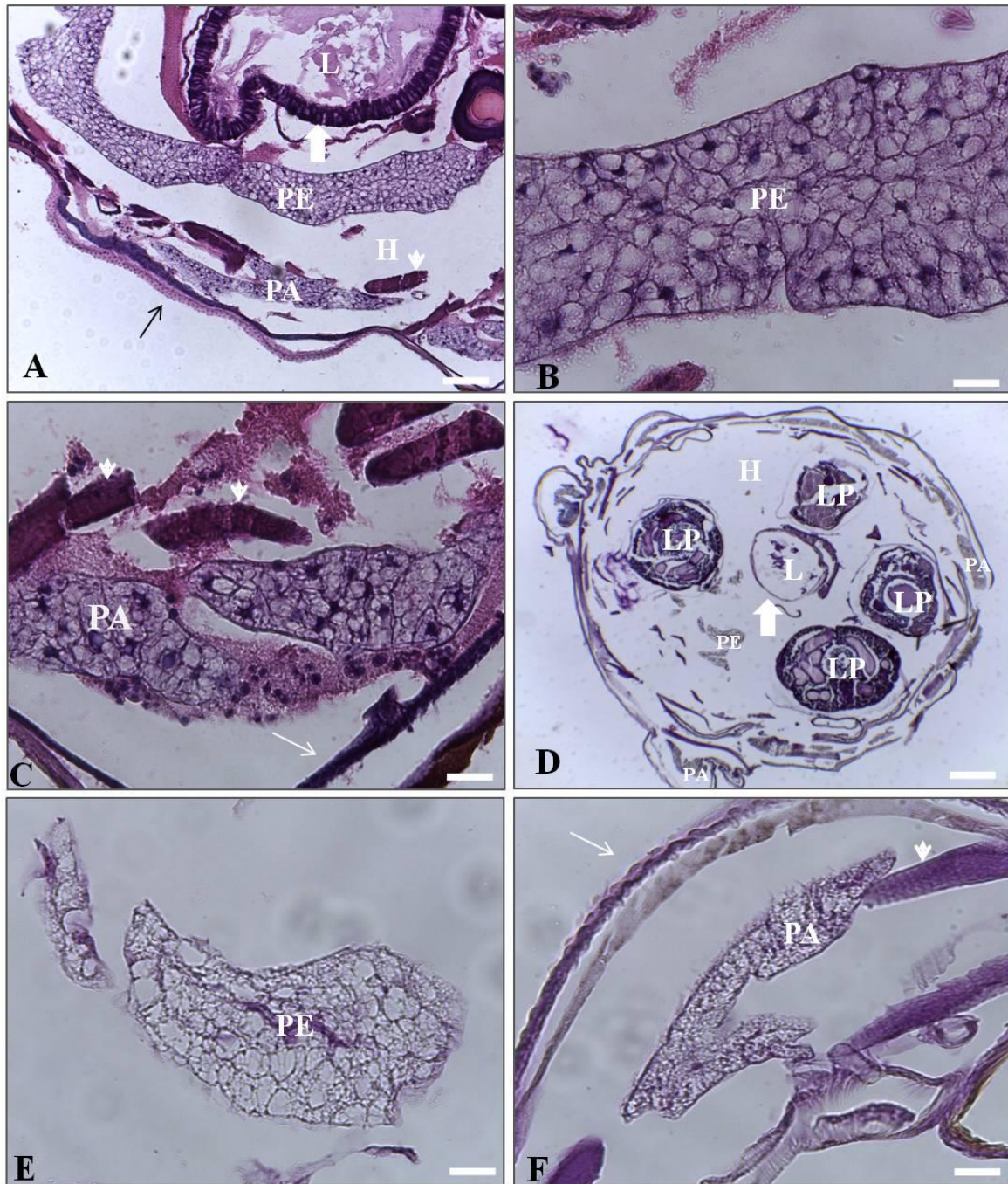


Figura 4. Corte transversal de lagartas de sexto instar de *Diatraea flavipennella*, não parasitada (A, B e C) e parasitada (D, E e F) por *Cotesia flavipes*. Coloração P.A.S. Seta grossa – Mesêntero, PE – Corpo gorduroso visceral, H – Hemocele, PA – Corpo Gorduroso parietal Ponta de seta - músculo, Seta – Tegumento, LP – Larva do parasitoide. (A e D Barras = 200 μ m; B, C, E e F = Barras = 50 μ m).

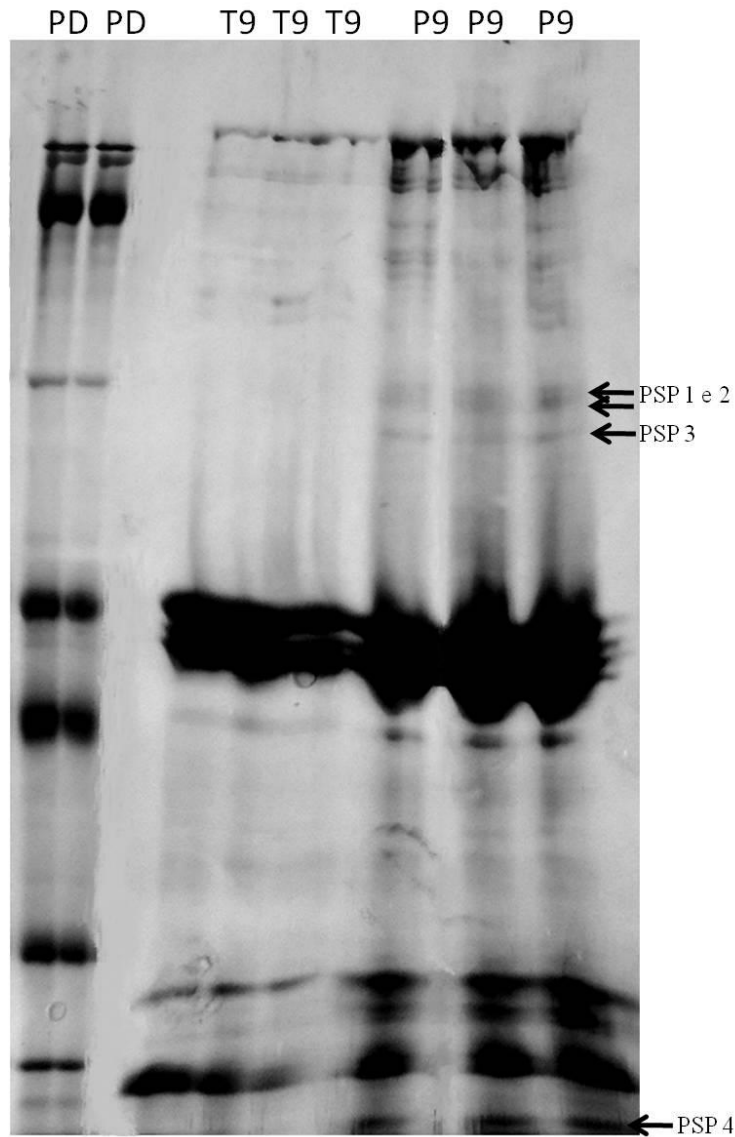


Figura 5. Perfil protéico, em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 10%) corados em prata, da hemolinfa de lagartas de *Diatraea flavipennella*, não parasitada (T9) e parasitada (P9) por *Cotesia flavipes* aos nove dias de parasitismo. Setas indicam a localização de bandas específicas do parasitismo – PSP e PD= Padrão.

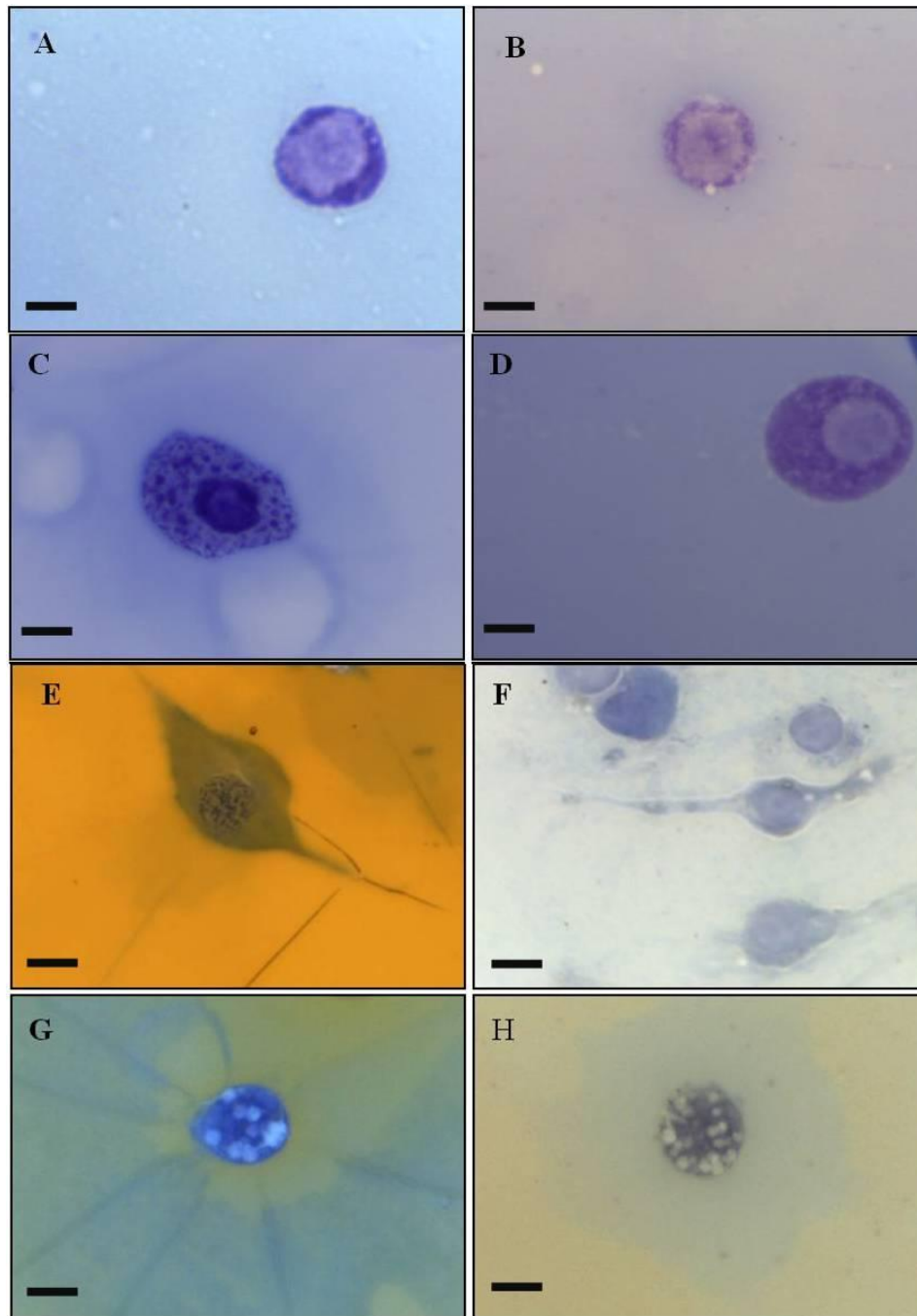


Figura 6. Hemócitos obtidos da hemolinfa de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*, em diferentes intervalos de tempo. Prohemócitos (7^o dia) A: Não parasitada e B: Parasitada. Oenocitóides (7^o dia) C: Não parasitada e D: Parasitada. Coloração. Azul de Toluidina. Plasmatócitos (0 dia) E: Não parasitada e F: Parasitada. Granulócitos (3^o dia) G: Não parasitada e H: Parasitada. Coloração. Tricrômico de Mallory. Barras = 10 µm.

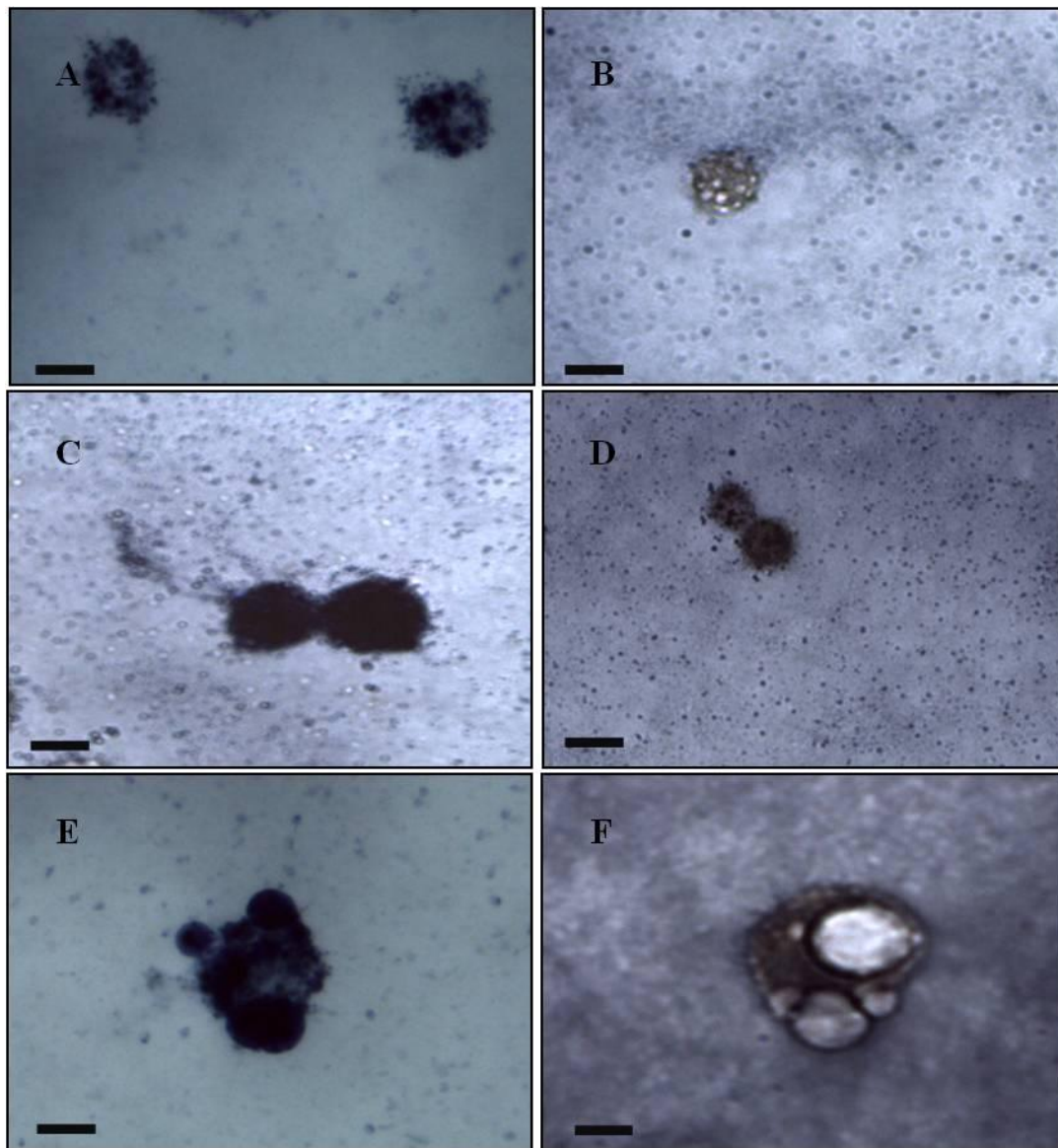


Figura 7. Hemócitos obtidos da hemolinfa de *Diatraea flavipennella* não parasitada e parasitada por *Cotesia flavipes*, em diferentes intervalos de tempo. Granulócitos (3° dia) A: Não parasitada e B: Parasitada. Prohemócitos (7° dia) C: Não parasitada e D: Parasitada. Adipohemócitos (7° dia) E: Não parasitada e F: Parasitada. Coloração. Sudan Black, Barras = 10 µm.

Tabela 1. Análise citoquímica de hemócitos de *Diatraea flavipennella* não parasitada (T) e parasitada (P) por *Cotesia flavipes* em diferentes intervalos de tempo.

| Hemócitos | Plasmatócito | | | Prohemócito | | | Adipohemócito | | | Oenocitóide | | | Esferulócito | | | Granulócito | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------|---|---|-------------|---|---|---------------|---|---|-------------|---|---|--------------|---|---|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T | P | | T | P | | T | P | | T | P | | T | P | | T | P | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tratamentos | T | P | | T | P | | T | P | | T | P | | T | P | | T | P | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tempo dias) | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 7 | | | | | | | | | |
| Sudan Black | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | ± | + | + | + | ± | ± | ± | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | ± | + | | | | |
| Azul de Toluidina | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | ± | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | ± | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ± | | | | |
| Tricrômico de Mallory | + | + | + | ± | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | ± | ± | ± |

(+) Reação forte
 (-) Nenhuma reação
 (±) Reação fraca