

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

**Regulação da atividade do tecido adiposo de *Diatraea saccharalis*
(Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitada por *Cotesia flavipes*
(Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**

Gabriela Salvador

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

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Gabriela Salvador
Bacharel em Ciências Biológicas

Regulação da atividade do tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius)
(Lepidoptera: Crambidae) parasitada por *Cotesia flavipes* (Cameron)
(Hymenoptera: Braconidae)

Orientador:

Prof. Dr. FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

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

Piracicaba
2010

Dedico aos meus pais, Alder e Rosângela, por terem me ensinado o valor dos estudos e sempre me apoiarem, apesar de todas as dificuldades, e às minhas irmãs Natália e Izabela.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudos concedida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Entomologia e Acarologia, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli, pela orientação.

À minha família, pelo apoio e incentivo, especialmente à Izabela, por ter me acompanhado ao longo de todos esses anos em Piracicaba, e ao Fernando, que me colocou em contato com a entomologia.

Às amigas que pude conhecer no laboratório, pelos bons momentos que passamos: Maru, Claudinha, Larissa e Aline.

Aos colegas do Laboratório de Interações em Insetos, pela convivência.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Tente ser uma pessoa de sucesso,
mas, prioritariamente, tente ser uma
pessoa de valor.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Regulação hospedeira	17
2.2 Regulação da expressão gênica de tecidos do hospedeiro	20
2.3 Tecido adiposo	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Criação e manutenção de populações de <i>D. saccharalis</i> e <i>C. flavipes</i>	27
3.2 Parasitismo e coleta de tecido adiposo	27
3.3 Extração e quantificação de RNA.....	28
3.4 Expressão gênica diferencial do tecido adiposo do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitóide	29
3.5 Análise da expressão diferencial dos transcritos selecionados por PCR semi-quantitativo	30
3.6 Amplificação das regiões terminais do cDNA de interesse	32
3.7 Caracterização do cDNA.....	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Expressão gênica diferencial do tecido adiposo do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitóide	35
4.2 Análise da expressão diferencial dos transcritos selecionados por PCR semi-quantitativo	36
4.3 Caracterização do cDNA codificador da hexamerina	41
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

Regulação da atividade do tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitada por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Ao longo do processo evolutivo, parasitóides desenvolveram a habilidade de manipular inúmeros processos fisiológicos de seus hospedeiros. Entre os efeitos induzidos pelo parasitismo, incluem-se alterações no ambiente nutricional, sistema endócrino e imunológico do hospedeiro, além da manipulação da capacidade de síntese protéica de seus tecidos. O tecido adiposo é o principal órgão de síntese de proteínas em insetos e a manipulação de sua atividade é de fundamental importância para o sucesso do parasitismo. Este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão gênica do tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitada por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), visando à obtenção de dados para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da broca da cana-de-açúcar. Lagartas de *D. saccharalis* na pré-muda para o último ínstar foram separadas, sendo parte delas sujeita ao parasitismo por *C. flavipes*, enquanto outra foi mantida como controle. O tecido adiposo de hospedeiros sadios e parasitados foi coletado 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo e submetido a extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica diferencial via DD-PCR ("Differential Display PCR"). Fragmentos expressos diferencialmente entre os tratamentos foram selecionados, clonados e sequenciados. As sequências obtidas foram comparadas àquelas disponíveis em banco de dados. *C. flavipes* induziu alterações na expressão de um transcrito codificador de uma proteína de armazenamento logo no início do parasitismo. As proteínas de armazenamento, ou hexamerinas, apresentam grande importância no desenvolvimento de insetos, atuando como fonte de aminoácidos a serem utilizados pela pupa e adulto durante a metamorfose e reprodução. Dada a importância desta proteína, o cDNA responsável por sua codificação foi caracterizado via extensão das porções terminais 5' e 3'. A sequência completa do cDNA apresentou 2.353 pb, e o polipeptídeo deduzido, 745 aminoácidos. O conteúdo de metionina e aminoácidos aromáticos, bem como a análise filogenética realizada, indicaram que a hexamerina identificada em *D. saccharalis* é uma proteína rica em metionina. A identificação e caracterização da hexamerina de *D. saccharalis* podem representar o primeiro passo para o desenvolvimento de novos métodos de controle da broca da cana-de-açúcar, baseados nas interações hospedeiro-parasitóide.

Palavras-chave: Ecologia nutricional; Expressão gênica; Hexamerinas; Regulação hospedeira; Tecido adiposo

ABSTRACT

Regulation of the fat body activity of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

During evolution, parasitoids evolved the ability to manipulate the physiology of their hosts. Among the common effects of the parasitism, hosts may show an alteration of their hemolymph composition (parasitoid nutritional environment), endocrine and immune systems, and protein synthesis activity of host tissues. The fat body is the main organ of protein synthesis of insects and the manipulation of its activity is key for parasitoid successful development. The goal of this study was to evaluate the effects of parasitization by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) on the gene expression activity of the fat body of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), to provide additional information on key regulatory pathways to control host metabolism as a step forward for the development of new control strategies based on parasitoid host regulation strategies. Fifth-instars of *D. saccharalis* at the head slippage stage were isolated and separated in two different groups. One group was individually parasitized by *C. flavipes*, and the other was kept as control. The fat bodies of parasitized and non-parasitized hosts were collected 1, 3, 5, 7 and 9 days after parasitism, subjected to RNA extraction, cDNA synthesis and differential gene expression analysis by DD-PCR (Differential Display PCR). Transcripts that were differentially expressed between treatments were selected, cloned and sequenced. The obtained sequences were compared to those available at the NCBI data bank. *C. flavipes* up-regulated the expression of a transcript encoding for a storage protein soon after parasitization. The storage proteins, or hexamerins, are essential for insect development, acting as a reservoir of aminoacids and nitrogen to be used by the pupa and adults during metamorphosis and reproduction. Due to the importance of these proteins, the cDNA encoding this protein was characterized by the amplification of 5' and 3' terminal ends. The complete cDNA has 2,353 bp and the deduced aminoacid sequence is 745 aa long. The methionine and aromatic aminoacids content, as well as phylogenetic analysis, indicated that the hexamerin identified in *D. saccharalis* is a methionine-rich protein. The identification and characterization of the hexamerin identified in *D. saccharalis* is the first step towards to the development of new control strategies based on host-parasitoid interactions.

Keywords: Nutritional ecology; Gene expression; Hexamerins; Host regulation; Fat body

1 INTRODUÇÃO

Parasitóides têm sido utilizados em uma série de programas de controle biológico de insetos devido à sua eficiência na localização e exploração de hospedeiros. A alta eficácia destes organismos entomófagos, aliada ao seu potencial biótico, os elegeram um importante componente do manejo de pragas em sistemas agrícolas (BELLOWS et al., 1999).

Ao longo do processo evolutivo, parasitóides desenvolveram inúmeros mecanismos para manipular os processos fisiológicos e o metabolismo de seus hospedeiros, visando criar um ambiente favorável ao seu próprio desenvolvimento (BECKAGE, 1985). Este processo, denominado regulação hospedeira, pode variar dependendo da história evolutiva de cada associação hospedeiro-parasitóide. Duas estratégias principais de exploração hospedeira podem ser identificadas entre os parasitóides, agrupando-os em: *i*) idiobiontes - parasitóides que se desenvolvem em hospedeiros paralisados ou em estágios sésseis e *ii*) cenobiontes - parasitóides que se desenvolvem no interior de hospedeiros que continuam o seu crescimento e/ou desenvolvimento após o parasitismo (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993). Entre as estratégias utilizadas por parasitóides idiobiontes durante o processo de regulação hospedeira está a introdução de venenos que induzem a paralisia do hospedeiro (WEAVER et al., 2001). Já os parasitóides cenobiontes utilizam estratégias distintas, induzindo uma série de alterações na composição da hemolinfa (ambiente nutricional do parasitóide), sistema endócrino e imunológico do hospedeiro, além de alterarem a capacidade de síntese protéica do hospedeiro (ASGARI; HELLERS; SCHMIDT, 1996; THOMPSON, 2001; SHENG et al., 2003; BARAT-HOUARI et al., 2006).

O conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de regulação hospedeira poderá contribuir para o aprimoramento e desenvolvimento de novas estratégias de controle de insetos, incluindo, principalmente, a identificação de moléculas derivadas do parasitóide e as vias metabólicas do hospedeiro passíveis de regulação, levando à identificação de novos sítios-alvo e permitindo o uso de técnicas modernas de controle de insetos, tais como o uso de variedades transgênicas (BECKAGE; GELMAN, 2004).

No Estado de São Paulo, o endoparasitóide *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) se destaca como importante inimigo natural desde a sua introdução, no início da década de 70, para o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). A implementação de um programa de controle biológico de *D. saccharalis* e o uso contínuo de liberações deste parasitóide em canaviais do estado permitiram que os prejuízos causados pela broca da cana-de-açúcar fossem reduzidos significativamente (BOTELHO; MACEDO, 2002).

O uso de métodos alternativos e o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de pragas são importantes para *i*) a manutenção do equilíbrio ecológico do agroecossistema e *ii*) a diminuição dos efeitos nocivos causados aos organismos não-alvo. Esta necessidade se torna crescente com a expansão da cultura canavieira no Brasil, que inicia a exploração de novas fronteiras agrícolas. Esta expansão ocorre devido ao fato da cana-de-açúcar ter se tornado a principal fonte de matéria prima natural para a busca e desenvolvimento de biocombustíveis, dada a crescente demanda mundial por etanol como substituto às fontes de energia derivadas de combustíveis fósseis (BOTELHO; MACEDO, 2002; GRAIN, 2007).

A disponibilidade de áreas agriculturáveis para sustentar a expansão da cultura canavieira e o domínio da tecnologia de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, associados aos problemas existentes com a utilização de culturas tradicionalmente empregadas na alimentação humana e animal para a produção de biocombustíveis, tornam o Brasil o principal mercado produtor (FARRELL et al., 2006; HILL et al., 2006).

Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a regulação da expressão gênica do tecido adiposo em lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes*, como fonte de novas informações que levem à identificação de sítios-alvo de ação e vias metabólicas do hospedeiro, permitindo a utilização de técnicas modernas de controle de pragas e/ou o desenvolvimento de métodos específicos de controle eficientes, que não agridam o ambiente e a fauna não-alvo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Regulação hospedeira

Parasitóides desenvolveram uma série de mecanismos para manipular a fisiologia e o metabolismo de seus hospedeiros, visando criar um ambiente adequado ao seu próprio desenvolvimento. Este processo de manipulação, denominado regulação hospedeira, é variável dependendo da história evolutiva de cada associação hospedeiro-parasitóide (PENNACHIO; STRAND, 2006).

De forma geral, é possível verificar duas estratégias básicas de exploração hospedeira, permitindo agrupar os parasitóides em *i)* idiobiontes ou *ii)* cenobiontes. Parasitóides idiobiontes se desenvolvem em hospedeiros paralisados ou em estágios sésseis (ovos e pupas). Parasitóides cenobiontes, por sua vez, permitem que o organismo hospedeiro continue a se desenvolver após o parasitismo (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993). Hospedeiros de idiobiontes não se alimentam, crescem ou sofrem metamorfose após o parasitismo e representam uma quantidade fixa de recursos para a larva do parasitóide. Assim, a qualidade do hospedeiro depende de seu tamanho no momento do parasitismo, com hospedeiros maiores apresentando maior qualidade em relação a hospedeiros menores. Já os hospedeiros de cenobiontes continuam a se alimentar, crescer e se desenvolver após o parasitismo. Conseqüentemente, a qualidade do hospedeiro como fonte de recursos será influenciada pelo seu futuro crescimento, e depende mais da idade e do estágio de desenvolvimento do hospedeiro no momento do parasitismo do que de seu tamanho (MACKAUER; SEQUEIRA, 1993). Parasitóides podem também diferir quanto ao seu local de desenvolvimento no hospedeiro, sendo agrupados em ectoparasitóides, quando se desenvolvem exteriormente ao corpo do hospedeiro, ou endoparasitóides, quando se desenvolvem internamente ao hospedeiro.

No caso de parasitóides idiobiontes, a paralisia do hospedeiro é o primeiro passo a ser executado no processo de regulação. Assim, no momento da oviposição, fêmeas do parasitóide injetam veneno para induzir a paralisia do hospedeiro. Além do veneno, as fêmeas também podem depositar secreções enzimáticas que auxiliam no processo

de digestão de tecidos do hospedeiro e, conseqüentemente, na sua aquisição pelo imaturo em desenvolvimento. Embora hospedeiros de idiobiontes representem uma quantidade finita de recursos para o parasitóide em desenvolvimento (THOMPSON, 1993), há associações em que a disponibilidade de proteínas, lipídeos e carboidratos pode ser variável ao longo do parasitismo. Isto indica que o parasitóide utiliza recursos nutricionais que diferem quanto à sua composição e valor energético em diferentes estágios do seu desenvolvimento (RIVERS; DENLINGER, 1994; 1995).

Hospedeiros de cenobiontes, ao contrário, continuam a se desenvolver após o parasitismo. Neste caso, o sistema imunológico do hospedeiro é a primeira barreira a ser vencida pelo parasitóide. Assim, para se desenvolverem com sucesso na hemocele de hospedeiros, parasitóides cenobiontes utilizam uma série de estratégias que permitem a supressão da resposta imune, especialmente a encapsulação, a qual constitui o principal mecanismo de defesa de hospedeiros contra ovos e larvas de parasitóides (STRAND, 2008). As estratégias utilizadas para suprimir o sistema imunológico de hospedeiros diferem entre os parasitóides, os quais podem utilizar fatores imunossupressores maternos (depositados no momento da oviposição juntamente com os ovos), tais como veneno, partículas virais simbiotes e proteínas do ovário, ou fatores derivados do próprio embrião, tais como os teratócitos (BASIO; KIM, 2005; YU, 2007; PRUIJSSERS et al., 2009).

A manipulação do sistema endócrino é outro processo a ser executado, sendo fundamental para garantir que o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro sejam condizentes com a estratégia de utilização hospedeira do inimigo natural, se reguladora ou “conformista”. Endoparasitóides que utilizam a estratégia conformista sincronizam seu desenvolvimento ao do hospedeiro, enquanto endoparasitóides que utilizam a estratégia reguladora alteram o desenvolvimento do hospedeiro para sustentar seu próprio crescimento (LAWRENCE, 1986; HARVEY, 1996). A alteração do desenvolvimento do hospedeiro ocorre via manipulação de seus níveis hormonais, principalmente os de hormônios envolvidos no processo de metamorfose, como os ecdisteróides e hormônio juvenil, o que pode levar ao retardo ou antecipação da muda do hospedeiro (LEE; KIM, 2004; PFISTER-WILHELM; LANZREIN, 2009). No caso de ectoparasitóides cenobiontes, o controle hormonal também é essencial, uma vez que o

processo de muda deve ser evitado para que os ovos do parasitóide não sejam eliminados juntamente com a cutícula do hospedeiro (BECKAGE; GELMAN, 2004).

Visto que o hospedeiro representa a única fonte de alimento disponível para o parasitóide em desenvolvimento, o ambiente nutricional deve ser regulado para que as exigências nutricionais do imaturo possam ser atendidas. Assim, o parasitóide induz inúmeras alterações bioquímicas na hemolinfa de seus hospedeiros, afetando a disponibilidade de açúcares, tais como glicose e trealose, e/ou manipulando processos metabólicos como a gliconeogênese e o armazenamento de glicogênio pelo tecido adiposo (DAHLMAN; VINSON, 1975; THOMPSON; DAHLMAN, 1998; 1999; THOMPSON, 2001; SALVADOR; CÔNSOLI, 2008). Parasitóides podem também alterar a disponibilidade de outros nutrientes, como os aminoácidos livres (VINSON, 1990; HOPKINS; STARKEY; BECKAGE, 1998; RAHBÉ et al., 2002; CÔNSOLI; VINSON, 2004).

As estratégias utilizadas pelos parasitóides para o suprimento de suas exigências nutricionais incluem ainda a manipulação do consumo e da utilização do alimento pelo hospedeiro (SCHOPF; STEINBEIRG, 1996; MORALES; MEDINA; VIÑUELA, 2006). Assim, o parasitismo pode ser responsável pela alteração de fatores como a digestibilidade, assimilação do alimento e eficiência de conversão metabólica dos hospedeiros, que, conseqüentemente, apresentam alterações em seu crescimento. A intensidade das alterações induzidas, porém, pode depender da densidade de parasitóides se desenvolvendo por hospedeiro, da idade do hospedeiro parasitado ou ainda, da qualidade do hospedeiro como fonte nutricional disponível aos parasitóides (THOMPSON; REDAK; WANG, 2001; NAKMATSU; TANAKA, 2004).

O investimento de nutrientes pelo hospedeiro é um aspecto importante a ser regulado e os parasitóides devem garantir que os recursos nutricionais disponíveis não sejam alocados para o crescimento e desenvolvimento de tecidos que não sejam utilizados pelo imaturo em desenvolvimento. Assim, alterações morfológicas também ocorrem como resultado do parasitismo, tais como a inibição do desenvolvimento de asas e de estruturas reprodutivas de hospedeiros (DIGILIO, 2000; KATI; HARDIE, 2010).

Alterações no comportamento de hospedeiros parasitados também têm sido relatadas. Para evitar a maior exposição de seus hospedeiros e, conseqüentemente, reduzirem as chances de super ou hiperparasitismo (os quais podem ser prejudiciais aos imaturos em desenvolvimento, uma vez que aumentam a competição pelo hospedeiro), parasitóides podem alterar a locomoção e interferir no processo de aposematismo de hospedeiros (STAMP, 1981; LIBERSAT; DELAGO; GAL, 2009).

As estratégias de regulação hospedeira podem ainda estar associadas à biologia do desenvolvimento do parasitóide. Parasitóides podem atacar hospedeiros no estágio máximo de crescimento, os quais representam o maior potencial nutricional para sustentar o desenvolvimento de seus imaturos. Neste caso, o parasitóide deve utilizar meios que evitem o desenvolvimento do hospedeiro e fazer uso rápido deste recurso nutricional. Outras espécies podem parasitar hospedeiros em diversos estágios de desenvolvimento, retardando o seu próprio desenvolvimento imaturo até que o hospedeiro acumule nutrientes suficientes para sustentar o parasitismo com sucesso, quando o desenvolvimento imaturo do parasitóide será então retomado (VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; HARVEY, 2005).

2.2 Regulação da expressão gênica de tecidos do hospedeiro

A regulação da atividade de síntese dos tecidos do hospedeiro e a produção de proteínas específicas do parasitismo (PSP) são características comuns aos parasitóides cenobiontes, permitindo, assim, o controle do crescimento e desenvolvimento do hospedeiro e da alocação de nutrientes (VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001; BECKAGE; GELMAN, 2004). As proteínas específicas do parasitismo podem ocorrer no início ou no final do desenvolvimento larval do parasitóide, dependendo da história evolutiva de cada associação hospedeiro-parasitóide (BECKAGE, 1993). Esta manipulação da atividade sintética do hospedeiro pode ocorrer como resultado da ação de produtos derivados do parasitóide, como veneno, fluidos do cálice, partículas virais ou teratócitos, ou da ação da própria larva do parasitóide em desenvolvimento (BECKAGE; GELMAN, 2004).

Parasitóides cenobiontes pertencentes a algumas das subfamílias de Braconidae

e Ichneumonidae apresentam associações de simbiose com partículas virais específicas (polidnavírus), as quais desempenham papel fundamental no processo de regulação hospedeira, permitindo a colonização do hospedeiro e o desenvolvimento do parasitóide (KROEMER; WEBB, 2004). Os polidnavírus (PDVs) são integrados ao genoma de seus hospedeiros (parasitóides) e se replicam exclusivamente no ovário em desenvolvimento durante a fase pupal ou em fêmeas adultas do parasitóide. Estas partículas virais são injetadas no momento da oviposição, infectando vários tecidos do hospedeiro e induzindo alterações fisiológicas que favorecem a colonização e o estabelecimento do parasitóide (SHELBY; WEBB, 1994; 1997; ASGARI; HELLERS; SCHMIDT, 1996; NAKAMATSU; GYOTOKU; TANAKA, 2001; KROEMER; WEBB, 2004).

As partículas virais apresentam importante papel na supressão do sistema imunológico do hospedeiro. Produtos da expressão gênica de polidnavírus podem induzir a morte celular de hemócitos, inativando a resposta imunológica. A presença de polidnavírus do parasitóide *Cotesia rubecula*, por exemplo, altera a estrutura do citoesqueleto celular e as propriedades de adesão das células de defesa do hospedeiro, *Pieris rapae* (ASGARI; HELLERS; SCHMIDT, 1996). As partículas virais associadas ao parasitóide *Microplitis demolitor*, por sua vez, além de induzirem apoptose de células de defesa, impedem o processo de melanização, interferindo na ativação da cascata das profenoloxidasas (BECK; STRAND, 2007; SUDERMAN; PRUIJSSERS; STRAND, 2008). Os PDVs também podem atuar na regulação da transcrição gênica de tecidos do hospedeiro, como as células de defesa, os hemócitos, ou o tecido de síntese e armazenamento, o tecido adiposo, afetando principalmente a transcrição de genes codificadores de proteínas envolvidas na resposta imunológica (SHELBY; CUI; WEBB, 1998; BARAT-HOUARI et al., 2006).

O sistema endócrino do hospedeiro também é alvo da ação reguladora dessas partículas virais. A injeção de polidnavírus de *Cotesia congregata* em lagartas de quarto ínstar de *Manduca sexta* induziu sintomas sugestivos da permanência de níveis elevados de hormônio juvenil na hemolinfa, suprimindo, assim, a metamorfose do hospedeiro (DUSHAY; BECKAGE, 1993; BECKAGE et al., 1994). A presença das partículas virais do parasitóide pode induzir o prolongamento do último ínstar larval do

hospedeiro, inibindo o início da fase de pupa devido à regulação das glândulas protorácicas, assim como observado na interação *Toxoneuron nigriceps* - *Heliothis virescens* (PENNACHIO et al., 1998). Nesta associação, o parasitóide também induz alterações no metabolismo e níveis de hormônio juvenil disponíveis no final da fase larval do hospedeiro (SHENG et al., 2003). Polidnavírus também são responsáveis pela inibição das esterases responsáveis pela degradação do hormônio juvenil, alterando os níveis deste hormônio na associação *Glyptapanteles liparidis* - *Lymantria dispar* (SCHAFELLNER; MARKTL; SCHOPF, 2007).

Ainda, como resultado das alterações endócrinas, as partículas virais podem alterar indiretamente a fisiologia nutricional do hospedeiro, uma vez que a elevação dos níveis de hormônio juvenil pode ser parcialmente responsável pelo aumento dos níveis de proteína circulante, já que o mesmo atua na regulação da expressão de genes codificadores de proteínas do desenvolvimento (PENNACHIO et al., 2001; VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001).

Juntamente com as partículas virais, parasitóides depositam, no momento da oviposição, secreções oriundas do aparelho reprodutor, tais como o veneno e os fluidos do cálice (VINSON; IWATSCH, 1980). O veneno é produzido por um par de glândulas especializadas, associado ao aparelho reprodutor, e armazenado em um reservatório (EDWARDS; WEAVER, 2001). Constituídos por uma complexa mistura de peptídeos e proteínas, os venenos produzidos por endoparasitóides também podem ser necessários para que as partículas virais possam desempenhar suas funções (ASGARI, 2006). Dentre os efeitos causados pela ação do veneno de parasitóides, estão *i*) o controle do desenvolvimento do hospedeiro, pela inibição dos processos de apólise e ecdise (GELMAN; THOMAS; COUDRON, 1997), *ii*) a inibição da resposta imunológica (RICHARDS; DANI, 2008) e *iii*) a regulação da síntese de proteínas pelo tecido adiposo (NAKAMATSU; TANAKA, 2003).

Um outro produto derivado do parasitóide, que também pode atuar na manipulação do hospedeiro, são os teratócitos. Teratócitos são células derivadas da dissociação da serosa do embrião, as quais são liberadas na hemolinfa do hospedeiro após a eclosão da larva (DAHLMAN; VINSON, 1993). Os teratócitos produzem proteínas que podem atuar na regulação do desenvolvimento e metabolismo do

hospedeiro (SCHEPERS; DAHLMAN; ZHANG, 1998; FALABELLA; TREMBLAY; PENNACCHIO, 2000; ZHANG; DAHLMAN, 2005) e na inibição da resposta imune (ANDREW; BASIO; KIM, 2006). Ainda, as proteínas secretadas por teratócitos podem desempenhar atividade enzimática, auxiliando na digestão de tecidos do hospedeiro e na disponibilização de nutrientes para a larva do parasitóide (NAKAMATSU; FUJI; TANAKA, 2002; CÔNSOLI et al., 2005; FALABELLA et al., 2009), ou servir como fonte de nutrientes para o imaturo do parasitóide em desenvolvimento (KADONO-OKUDA; WEYDA; OKUDA, 1998). Teratócitos também podem induzir alterações na capacidade sintética de tecidos do hospedeiro, como o tecido adiposo, o qual demonstrou ter a sua capacidade de síntese protéica inibida pela presença de produtos de secreção dos teratócitos (SCHEPERS; DAHLMAN; ZHANG, 1998).

Partículas virais simbiotes, veneno, fluidos do cálice e teratócitos podem ainda alterar a expressão de proteínas estágio-específicas, as quais representam um dos principais componentes da hemolinfa de hospedeiros holometábolos. As proteínas estágio-específicas, também denominadas proteínas de armazenamento, são acumuladas em grandes quantidades na hemolinfa durante o desenvolvimento larval e servem como fonte de aminoácidos e nitrogênio a serem utilizados pelo inseto durante períodos em que não se alimentam, tais como a metamorfose e a diapausa. Assim, dado o papel fundamental das proteínas de armazenamento no desenvolvimento e crescimento dos insetos, a alteração da expressão das mesmas em decorrência do parasitismo tem sido relatada para uma série de associações (DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996; SHELBY; WEBB, 1997; ZHU et al., 2009).

O mecanismo de regulação empregado, porém, difere entre as espécies de parasitóides, tendo sido identificadas associações em que ocorre redução dos níveis de hexamerinas do hospedeiro, como no caso de *Heliothis virescens* parasitada por *Microplitis croceipes*, e outras nas quais os níveis de hexamerinas em hospedeiros parasitados são maiores, como na associação *Pieris rapae* - *Pteromalus puparum* (DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996; ZHU et al., 2009). A alteração dos níveis de proteínas estágio-específicas pode também ocorrer como resultado de alterações no sistema endócrino de hospedeiros, visto que a expressão destas proteínas sofre controle hormonal (GODLEWSKI et al., 2003).

Ainda, a própria larva do parasitóide em desenvolvimento, devido às suas secreções, pode alterar a bioquímica e fisiologia de seu hospedeiro. Larvas de parasitóides em desenvolvimento podem liberar hormônios, tais como ecdisteróides e hormônio juvenil, na hemolinfa de seus hospedeiros (BROWN et al., 1993; COLE et al., 2002). Outro mecanismo utilizado é a secreção de proteínas que atuam como enzimas digestivas pela larva do parasitóide (VINSON; MOURAD; SEBESTA, 1994).

2.3 Tecido adiposo

Embora pareça superficialmente apenas um tecido de armazenamento, o tecido adiposo é na realidade o principal centro da atividade metabólica em insetos, produzindo e liberando proteínas, lipídeos e carboidratos para a hemolinfa, que servirão como precursores para o metabolismo em outros tecidos (KEELEY, 1985).

A estrutura e organização do tecido adiposo são variáveis entre os diferentes grupos de insetos. Em lepidópteros, duas regiões distintas podem ser observadas: o tecido adiposo periférico ou subcuticular, localizado próximo à parede do corpo do inseto, e o tecido adiposo visceral ou central, que circunda o canal alimentar (HAUNERLAND; SHIRK, 1995). Essa diferenciação regional reflete em diferentes funções, uma vez que o tecido visceral parece ser biossinteticamente mais ativo, enquanto o periférico parece ser responsável pelo armazenamento de nutrientes. Embora possa variar quanto à estrutura, uma característica marcante do tecido adiposo é sua grande exposição à hemolinfa, o que permite a intensa movimentação de moléculas necessárias aos processos metabólicos (DEAN; LOCKE, 1985).

Entre a série de atividades metabólicas desempenhadas pelo tecido adiposo, estão o metabolismo intermediário e a manutenção da homeostase da hemolinfa. O tecido adiposo também desempenha uma série de atividades metabólicas específicas de cada estágio do desenvolvimento que envolve a produção, armazenamento e liberação de nutrientes e metabólitos para atender às exigências nutricionais ou aos eventos metamórficos do inseto (HAUNERLAND; SHIRK, 1995).

O tecido adiposo é o principal órgão de síntese de proteínas do inseto, incluindo proteínas envolvidas na reprodução, como as vitelogeninas, no controle hormonal,

como as esterases, que degradam o hormônio juvenil, ou na resposta imunológica, como as lisozimas. Ainda, o tecido adiposo é responsável pela síntese de proteínas estágio-específicas, como as proteínas de armazenamento e aquelas envolvidas no processo de diapausa, entre outras. Este tecido é, portanto, o centro de origem de diversas proteínas e metabólitos envolvidos em uma série de processos metabólicos. O controle de suas atividades é essencial para a regulação da fisiologia, do metabolismo e alocação de nutrientes do hospedeiro (KEELEY, 1985).

A regulação das atividades do tecido adiposo permite ao imaturo do parasitóide acessar nutrientes específicos em quantidade adequada ao longo de seu desenvolvimento. Além disso, a manipulação da atividade de síntese deste tecido é também necessária a outras etapas importantes do parasitismo, como o controle hormonal e a supressão do sistema imunológico do hospedeiro, já que muitas proteínas envolvidas nestes processos são sintetizadas pelo tecido adiposo. É evidente, portanto, a importância da regulação da atividade de síntese do tecido adiposo para o desenvolvimento imaturo do parasitóide.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

D. saccharalis foi produzida em dieta à base de farelo de soja e germe de trigo (MACEDO et al., 1983). Lagartas de *D. saccharalis* foram removidas dos tubos de criação e oferecidas individualmente às fêmeas de *C. flavipes* para oviposição. Logo após o parasitismo, as lagartas foram transferidas para placas plásticas (5 cm de diâmetro) contendo nova dieta e armazenadas em câmaras climatizadas para o desenvolvimento do parasitóide. Após o término do desenvolvimento larval do parasitóide, as massas de casulos, contendo as pupas de *C. flavipes*, foram removidas e transferidas para recipientes limpos de criação para a emergência e acasalamento dos adultos. Os adultos foram alimentados com gotículas de mel aplicadas contra a parede dos recipientes de criação. Todos os insetos foram criados segundo Parra (1999) e mantidos em salas de criação com condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotofase (14 h).

3.2 Parasitismo e coleta de tecido adiposo

Lagartas do hospedeiro no penúltimo estágio foram parasitadas individualmente na fase de pré-muda, evidenciada pelo afastamento da cápsula cefálica em relação à região torácica. Essas lagartas foram mantidas nas condições descritas anteriormente e avaliadas após 12 h de parasitismo, selecionando-se apenas aquelas que mudaram para o último ínstar. Lagartas não-parasitadas passaram pelo mesmo processo de seleção, buscando-se minimizar as diferenças de desenvolvimento entre os indivíduos utilizados nos experimentos. O tecido adiposo de lagartas controle e parasitadas foi coletado 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo para se avaliar a regulação dos processos de síntese de proteínas do hospedeiro ao longo do desenvolvimento do parasitóide. Para cada período amostral foram coletados tecidos de cinco hospedeiros parasitados e cinco hospedeiros não-parasitados. A dissecação de lagartas parasitadas e não-parasitadas foi feita em solução anticoagulante refrigerada (98 mM NaOH, 0,19 M

NaCl, 1,7 mM EDTA, 41 mM ácido cítrico, pH 4,5) (STRAND; WITHERELL; TRUDEAU, 1997), preparada com água tratada com 0,01% de pirocarbonato dietílico (DEPC). As lagartas foram lavadas em banhos sucessivos na mesma solução e o tecido adiposo extraído foi armazenado a -80°C em frascos estéreis, contendo solução estabilizadora de RNA (RNA $later$ ® Ambion).

3.3 Extração e quantificação de RNA

Para a extração de RNA, porções das cinco amostras de tecido adiposo de cada tratamento (parasitado e não-parasitado), em cada um dos períodos amostrais, foram adicionadas a um único frasco estéril. Assim, cada tratamento foi formado pela união de porções de tecido adiposo provenientes das cinco repetições coletadas. O RNA foi extraído utilizando-se o Total RNA Purification System (Norgen Biotek Corporation). Após a dissociação e digestão do tecido adiposo em solução lítica, a amostra foi centrifugada a $14.000\text{ g} \times 2\text{ min}$, um volume de etanol a 70% foi adicionado e a amostra misturada por vórtex. Alíquotas foram aplicadas às colunas de purificação de RNA e submetidas à centrifugação ($14.000\text{ g} \times 1\text{ min}$), sendo o filtrado descartado. A coluna foi lavada por centrifugação ($14.000\text{ g} \times 1\text{ min}$) com solução de lavagem (3x). Após a última lavagem, a coluna foi novamente centrifugada a 14.000 g por 1 min, para permitir a secagem da membrana. Em seguida, foram adicionados $50\text{ }\mu\text{l}$ de solução de eluição e, após 10 min, a coluna foi novamente centrifugada a 200 g durante 2 min, seguidos por mais 1 min a 14.000 g , sendo o filtrado coletado e armazenado a -80°C .

A quantificação do RNA foi feita via leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (260/280 nm). Para a leitura da absorbância, $1\text{ }\mu\text{l}$ da amostra de RNA foi adicionado a $9\text{ }\mu\text{l}$ de solução tampão TE (10 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA).

3.4 Expressão gênica diferencial do tecido adiposo do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitóide

A identificação de genes expressos diferencialmente no tecido adiposo durante o período de desenvolvimento larval do parasitóide foi realizada pela técnica de display diferencial de PCR (DD-PCR - Differential Display PCR) (LIANG; PARDEE, 1992), utilizando-se o sistema GeneFishing™ DEG Premix Kit (Seegene Inc., MA).

A reação de transcrição reversa das amostras de RNA foi conduzida utilizando-se 2 µl do iniciador dT-ACP1 (10 µM) (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)₁₈-3'), disponível no sistema GeneFishing, e um volume equivalente a 3 µg de RNA. A esta reação adicionou-se água livre de Rnases para um volume final de 9,5 µl. Em seguida, as amostras foram mantidas a 80°C durante 3 min e incubadas em gelo durante 2 min. Após os tratamentos térmicos, foram adicionados à reação: 4 µl de tampão da transcriptase reversa, 5 µl de DNTP (2 mM), 0,5 µl de inibidor de Rnases (40 U/µl) e 1 µl de M-MLV transcriptase reversa (200 U/µl). Seguiu-se tratamento térmico a 42°C por 90 min, 94°C por 2 min e gelo por 2 min. Ao final, a fita simples de cDNA foi ressuspensa em 80 µl de água livre de Rnases.

Após a transcrição reversa, as amostras de cDNA obtidas foram amplificadas com vinte conjuntos de iniciadores, cada qual composto por um dos 20 iniciadores arbitrários mais o iniciador dT-ACP2, todos disponíveis no sistema GeneFishing. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume total de 20 µl, sendo 0,7 µl de cDNA, 0,5 mM de cada iniciador, 10 µl de 2x SeeAmp™ ACPTM Master Mix e água, em termociclador (Endurance TC-512, Techne) programado de um ciclo a 94°C por 5 min, 50°C por 3 min, 72°C por 1 min, seguido por 40 ciclos a 94°C por 40 s, 65°C por 40 s, 72°C por 40 s, e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão TAE.

Para a seleção de transcritos, comparou-se o padrão de amplificação obtido com cada conjunto de iniciadores em insetos parasitados e não-parasitados, que se encontravam no mesmo intervalo de desenvolvimento. Desta forma, o padrão de amplificação obtido em amostra controle (não-parasitada) um dia após o parasitismo foi

comparado com o padrão obtido em amostra parasitada no mesmo período, e assim sucessivamente. Os fragmentos expressos diferencialmente foram recortados do gel de agarose e acondicionados em tubos de centrífuga. A purificação dos fragmentos foi feita utilizando-se o kit Invisorb (Invitex), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Os fragmentos extraídos do gel de agarose foram inseridos em plasmídeo vetor disponível no sistema pGEM®-T Easy Vector System (Promega) e utilizados na transformação de células competentes de alta eficiência NEB *Escherichia coli* 5-alpha (New England BioLabs), para a multiplicação de plasmídeos, seguindo as recomendações do fabricante. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura LB acrescido de 100 µg/ml de ampicilina, tendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (XGAL) como substrato para a ação da enzima β-galactosidase, indicadora de transformação. Colônias positivas foram isoladas, cultivadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µg/ml) e utilizadas para a extração de plasmídeos. Os plasmídeos extraídos foram amplificados com os iniciadores T7 (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA - 3') e MR13 (5'- CAGGAAACAGCTATGAC – 3'), os quais identificam áreas do vetor que flanqueiam o inserto. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume total de 25 µl, sendo 1 µl de DNA, 200 µM dNTP/cada, 0,8 mM de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µl de 5X Green Go Taq Flexi Buffer, 0,625 unidade de GoTaq Flexi DNA e água, em termociclador (Endurance TC-512, Techne) programado a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 2 min (35 ciclos); seguidos de extensão final a 72°C por 5 min.

Em seguida, os produtos de amplificação foram sequenciados no Centro de Biotecnologia Agrícola (Departamento de Ciências Biológicas – Esalq/USP). As sequências obtidas foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.5 Análise da expressão diferencial dos transcritos selecionados por PCR semi-quantitativo

A análise da expressão dos transcritos selecionados no tecido adiposo de *D. saccharalis* ao longo do desenvolvimento larval de *C. flavipes* foi realizada por meio de

PCR semi-quantitativo, utilizando-se dois conjuntos de iniciadores gene específicos (DsMetR-F1: ATGTTTGTTCATTGTCAGCCCTGTA e DsMetR-R1: ATCAGTGTCGAGG TATGTCAGAT, para a proteína de armazenamento, e DsRib-F: AGGCAGCAGT GGGGAATATT e DsRib-R: ATCACTCTAGTAACCCGTAT, para a proteína ribossomal), desenvolvidos a partir das sequências obtidas via DD-PCR. Amostras de cDNA provenientes do tecido adiposo de insetos controle e parasitados, nos intervalos de 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o parasitismo, foram obtidas pelo método descrito no item anterior. Após quantificação em espectrofotômetro, as amostras tiveram sua concentração padronizada em 25 ng/μl. Para as reações de amplificação, conduzidas em volume final de 25 μl, as amostras de cDNA foram diluídas 10x, para a amplificação do transcrito codificador da proteína de armazenamento e 100x para a amplificação do transcrito codificador da proteína ribossomal, tendo sido utilizado 1 μl do cDNA diluído, 200 μM dNTP/cada, 0,8 mM de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 5 μl de 5X Green Go Taq Flexi Buffer, 0,625 unidade de GoTaq Flexi DNA e água. A reação foi conduzida em termociclador (Endurance TC-512, Techne) programado a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, 72°C por 45 s (25 ciclos); seguidos de extensão final a 72°C por 5 min. Como controle, foram utilizados iniciadores comuns ao gene da actina (Fw - ATCCTCACCTGAAGTACCC e R - CCACACGCAGCTCATTGTA), seguindo-se as mesmas condições de amplificação anteriormente descritas.

Os produtos de amplificação obtidos foram visualizados em géis de agarose a 1,5% contendo 0,5 μg/ml de brometo de etídio, em tampão TAE, para visualização e registro de imagens para posterior análise. As imagens obtidas foram submetidas à análise para a quantificação do DNA amplificado para cada amostra, utilizando-se o programa GelQuant. As unidades arbitrárias de medida de intensidade das bandas avaliadas foram convertidas em concentração relativa, utilizando-se um marcador molecular de concentração previamente conhecida (1 Kb e 100 pb, Norgen) como padrão. Foram realizadas três repetições para cada tratamento e os valores médios obtidos foram comparados pelo teste t ($P < 0,05$), dentro de cada intervalo analisado (parasitado vs. não-parasitado).

3.6 Amplificação das regiões terminais do cDNA de interesse

A amplificação das regiões terminais 5' e 3' do cDNA foi realizada utilizando-se o método GeneRacer (GeneRacer Kit for full-length RLM-RACE, Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. O RNA obtido (item 3.3) foi inicialmente tratado com fosfatase intestinal bovina (CIP) para a remoção do fosfato presente na região terminal 5' em sequências de mRNA truncado ou RNA não-mensageiro. O processo de defosforilação foi conduzido expondo o material a 50°C durante 1 h, utilizando-se 2,5 µg de RNA, 1 µl de tampão CIP 10X, 1 µl de RNaseOUT (40 U/µl), 1 µl de CIP (10 U/µl) e água livre de Rnases para um volume de reação final de 10 µl. Em seguida, o RNA sofreu tratamento com pirofosfatase ácida (TAP) para a remoção do tampão da região terminal 5' presente em sequências completas de mRNA, liberando, assim, o fosfato para posterior ligação com o oligo de RNA GeneRacer. Esta etapa foi conduzida a 37°C durante 1 h, utilizando 7 µl do RNA desfosforilado, 1 µl de tampão TAP 10X, 1 µl de RNaseOUT (40 U/µl) e 1 µl de TAP (0,5 U/µl).

Subsequentemente, foi realizada a ligação do oligo de RNA GeneRacer para proporcionar um sítio de ligação conhecido antes da reação de transcrição reversa (RT-PCR). A ligação foi feita pela adição de 7 µl do RNA a 0,25 µg do oligo de RNA GeneRacer liofilizado, seguindo-se ao tratamento térmico a 65°C durante 5 min para relaxamento da estrutura secundária do RNA. Posteriormente, a amostra foi incubada em gelo durante dois minutos e, em seguida, foram adicionados 1 µl de tampão de ligação 10X, 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de RNaseOUT (40 U/µl) e 1 µl de T4 RNA ligase (5 U/µl), e nova exposição a 37°C por 1 h.

Para a reação de transcrição reversa (RT-PCR), foram adicionados ao RNA 1 µl do iniciador GeneRacer Oligo dT, 1 µl de dNTP e 1 µl de água estéril, seguido por tratamento térmico a 65°C durante 5 min e incubação em gelo por 1 min. Posteriormente, foram adicionados: 4 µl de tampão First Strand 5X, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNaseOUT (40 U/ µl) e 1 µl da enzima SuperScript II RT, seguido de novo tratamento térmico a 50°C por 45 min. A reação de transcrição reversa foi inativada a 70°C por 15 min, seguida de incubação em gelo por 2 min. Na sequência, adicionou-se

1 µl de Rnase H à reação, que foi incubada a 37°C por 20 min, sendo posteriormente armazenada a -20°C para as reações de amplificação.

A sequência completa do cDNA de interesse foi obtida utilizando-se os mesmos iniciadores específicos empregados para a análise de PCR semi-quantitativo. A sequência terminal 5' completa foi obtida após amplificação do cDNA estendido, utilizando-se iniciador derivado da sequência de interesse como iniciador anti-senso e o GeneRacer 5' Primer (homólogo ao oligo de RNA GeneRacer) em reação de amplificação. A mesma reação foi utilizada para a obtenção da sequência completa da região terminal 3', tendo como iniciador senso a sequência derivada do produto de interesse e o GeneRacer 3' Primer (homólogo ao primer GeneRacer Oligo dT) como iniciador reverso. As reações de amplificação foram conduzidas em volume total de 25 µl, sendo 1 µl do cDNA estendido, 200 µM dNTP/cada, 0,4 mM de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µl de 5X Green Go Taq Flexi Buffer, 0,625 unidade de GoTaq Flexi DNA e água. As reações foram conduzidas utilizando procedimento "touchdown", sendo o termociclador (Endurance TC-512, Techne) programado a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 30 s, 68°C por 30 s, 72°C por 2 min (5 ciclos); 94°C por 30 s, 68°C por 30 s (max), 63°C por 30 s (min), 72°C por 2 min (10 ciclos, -0,5°C por ciclo); 94°C por 30 s, 63°C por 30 s, 72°C por 2 min (20 ciclos); 72°C por 10 min.

Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose e os amplicons de interesse purificados, clonados e sequenciados de acordo com o item 3.4.

3.7 Caracterização do cDNA

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o algoritmo Pairwise Blast para se verificar a qualidade e identidade das regiões de sobreposição das sequências originais e aquelas produzidas após a reação de extensão das regiões 5' e 3' (TATUSOVA; MADDEN, 1999). A sequência completa obtida foi comparada com sequências depositadas no banco de dados do GenBank utilizando-se do algoritmo de busca BLAST-X (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1990). Softwares disponíveis no servidor para estudos de proteoma (ExpASy – Expert Protein Analysis System) do Instituto de Bioinformática Suíço (SIB) (<http://us.expasy.org/>) foram

utilizados para a caracterização do cDNA. O software SignalP foi utilizado para prever o peptídeo sinal da sequência de aminoácidos deduzida (NIELSEN; BRUNAK; VON HEIJNE, 1999), os softwares Ogpnet 1.0 e NetPhos 2.0 foram empregados na identificação dos sítios potenciais de glicosilação e fosforilação da proteína (BLOM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999) e o software ScanProsite foi utilizado para identificação de domínios conservados.

Uma árvore filogenética foi construída pelo método da vizinhança (“neighbor-joining”) com auxílio do programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007), utilizando-se o método p-distance, contando com 1000 pseudorepetições (bootstrap). O mesmo programa foi utilizado para o alinhamento múltiplo das sequências. As proteínas utilizadas para análise filogenética e os respectivos números de acesso foram: proteína rica em metionina de *Chilo suppressalis* (BAE98324), *Manduca sexta* (AAA29320.1), *Samia cynthia ricini* (BAF42698), *Bombyx mori* (CAA31417), *Trichoplusia ni* (Q06342), *Spodoptera litura* (CAB55604), *Spodoptera exigua* (ABX55887), *Heliconius erato* (ACH89347), *Plodia interpunctella* (AAK71137) e *Plutella xylostella* (BAF45386); arilforinas de *Chilo suppressalis* (BAE98325), *Plutella xylostella* (BAF32562) e *Bombyx mori* (NP_001037590); e riboflavina de *Hyalophora cecropia* (AAB86645).

4 RESULTADOS

4.1 Expressão gênica diferencial do tecido adiposo do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitóide

O parasitóide *C. flavipes* induziu alterações na síntese de proteínas do tecido adiposo de seu hospedeiro, *D. saccharalis*. Alterações nos níveis de expressão de transcritos foram identificadas durante todo o desenvolvimento larval do parasitóide. Foram obtidos produtos de amplificação em doze das vinte reações de DD-PCR conduzidas com os iniciadores arbitrários (Figuras 1 e 2).

Dez transcritos expressos diferencialmente entre insetos parasitados e não-parasitados foram selecionados para sequenciamento, sendo quatro expressos apenas em insetos não-parasitados (transcritos 1, 3, 7 e 10), um expresso apenas em insetos parasitados (transcrito 8) e cinco expressos diferencialmente entre os tratamentos, ou seja, com maior ou menor nível de expressão em insetos parasitados ou não-parasitados (transcritos 2, 4, 5, 6 e 9) (Figuras 1 e 2). Os transcritos selecionados apresentaram tamanhos variáveis de 250 a 800 pb (Tabela 1).

Após comparação das sequências obtidas àquelas disponíveis no banco de dados do NCBI, foi verificado que sete dos transcritos selecionados (transcritos 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 10) eram idênticos entre si, sendo altamente similares a sequências codificadoras de proteínas ribossomais (número de acesso: DQ130038.1; E-value: 0,0; identidade: 98%). Os transcritos responsáveis pela codificação de proteína ribossomal foram expressos tanto em hospedeiros não-parasitados quanto em hospedeiros parasitados, ao longo de todo o desenvolvimento larval do parasitóide.

O transcrito 6, porém, apresentou alta similaridade com sequência codificadora de uma proteína de armazenamento (hexamerina) rica em metionina (número de acesso: AJ249470.1; E-value: $9e^{-10}$; identidade: 77%). Este transcrito apresentou alteração em sua expressão desde o início do parasitismo, apresentando maior intensidade de expressão em hospedeiros parasitados. Ao longo do desenvolvimento do parasitóide, porém, a expressão deste transcrito em insetos parasitados foi se

tornando cada vez menos intensa, não se encontrando presente ao final do desenvolvimento larval de *C. flavipes* (Figura 2).

Apenas dois transcritos selecionados, sendo um deles expresso apenas em hospedeiros não-parasitados (transcrito 1) e o outro com maior expressão em hospedeiros parasitados (transcrito 2), permaneceram sem identificação tentativa, já que não apresentaram similaridade com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI.

Tabela 1 - Transcritos expressos diferencialmente pelo tecido adiposo de lagartas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes*, quando comparadas ao de lagartas não-parasitadas, via DD-PCR

Transcrito	Tamanho aproximado	Produto da expressão
1	300 pb	Indeterminado
2	250 pb	Indeterminado
3	600 pb	RNA ribossômico
4	250 pb	RNA ribossômico
5	500 pb	RNA ribossômico
6	500 pb	Hexamerina
7	200 pb	RNA ribossômico
8	800 pb	RNA ribossômico
9	300 pb	RNA ribossômico
10	250 pb	RNA ribossômico

4.2 Análise da expressão diferencial dos transcritos selecionados por PCR semi-quantitativo

A expressão diferencial foi confirmada apenas para o transcrito codificador da proteína de armazenamento, visto que nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos na expressão do transcrito codificador da proteína ribossomal (Figuras 3 e 4).

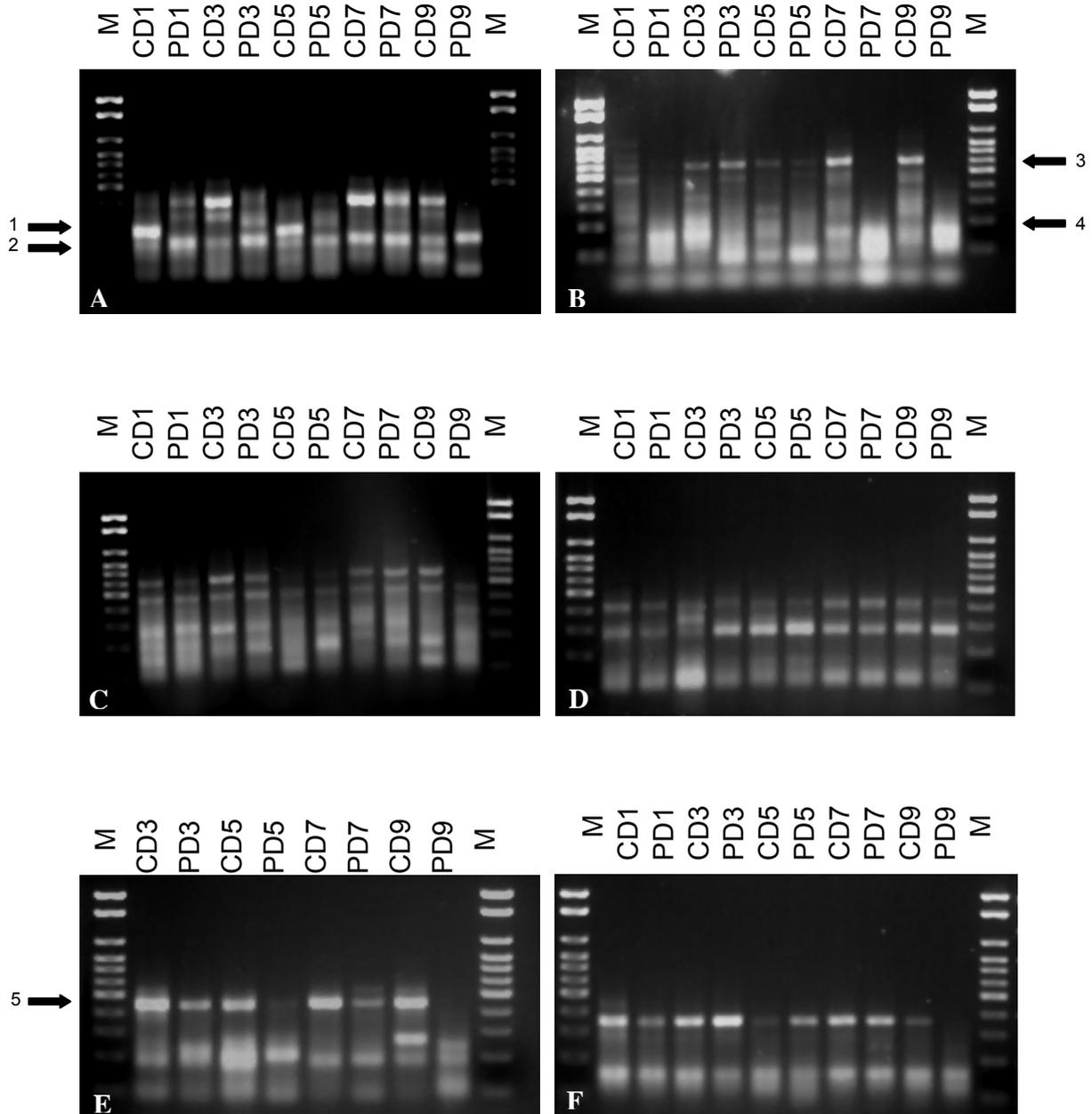


Figura 1 - Produtos de amplificação obtidos com o iniciador ACP2 e iniciadores arbitrários contidos no sistema GeneFishing™ DEG Premix Kit (Iniciadores 1 e 2 – n° catálogo: K1024; iniciadores 3, 6, 7 e 12 – n° catálogo: K1026) (Seegene Inc., MA). A - Iniciador 1, B – Iniciador 2, C - Iniciador 3, D - Iniciador 6, E - Iniciador 7, F - Iniciador 12. M – marcador molecular 100 pb (Norgen). C = controle; P = parasitada. D1: um dia após o parasitismo, D3: três dias após o parasitismo, D5: cinco dias após o parasitismo, D7: sete dias após o parasitismo, D9: nove dias após o parasitismo. As setas indicam transcritos selecionados para sequenciamento: 1, 2, 3, 4 e 5

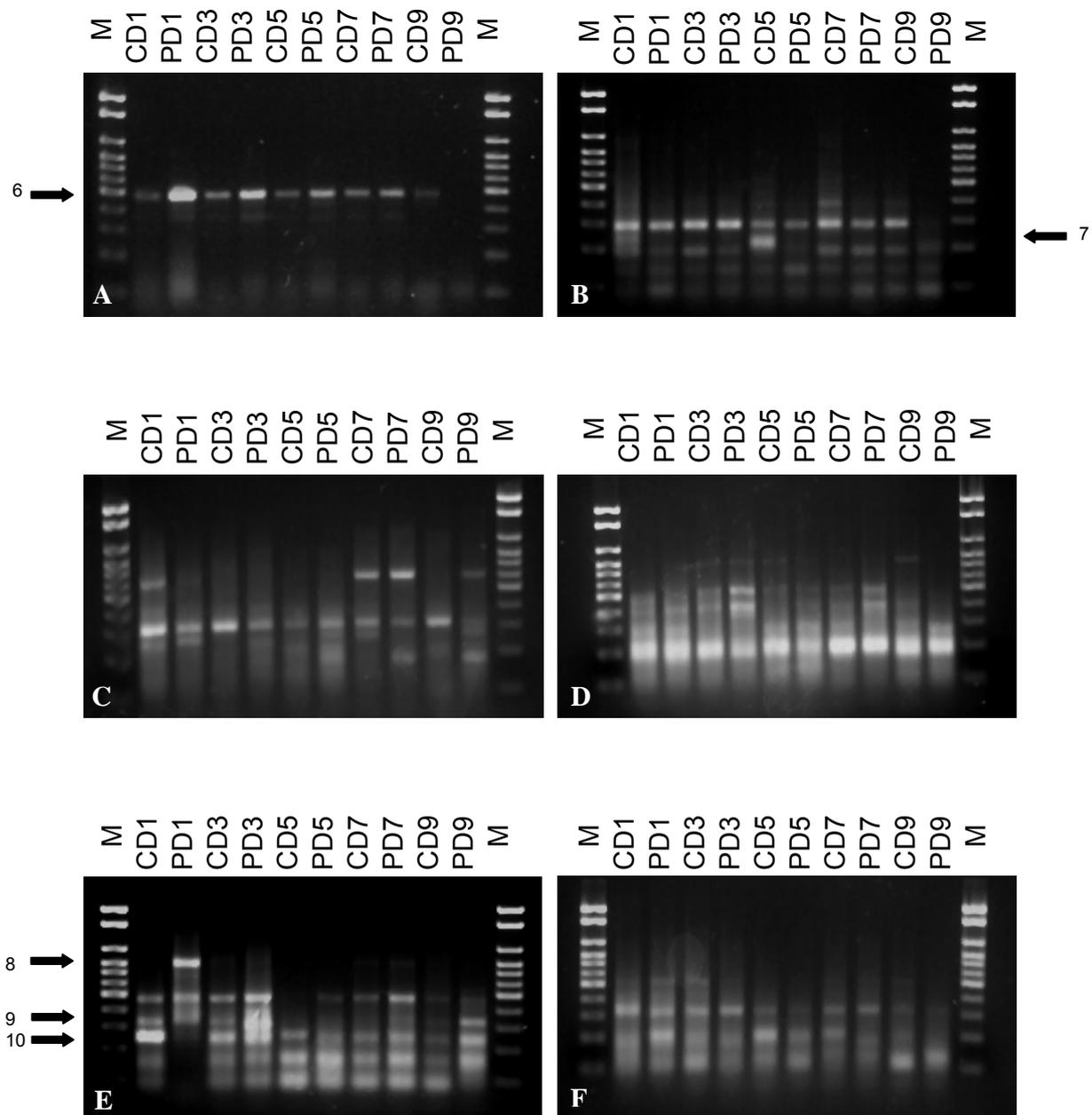


Figura 2 - Produtos de amplificação obtidos com o iniciador ACP2 e iniciadores arbitrários contidos no sistema GeneFishing™ DEG Premix Kit (Iniciadores 13, 16, 17, 18, 19 e 20 – n° catálogo: K1026) (Seegene Inc., MA). A - Iniciador 13, B – Iniciador 16, C - Iniciador 17, D - Iniciador 18, E - Iniciador 19, F - Iniciador 20. M – marcador molecular 100 pb (Norgen). C = controle; P = parasitada. D1: um dia após o parasitismo, D3: três dias após o parasitismo, D5: cinco dias após o parasitismo, D7: sete dias após o parasitismo, D9: nove dias após o parasitismo. As setas indicam transcritos seleccionados para sequenciamento: 6, 7, 8, 9 e 10

Conforme anteriormente verificado na análise via DD-PCR, *C. flavipes* induziu alterações na expressão do transcrito codificador da hexamerina logo no primeiro dia após o parasitismo. No início do desenvolvimento larval do parasitóide, hospedeiros parasitados apresentaram aumento significativo na expressão do transcrito em relação aos insetos sadios. O aumento da expressão, porém, não se manteve ao longo de todo o desenvolvimento larval de *C. flavipes*, tendo sido observada a inversão do padrão de expressão desta hexamerina no período próximo à emergência dos parasitóides, no qual a expressão do transcrito em hospedeiros parasitados foi significativamente menor em relação aos insetos não-parasitados (Figuras 3 e 4).

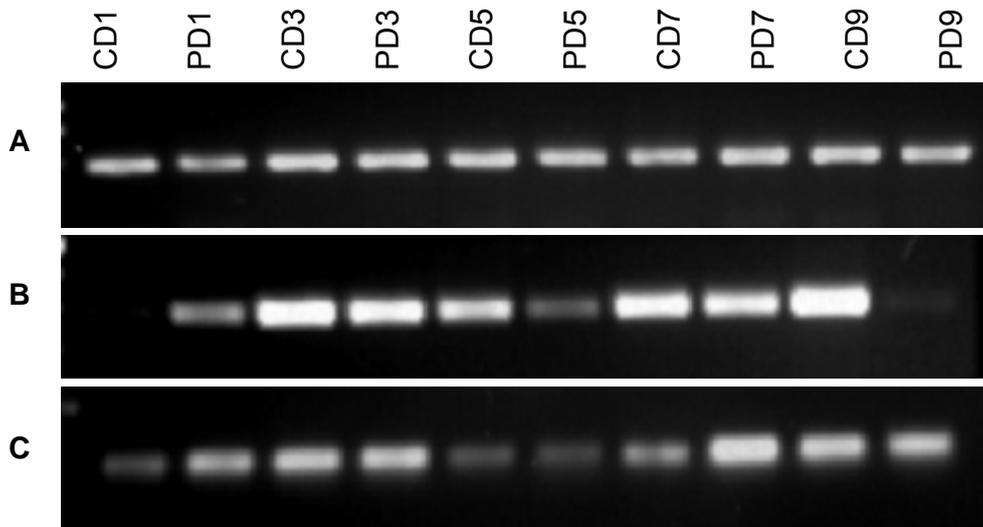


Figura 3 - Expressão do transcrito codificador da proteína ribossomal (A), do transcrito codificador da hexamerina (B) e do transcrito codificador de actina (C) no tecido adiposo de *D. saccharalis* ao longo do desenvolvimento larval de *C. flavipes*. C = controle; P = parasitada. D1: um dia após o parasitismo, D3: três dias após o parasitismo, D5: cinco dias após o parasitismo, D7: sete dias após o parasitismo, D9: nove dias após o parasitismo

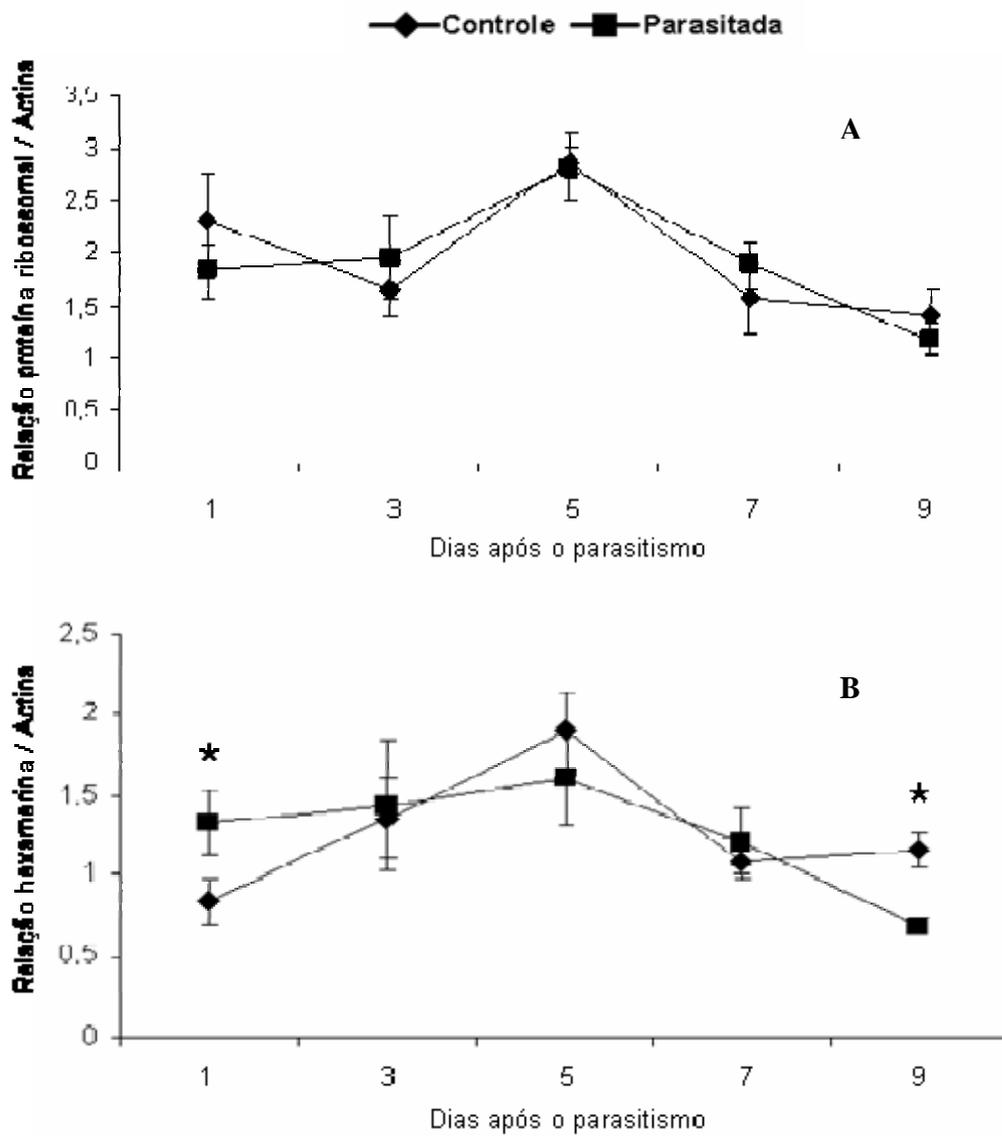


Figura 4 - Expressão da proteína ribossomal (A) e da hexamerina (B) em relação ao gene repórter (actina), no tecido adiposo de *D. saccharalis* ao longo do desenvolvimento larval de *C. flavipes* (* indica diferença estatística entre os pontos de dados entre controle e tratamento, para cada período amostral, pelo teste t, $P < 0,05$)

4.3 Caracterização do cDNA codificador da hexamerina

A sequência completa do cDNA codificador da proteína de armazenamento, obtida via amplificação das extremidades 5' e 3', apresentou 2.353 pb, com um quadro aberto de leitura de 2.235 pb. A metionina correspondente ao início da tradução da proteína (ATG) se encontrou presente na posição 40, enquanto o códon sinalizador do final da tradução (TGA) se localizou na posição 2.278. Assim, a porção 3' não traduzida apresentou-se composta por 78 pb (Figura 5).

O polipeptídeo deduzido da sequência de nucleotídeos obtida apresentou 745 aminoácidos, sendo a sequência do peptídeo sinal composta por 15 aminoácidos (MRLLVFAAFLALAAA). Um sítio potencial de glicosilação foi encontrado na posição 302. Já os sítios de fosforilação apresentaram-se mais abundantes, ocorrendo em 32 posições da proteína de armazenamento deduzida. Dois domínios conservados foram detectados na proteína: hemocianina 1 (Y - [F,Y ou W] - x - E - D - [L, I,V ou M] - x(2) - N - x(6) - H - x(3) - P), correspondente à sequência de aminoácidos YFTEDIDLNTYFYLLHMSYP (posição 231 da proteína), e hemocianina 2 (T - x(2) - R - D - P - x - [F ou Y] - [F, Y ou W]), correspondente aos aminoácidos TCLRDPVFW (posição 423 da proteína) (Figura 5).

Dado o conteúdo de metionina (5,8%) e aminoácidos aromáticos (10,7%) da hexamerina deduzida, conclui-se que a mesma pertence ao grupo das proteínas de armazenamento ricas em metionina. Esta classificação da proteína é também sustentada pelas análises de agrupamento realizadas, visto que a proteína de *D. saccharalis* se colocou em um ramo representado basicamente por proteínas ricas em metionina de outros lepidópteros, em um clado junto a proteína rica em metionina de outro Crambidae, *Chilo suppressalis*, também uma broca (Figura 6).

```

cgactggagcagcaggacactgaatgaggctactagtggtcgcagctttcttggccctggcgccgccaag
M R L L V F A A F L A L A A A T
gtcatcaaggatgacctggacgttgacagcacgtttaaaaaagattcactggtaaacttggacgtgaaaaag
V I K D D L D V D S T F K K D S L V N L D V K T
aaggagatagtataatgaaactgctgaaccacattctgcaaccaactatgtatgaagacattcgcgaaata
K E I C I M K L L N H I L Q P T M X E D I R E I
gcacaagagtgggtcattgaagacaacgtgacaaaatctgaaaagtcgacgtagtggaagcagttcatcgaa
A Q E W V I E D N V D K Y L K V D V V K Q F I E
acatacaaaacgggtatgttgccctcggtggcgagggtgttcggttcaactctaatagaaacaactcgacgggca
T Y K T G M L P R G E V F V H S N E K Q L D E A
atcaagactttccgtctgctcttcttcgcgaaggacttcgatgtcttcttacgcagcggcctgctggctacgc
I K T F R L L F F A K D F D V F L R T A C W L R
gagcatatnaacagcggcatgttcgtctatgctcttacagttgacctgctttcaccgtaccgatggcaggggc
E H I N S G M F V Y A L T V A C F H R T D C Q G
gtcgtcctccctgcccctacgaaatttacccttacttcttcgtagatagccaggtcgtaacaaggctttc
V V L P A P Y E I Y P Y F F V D S Q V V N K A F
cagatgaaaatgactaaagcgtctctcgaccagcttcgtagactactacggcattagtagtaaccgacaat
Q M K M T K A S L D P V V R D Y Y G I R V K D N
aacgtagtcggtattgactggcgtaaagggtccgccatactatcagtgagtcgatagaatctcttacttc
N V V V I D W R K G V R H T I S E S D R I S Y F
acagagatattgacttaaacacttacttttactatttgcacatgagttaccctgattggatgaccgacgat
T E D I D L N T Y F Y Y L H M S Y P Y W M T D D
atatacaacgccaacaaggaacgtcgcggtgagatcatgatgtatgctacaatgcagttattggctagactc
I Y N A N K E R R G E I M M Y A T M Q L L A R L
aggttggagcgcctttctaagaatagtgtgatattaagccggttgatgtggaatgagcccctaacgacgggc
R L E R L S K N M C D I K P L M W N E P L T T G
tactggcccaactacgcatgcataacggtgaagagatgccatgcgtcgcagcaacgtgttattagtcact
Y W P K L R M H N G E E M P M R R S N V L L V T
aaggacaatgtaagggataaagtcctcgttgatgacttggaaaagattgtgcgtgaaggataatcacagga
K D N V R D K V L V D D L E K I V R E G I I T G
caaattgcattacgtgatggtaacagttcttccattgaaaaagcagaggacatcgaagttcttggctaggctg
Q I A L R D G T V L S L K K A E D I E V L A R L
atactggcggtcagcagactacagaatgacaatgcaaaaatttaccagtcactaacgagttaaagaagatg
I L G G H G L Q N D N A K I I H V T N E K K M
ttaagctacagtcacatacaacggtgacaagtaacactcagttcctaccgccttgatagtatactacgtgc
L S Y S P Y N V D K Y T Y V P T A L D M Y T T C
ctacgtgactcctgtatttggaggttgatgaaacgcataagcagagacattcaagcttttcaagaatctgctt
L R D P V F W R L M K R I S E T F K L F K N L L
cctgtgtacacagtcgatgagatagaattccccggtgtaaaggttagagcgattaataacagacaagcctgtg
P V Y T V D E I E F P G V K V E R L I T D K P V
acctacgtggacgacagcagcgcacatcactaacgcggttgatcttgaccggtcagagttgcaagaagaag
T Y M D E Y D V D I T N A L Y L D R S E L Q K K
cgttctgacatgatgtatattgctcgtatgcggccctcaataataatccgttcaagtcacgatcgatgtt
R S D M M Y I A R M R R L N N N P F K V T I D V
gtgtcgataagcggctgagtcgctgctccttcttgggtcccaagtcagcactgctggggactt
V S D K A V D A V V R V F I G P K Y D C M G R L
cttcaaatcaacgacaaacgccttgataggtcgtcgcagctttcgtctacaaactggatctggcaagacg
L Q I N D M K R L D M V I D S F V Y K L D T G K N
tccctcgagatgcaagggataatcgagcagagaccttgggcccgtcgtatttgggcccgtcgtatttgggac
T I V R S S L E M Q G I I E Q R P W A R R I W D
cgatccgtggacaacgtgggctcggcgtcaagatgatcgatagctgggtgggaaatcccgcacgggcttc
R S V D N V G V G V K M I D S W W W K S R T G F
cctagcagactgttgcttccatagggcactcgtggcggctcggaaatgcaaagtgttggctcattgtcagccct
P S R L L L P M G T R G G L E M Q M F V I V S P
gtacgctctggtaggcttttgcgacggttagataactacgcatgaaagagcgcattcttggcgttggctg
V R S G R L L P T L D T T I M K E R H S C R W S
acctgcattgacaccatgcctctgggatccatcgacagagagatagacgtcactaaattctataccaat
T C I D T M P L G Y P F D R E I D V T K F Y T N
aacatgaagttcactgacatattgatctacaggagagatgaacacagcgaacgtagtcaggacgttagac
N M K F T D I L I Y R R D M N T A N V V K D V D
atgtccgacatgggtgatgaagcgtgatgatctgacatacctcgacactgatttgAtgggtgagaagatcacac
M S D M V M K R D D L T Y L L D T D L M V R R S Y
agagacgtgatgatgacacaaatgtgaaggaaaaattatattattattatttagattagaaataaact
R D V M M M T Q M
gcattaattgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 5 - Sequência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da hexamerina rica em metionina de *D. saccharalis*. O peptídeo sinal encontra-se sublinhado. Sítios potenciais de fosforilação estão sublinhados por linha tracejada e o sítio potencial de glicosilação está sublinhado por linha dupla. Os domínios conservados identificados estão circundados

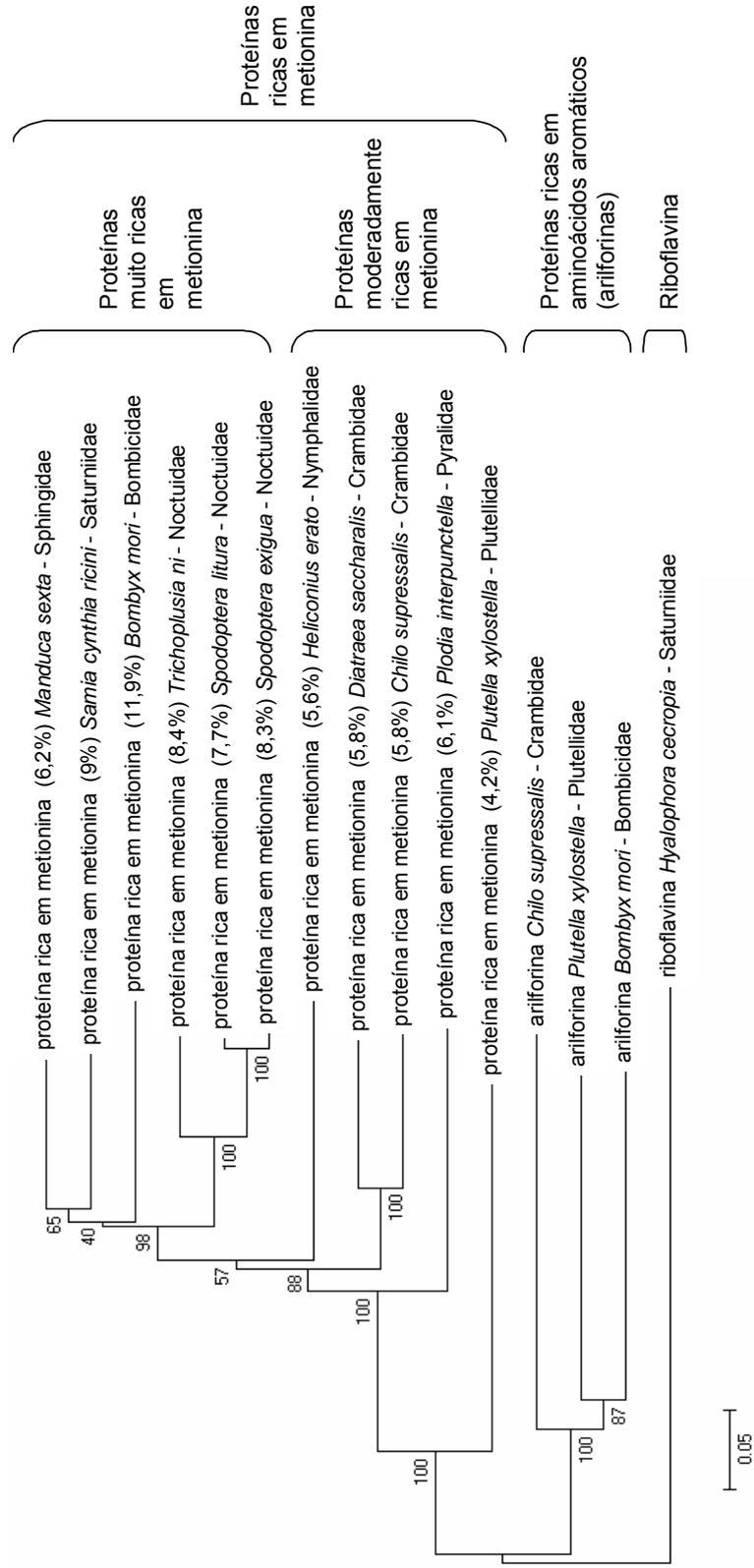


Figura 6 - Árvore filogenética construída pelo método da vizinhança (MEGA4, p-distance, bootstrap = 1000), incluindo a proteína rica em metionina de *D. saccharalis* e outras hexâmeras de lepidópteros. O conteúdo de metionina das proteínas ricas neste amoniácido está indicado

5 DISCUSSÃO

A alteração da síntese protéica dos tecidos dos hospedeiros é uma atividade comum aos parasitóides cenobiontes, uma vez que permite a manipulação de diversos processos fisiológicos do hospedeiro e altera o fluxo e a disponibilidade de nutrientes, sendo de fundamental importância para o sucesso do parasitismo (KNOP-WRIGHT; COUDRON; BRANDT, 2001; VINSON; PENNACCHIO; CONSOLI, 2001). *C. flavipes* alterou os níveis de expressão de proteínas de armazenamento no tecido adiposo de *D. saccharalis* desde o início de seu desenvolvimento larval e alterações nos níveis de proteínas de armazenamento em decorrência do parasitismo já foram relatadas em diversas associações hospedeiro-parasitóide (VINSON, 1990; BECKAGE; KANOST, 1993; FATHPOUR; DAHLMAN, 1995; ZHU et al., 2009).

As proteínas de armazenamento de insetos, denominadas hexamerinas, fazem parte de uma superfamília crescente de proteínas, na qual também estão incluídas hemocianinas e profenoloxidasas de artrópodes, bem como receptores de hexamerinas descritos para dípteros (TELFER; KUNKEL, 1991; BEINTEMA et al., 1994; BURMESTER; SCHELLER, 1996). Em Lepidoptera, ao menos dois grupos representativos de hexamerinas são conhecidos: arilforinas ricas em aminoácidos aromáticos e as proteínas ricas em metionina (ZHENG; YOSHIGA; TOJO, 2000). Em geral, as arilforinas ricas em aminoácidos aromáticos apresentam de 1 a 3% de metionina em sua composição e de 16 a 21% de aminoácidos aromáticos, enquanto as proteínas ricas em metionina contêm de 9 a 13% de aminoácidos aromáticos e de 4 a 11% de metionina (TELFER; KUNKEL, 1991). Assim, a proteína de armazenamento identificada em *D. saccharalis* encontra-se entre as proteínas ricas em metionina, visto que apresenta em sua composição 5,8% de metionina e 10,7% de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano).

A árvore filogenética construída, incluindo a hexamerina de *D. saccharalis* e as de outros Lepidoptera, sustenta a classificação da proteína de armazenamento identificada, uma vez que é possível observar a formação de três grupos distintos, correspondentes a grupos funcionais de proteínas de armazenamento encontrados nesta família de insetos: proteínas ricas em metionina, arilforinas e proteína

transportadora de riboflavina. Em relação às proteínas ricas em metionina, observa-se a formação de um clado no qual encontram-se as proteínas muito ricas em metionina, com conteúdo deste aminoácido variando entre 6,2% (*Manduca sexta*) e 11,9 % (*Bombyx mori*). As demais proteínas ricas em metionina incluídas na análise, por sua vez, possuem conteúdo deste aminoácido variando entre 4,2 % (*Plutella xylostella*) e 6,1 % (*Plodia interpunctella*), formando um agrupamento de proteínas moderadamente ricas em metionina, no qual se insere a hexamerina de *D. saccharalis*. Esta subdivisão das proteínas ricas em metionina já foi observada em outras análises filogenéticas de hexamerinas de lepidópteros (ZHENG; YOSHIGA; TOJO, 2000; SPYLIOTOPOULOS et al., 2007).

Foi possível ainda verificar que hexamerinas de lepidópteros pertencentes às mesmas famílias demonstraram maior similaridade entre si. Assim, a proteína de *D. saccharalis* demonstrou maior proximidade com a proteína rica em metionina de outro lepidóptero pertencente à família Crambidae, *Chilo suppressalis*, sendo o conteúdo de metionina de ambas as proteínas o mesmo (5,8%). As proteínas ricas em metionina de insetos pertencentes à família Noctuidae, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera litura* e *Spodoptera exigua*, também formaram um agrupamento distinto.

Em relação à caracterização do cDNA codificador da proteína rica em metionina, o mesmo apresentou propriedades semelhantes às sequências codificadoras de hexamerinas anteriormente descritas para lepidópteros (ZHENG; YOSHIGA; TOJO, 2000; SONODA et al., 2006; ZHU et al., 2009). Em geral, as proteínas de armazenamento dos insetos apresentam porção 5' não traduzida (UTR) com extensão curta, sendo a extensão não-traduzida da porção 3' mais variável, geralmente apresentando tamanho entre 80 e 450 nucleotídeos (CHEON et al., 2002; SPYLIOTOPOULOS et al., 2007; TUNGJITWITAYAKUL et al., 2008). Assim, estas estruturas do cDNA identificado em *D. saccharalis* apresentaram-se em conformidade com estas características, uma vez que a extremidade 5' não traduzida apresentou 40 pb, enquanto a extremidade 3' não-traduzida apresentou 75 pb. O peptídeo sinal da hexamerina de *D. saccharalis*, composto por 15 aminoácidos (MRLLVFAAFLALAAA), também se apresenta em conformidade com peptídeos sinais encontrados em proteínas de armazenamento já descritas, os quais são compostos, em geral, por 15 a

20 aminoácidos (CHEON et al., 2002, ZHU; MUTHUKRISHNAN; KRAMER, 2002; ASHFAQ; SONODA; TSUMUKI, 2007; SPYLIOTOPOULOS et al., 2007; TUNGJITWITAYAKUL et al., 2008).

As hexamerinas são sintetizadas pelo tecido adiposo, predominantemente durante o final do estágio larval, sendo liberadas na hemolinfa, onde se acumulam e atingem altas concentrações. Em alguns casos, as hexamerinas podem corresponder a 50% das proteínas totais presentes na hemolinfa do inseto durante o estágio larval. No período próximo à transformação em pupa, porém, as hexamerinas são parcialmente ou totalmente sequestradas pelo tecido adiposo, onde se acumulam na forma de grânulos protéicos, sendo posteriormente degradadas para servirem como fonte de aminoácidos para a formação de novas proteínas (TELFER; KUNKEL, 1991; TUNGJITWITAYAKUL et al., 2008). Devido à sua acumulação massiva durante o estágio larval e posterior desaparecimento durante o estágio de pupa e adulto, foi inicialmente sugerido que as hexamerinas atuassem como uma forma de armazenamento de aminoácidos e energia durante períodos em que os insetos não se alimentam (MUNN; GREVILLE, 1969).

Outras funções, porém, têm sido atribuídas às proteínas de armazenamento, tais como participação no processo de formação da cutícula e transporte de biomoléculas, incluindo hormônios e riboflavinas (MARGEE et al., 1994; BRAUN; WYATT, 1996). Ainda, em Lepidoptera, as proteínas ricas em metionina podem desempenhar importante papel na reprodução, atuando na formação do ovo. Esta hipótese foi sugerida por alguns autores devido ao fato de fêmeas apresentarem este tipo de hexamerina em maior abundância em relação a machos (OGAWA; TOJO, 1981; PAN; TELFER, 1996), tendo sido confirmada diferenças em relação ao período de utilização de proteínas ricas em metionina entre espécies que produzem ovos precoce e tardiamente (PAN; TELFER, 2001). De qualquer forma, as proteínas de armazenamento atuam como fonte de nitrogênio e aminoácidos a serem utilizados pela pupa e adulto durante a metamorfose e reprodução, sendo fundamentais para o desenvolvimento de insetos (KANOST et al., 1990).

Dada a sua importância, as hexamerinas podem ser alvo de regulação por inúmeros cenobiontes logo no início do estabelecimento do parasitismo, como uma estratégia do parasitóide para obter recursos a serem utilizados para o seu próprio

desenvolvimento. Devido à íntima interação com seus hospedeiros, ovos de alguns endoparasitóides não se desenvolvem em condições artificiais quando removidos da hemolinfa ainda durante seu desenvolvimento embrionário, o que sugere o requerimento de fatores específicos do hospedeiro para que o processo de embriogênese do parasitóide possa ser iniciado. Ovos do endoparasitóide *Microplitis croceipes*, por exemplo, necessitam de uma proteína presente na hemolinfa de seu hospedeiro *Heliothis* spp., para iniciar a embriogênese *in vitro*. A purificação desta proteína, que provavelmente é sintetizada pelo tecido adiposo do hospedeiro, indicou que a mesma apresenta peso molecular de 230 kDa (GREANY et al., 1990).

C. flavipes, assim como outros parasitóides, produz ovos hidrópicos, os quais apresentam baixo teor de vitelo e, desta forma, é necessária a absorção de nutrientes pelo ovo diretamente da hemolinfa do hospedeiro para que o desenvolvimento embrionário do parasitóide possa ser completado (FERKOVICH; DILLARD, 1986; CÔNSOLI; VINSON, 2004). Dessa forma, a proteína rica em metionina provavelmente atua como fonte de aminoácidos a serem utilizados no processo de embriogênese do parasitóide, uma vez que o aumento da expressão gênica ocorre logo no início do desenvolvimento embrionário do parasitóide. Embora estudos subsequentes sejam necessários para comprovar a ação desta proteína no desenvolvimento embrionário de *C. flavipes*, a adição da mesma em dietas artificiais pode ser fundamental para que se obtenha sucesso na criação *in vitro* deste parasitóide.

Visto que o hospedeiro representa a única fonte de alimento disponível para o parasitóide durante o estágio larval, o aumento da transcrição das hexamerinas ricas em metionina pode também estar associado ao suprimento das exigências nutricionais de *C. flavipes*, uma vez que a metionina é um aminoácido essencial, o qual não pode ser sintetizado via transaminação, devendo ser adquirido pelo inseto via alimentação.

Ainda, o aumento da transcrição do cDNA codificador da hexamerina no início do parasitismo pode estar associado à supressão da resposta imunológica do hospedeiro, que constitui a primeira etapa do processo de regulação hospedeira. Há evidências da atuação de uma hexamerina como fator imunossupressivo na associação *Pseudaletia separata* – *Cotesia kariyai*. Insetos parasitados apresentaram elevada concentração de um elemento protéico na hemolinfa que suprimia o processo de encapsulação. A

purificação deste elemento demonstrou que se tratava de uma hexamerina. Ensaios demonstraram que enquanto os níveis desta proteína se mantiveram elevados na hemolinfa, não houve atuação de hemócitos, não havendo, portanto, resposta imunológica celular (HAYAKAWA, 1994).

O aumento da expressão de hexamerinas em hospedeiros parasitados, porém, não foi mantido durante todo o desenvolvimento larval de *C. flavipes*, tendo sido observada uma inversão do padrão de expressão da hexamerina no período próximo à emergência dos parasitóides. Esta diminuição da expressão da hexamerina, observada nove dias após o parasitismo, pode refletir alterações nos níveis de hormônios do hospedeiro, uma vez que a expressão de hexamerinas sofre controle hormonal (BURMESTER, 1999). Em *Plutella xylostella*, por exemplo, a expressão de mRNA de duas proteínas ricas em metionina é suprimida pela presença de um análogo do hormônio juvenil (ASHFAQ; SONODA; TSUMUKI, 2007). O mesmo efeito é observado em *Galleria mellonella*, em que o tratamento com um análogo do hormônio juvenil também promoveu a inibição da expressão de uma proteína de armazenamento (GODLEWSKI et al., 2003).

A regulação do metabolismo hormonal do hospedeiro por parasitóides cenobiontes é essencial ao seu desenvolvimento e, muitas vezes, o parasitismo é responsável pela interrupção ou pelo atraso do desenvolvimento do hospedeiro (BECKAGE; RIDDIFORD, 1978; JONES et al., 1982; BALGOPAL et al., 1996; SCHAFELLNER; MARKTL; SCHOPF, 2007). Em Lepidoptera, a expressão das proteínas ricas em metionina é fortemente suprimida pela presença do hormônio juvenil (HJ) (TOJO et al., 1985) e uma série de hospedeiros parasitados apresentam aumento nos níveis deste hormônio. Estas alterações podem ocorrer pela redução da atividade da enzima responsável pela degradação do HJ (BECKAGE; KANOST, 1993; HAYAKAWA, 1995). A redução dos níveis da enzima induz o aumento dos níveis do hormônio que, por sua vez, retarda o desenvolvimento do hospedeiro. Esta estratégia permite que os parasitóides encontrem tempo suficiente para completar seu próprio desenvolvimento e impede que os hospedeiros se desenvolvam além do estágio ideal para o parasitóide. Assim, a alteração observada nos níveis de expressão de

hexamerinas ao final do desenvolvimento larval do parasitóide pode ser reflexo indireto da ação deste parasitóide nos níveis hormonais de *D. saccharalis*.

A manipulação da expressão das proteínas de armazenamento dos hospedeiros pode ocorrer como resultado da ação dos produtos derivados do parasitóide. Parasitóides da subfamília Cheloniinae, por exemplo, alteram a síntese de hexamerinas tanto em hospedeiros parasitados quanto em hospedeiros pseudoparasitados (injetados apenas com veneno, fluidos do cálice e polidnavírus) (JONES, 1985). Desta forma, as alterações observadas ocorrem como resultado da ação dos produtos derivados do parasitóide (JONES; TURNER; VIKRAMJIT, 1996). Na associação *Campoletis sonorensis* - *Heliothis virescens*, polidnavírus também são responsáveis por alterações na expressão de hexamerinas, as quais têm sua síntese inibida em hospedeiros parasitados (SHELBY; WEBB, 1997). Os dados obtidos no presente estudo, porém, não permitem inferir qual é o mecanismo de regulação empregado por *C. flavipes*.

Embora não tenham sido confirmadas, as alterações induzidas na expressão de proteínas ribossomais poderiam indicar uma estratégia de controle indireto da expressão gênica do hospedeiro pelo parasitóide, uma vez que estas proteínas são responsáveis pela formação dos ribossomos, os quais atuam no processo de tradução durante a síntese protéica. As proteínas ribossomais são, em geral, extremamente conservadas e modificações na expressão das mesmas poderiam ser esperadas, uma vez que estas proteínas são altamente expressas (LANDAIS et al., 2003). Além disso, devido ao custo energético que a expressão gênica representa, a regulação dos níveis de expressão destas proteínas também pode representar uma economia energética para redirecionamento ao parasitóide.

Alterações no processo de tradução de proteínas em tecidos de hospedeiros parasitados já foram relatadas para algumas associações hospedeiro-parasitóide, incluindo o controle da tradução de proteínas envolvidas no metabolismo hormonal, tais como as enzimas que degradam o hormônio juvenil, e na resposta imunológica, tais como as lisozimas (SHELBY; WEBB, 1997; SHELBY; CUI; WEBB, 1998). Assim como para as proteínas de armazenamento, o controle da tradução de proteínas também parece ocorrer como resultado da ação de polidnavírus e veneno. Teratócitos também podem desempenhar importante função na inibição da tradução de proteínas, atuando

no redirecionamento da fisiologia do hospedeiro em benefício do parasitóide em desenvolvimento (DAHLMAN et al., 2003).

Apesar de não ter sido identificada a expressão de proteínas específicas do parasitismo (PSPs) no tecido adiposo do hospedeiro, estudos anteriores demonstram que *C. flavipes* induz o aparecimento de PSPs na hemolinfa de *D. saccharalis* (SALVADOR; CÔNSOLI, 2008). As PSPs podem ocorrer como resultado da expressão de genes presentes nas partículas virais simbiotes, teratócitos e na própria larva do parasitóide em desenvolvimento, desempenhando importante papel na supressão da resposta imunológica, metabolismo hormonal e no redirecionamento de nutrientes. Dado o papel destas proteínas na fisiologia do hospedeiro, a identificação das mesmas vem sendo considerada uma nova ferramenta para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de pragas, incluindo-se a produção de variedades transgênicas de plantas que expressem PSPs (BECKAGE; GELMAN, 2004).

De qualquer forma, a identificação de alterações no padrão de expressão das proteínas ricas em metionina em hospedeiros parasitados leva à detecção de um novo sítio-alvo que poderia ser explorado para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de *D. saccharalis*. Uma abordagem que vem sendo estudada para o controle de populações de insetos-praga é o silenciamento gênico pelo uso de RNA de interferência (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

Estudos têm demonstrado que a ingestão de RNA de fita dupla (dsRNA) pode ser eficaz na supressão de genes-alvo (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007). Assim, a diminuição de populações de *D. saccharalis* poderia ser alcançada pelo silenciamento do gene responsável pela codificação da hexamerina identificada neste estudo, dada a importância das proteínas ricas em metionina para o desenvolvimento e reprodução de insetos. Plantas transgênicas que expressam dsRNA foram desenvolvidas e permitiram a redução significativa da população de pragas-alvo, demonstrando o grande potencial desta tecnologia para o controle de insetos prejudiciais (BAUM et al., 2007). Embora estudos subsequentes sejam necessários para que esta tecnologia possa ser aplicada no controle da broca da cana-de-açúcar, a caracterização do cDNA codificador da hexamerina pode representar o primeiro passo na aplicação desta técnica para o controle de *D. saccharalis*.

6 CONCLUSÕES

C. flavipes altera a expressão gênica do tecido adiposo de seu hospedeiro, *D. saccharalis*;

O parasitismo é responsável pelo aumento da transcrição do cDNA de uma hexamerina no início do desenvolvimento larval do parasitóide, e pela sua diminuição no período próximo ao término do desenvolvimento imaturo;

A hexamerina identificada em *D. saccharalis* é uma proteína rica em metionina.

REFERÊNCIAS

ANDREW, N.; BASIO, M.; KIM, Y. Additive effect of teratocyte and calyx fluid from *Cotesia plutellae* on immunosuppression of *Plutella xylostella*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 341-347, 2006.

ASGARI, S. Venom proteins from poliDNAvirus-producing endoparasitoids: their role in host parasite interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 61, n. 3, p. 146-156, 2006. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 25 mar. 2008.

ASGARI, S.; HELLERS, M.; SCHMIDT, O. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 2653–2662, 1996.

ASHFAQ, M.; SONODA, S.; TSUMUKI, H. Expression of two methionine-rich storage protein genes of *Plutella xylostella* (L.) in response to development, juvenile hormone analog and pyrethroid. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 148B, n. 1, p. 84–92, 2007.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER W.; MYERS E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BALGOPAL, M.M.; DOVER, B.A.; GOODMAN, W.G.; STRAND, M.R. Parasitism by *Microplitis demolitor* induces alterations in the juvenile hormone titers and juvenile hormone esterase activity of its host, *Pseudoplusia includens*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, n. 4, p. 337-345, 1996.

BARAT-HOUARI, M.; HILLIOU, F.; JOUSSET, F.X.; SOFER, L.; DELEURY, E.; ROCHER, J.; RAVALLEC, M.; GALIBERT, L.; DELOBEL, P.; FEYEREISEN, R.; FOURNIER, P.; VOLKOFF, A.N. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnavirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. **BMC Genomics**, London, v. 7, n. 160, 2006. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/160>. Acesso em: 15 jan. 2008.

BASIO, N.A.; KIM, Y. A short review of teratocytes and their characters in *Cotesia plutellae* (Braconidae: Hymenoptera). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 8, p. 211–217, 2005.

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 1322-1326, 2007.

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

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

BECKAGE, N.E. Games parasites play: the dynamic roles of proteins and peptides in the relationship between parasite and host. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. chap. 2, p. 25-57.

BECKAGE, N.E.; GELMAN, B.B. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 299-330, 2004.

BECKAGE, N.E.; KANOST, N.R. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 643-653, 1993.

BECKAGE, N.E.; RIDDIFORD, L.M. Developmental interactions between the tobacco hornworm *Manduca sexta* and its braconid parasite *Apanteles congregatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 139-151, 1978.

BECKAGE, N.E.; TAN, F.F.; SCHLEIFER, K.W.; LANE, R.D.; CHERUBIN, L.L. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 26, n. 2/3, p. 165-95, 1994. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 25 mar. 2008.

BEINTEMA, J.J.; STAM, W.T.; HAZES, B.; SMIDT, M.P. Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 11, n. 3, p. 493-503, 1994.

BELLOWS, T.S.; FISHER, T.W.; CALTAGIRONE, L.E.; DAHLSTEN, D.L.; HUFFAKER, C.; GORDH, G. **Handbook of biological control: principles and applications of biological control**. New York: Academic Press, 1999. 1046 p.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 294, n. 5, p. 1351-1362, 1999.

BOTELHO, P.S.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 25, p. 409-421.

- BRAUN, R.P.; WYATT, G.R. Sequence of hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 49, p. 31756-31762, 1996.
- BROWN, J.J.; KIUCHI, M.; KAINOH, Y.; TAKEDA, S. *In vitro* release of ecdysteroids by an endoparasitoid, *Ascogaster reticulatus* Watanabe. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 39, n. 3, p. 229-34, 1993.
- BURMESTER, T. Evolution and function of the insect hexamerins. **European Journal of Entomology**, Ceske Budejovice, v. 96, n. 3, p. 213- 225, 1999.
- BURMESTER, T.; SCHELLER, K. Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 42, p. 713–728, 1996.
- CHEON, H.M.; HWANG, S.J.; KIM, H.J.; JIN, B.R.; CHAE, K.S.; YUN, C.Y.; SEO, S.J. Two juvenile hormone suppressible storage proteins may play different roles in *Hyphantria cunea*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 50, n. 4, p. 157–172, 2002. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 21 mar. 2009.
- COLE, T.J.; BECKAGE, N.E.; TAN, F.F.; SRINIVASAN, A.; RAMASWAMY, S.B. Parasitoid-host endocrine relations: self-reliance or co-optation? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 12, p. 1673-79, 2002.
- CÔNSOLI, F.L.; VINSON, S.B. Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 137B, n. 4, p. 463-473, 2004.
- CÔNSOLI, F.L.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A.; VINSON, S.B. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps* – *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 142B, n. 2, p. 181-191, 2005.
- DAHLMAN, D.L.; VINSON, S.B. Trehalose and glucose levels in the hemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes* or *Cardiochiles nigriceps*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 52B, n. 4, p. 465–468, 1975.
- _____. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics. In: BECKAGE N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. v. 1, chap. 7, p. 145-165.
- DAHLMAN, D.L.; RANA, R.L.; SCHEPERS, E.J.; SCHEPERS, T.; DILUNA, F.A.; WEBB, B.A. A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 527–534, 2003.

DEAN, R.L.; LOCKE, M.; COLLINS, J.V. Structure of the fat body. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. v. 3, chap. 5, p. 155-210.

DIGILIO, M.C.; ISIDORO, N.; TREMBLAY, E.; PENNACCHIO, F. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 46, n. 6, p. 1041–1050, 2000.

DONG, K.; ZHANG, D.Q.; DAHLMAN, D.L. Downregulation of juvenile hormone esterase and arylphorin production in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Microplitis croceipes*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, n. 2, p. 237–248, 1996. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 05 jun. 2008.

DUSHAY, M.S.; BECKAGE, N.E. Dose-dependent separation of *Cotesia congregata* associated polydnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 39, n. 12, p. 1029-40, 1993.

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

FALABELLA, P.; TREMBLAY, E.; PENNACCHIO, F. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 1-9, 2000.

FALABELLA, P.; RIVIELLO, L.; DE STRADIS, M. L.; STIGLIANO, C.; VARRICCHIO, P.; GRIMALDI, A.; EGUILEOR, M.; GRAZIANI, F.; GIGLIOTTI, S.; PENNACCHIO, F. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 801-813, 2009.

FARRELL, A.E.; PLEVIN, R.J.; TURNER, B.T.; JONES A.D.; O'HARE M.; KAMMEN, D.M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, Washington, v. 311, p. 506-508, 2006.

FATHPOUR, H.; DAHLMAN, D.L. Polydnaviruses of *Microplitis croceipes* prolongs the larval period and changes hemolymph protein content of the host *Heliothis virescens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 28, n. 1, p. 33-48, 1995. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 16 jun. 2008.

FERKOVICH, S.M.; DILLARD, C.R. A study of uptake of radiolabeled host proteins and protein synthesis during development of eggs of the endoparasitoid, *Microplitis croceipes* (Cresson) (Braconidae). **Insect Biochemistry**, London, v. 16, p. 337–345, 1986.

GELMAN, D.B.; THOMAS, J.K.; COUDRON, A. Mode of action of the venom of the ectoparasitic wasp, *Euplectrus comstockii*, in causing developmental arrest in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Invertebrate Neuroscience**, Berlin, v. 3, p. 231–238, 1997.

GODLEWSKI, J.; KLUDKIEWICZ, B.; GRZELAK, K.; BERESEWICZ, M.; CYMBOROWSKI, B. Hormonal regulation of the expression of two storage proteins in the larval fat body of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 49, n. 6, p. 551–559, 2003.

GRAIN. **The sugar-cane-ethanol nexus**. 2007. Disponível em: <<http://www.grain.org/seedling/?id=488>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

GREANY, P.; CLARK, W.; FERKOVICH, S.; LAW, J.; RYAN, R. Isolation and characterization of a host hemolymph protein required for development of the eggs of the endoparasite *Microplitis croceipes*. In: HAGEDORN, H.H., HILDEBRAND, J.G., KIDWELL, M.G., LAW, J.H. (Ed.). **Molecular insect science**. New York: Plenum Press, 1990. p. 306.

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

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

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

HAYAKAWA, Y. Cellular immunosuppressive protein in the plasma of parasitized insect larvae. **The Journal of Biological Chemistry**, London, v. 269, p. 14536-14540, 1994.

_____. Growth-blocking peptide: an insect biogenic peptide that prevents the onset of metamorphosis. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1995.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.

HOPKINS, T.L.; STARKEY, S.R.; BECKAGE, N.E. Tyrosine and catecholamine levels in the hemolymph of tobacco hornworm larvae, *Manduca sexta*, parasitized by the braconid wasp, *Cotesia congregata*, and in the developing parasitoids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 38, n. 4, p. 193-201, 1998. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 20 jun. 2008.

JONES, D. The endocrine basis for developmentally stationary prepupae in larvae of *Trichoplusia ni* pseudoparasitized by *Chelonus insularis*. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 155B, p. 235-240, 1985.

JONES, D.; TURNER, H.; VIKRAMJIT, C. Altered hexamerin regulation in prepupal *Trichoplusia ni* pseudoparasitized by *Chelonus* sp. Near *Curvimaculatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, n. 3/4, p. 537-548, 1996.
Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 20 jun. 2008.

JONES, D.; JONES, G.; VAN STEENWYK, R.A.; HAMMOCK, B.D. Effect of the parasite *Copidosoma truncatellum* on development of its host *Trichoplusia ni*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 75, n. 1, p. 7-11, 1982.

KADONO-OKUDA, K.; WEYDA, F.; OKUDA, T. *Dinocampus* (= *Perilitus*) *coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 11, n. 11, p. 1073-1080, 1998.

KANOST, M.R.; KAWOoya, J.K.; RYAN, R.D.; VAN HEUSDEN, M.C.; ZIEGLER, R. Insect hemolymph proteins. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 22, p. 299-366, 1990.

KATI, A.; HARDIE, J. Regulation of wing formation and adult development in an aphid host, *Aphis fabae*, by the parasitoid *Aphidius colemani*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 56, n. 1, p. 14-20, 2010.

KEELEY, L.L. Physiology and biochemistry of the fat body. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. v. 3, chap. 6, p. 211-248.

KNOP-WRIGHT, M.; COUDRON, T.A.; BRANDT, S.L. Ecological and physiological relevance of biochemical changes in a host as a result of parasitism by *Euplectrus* spp.: a case study. In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 9, p. 153-186.

KROEMER, J.A.; WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 431-456, 2004.

LANDAIS, I.; OGLIASTRO, M.; MITA, K.; NOHATA, J.; LÓPEZ-FERBER, M.; DUONOR-CÉRUTTI, M.; SHIMADA, T.; FOURNIER, P.; DEVAUCHELLE, G. Annotation pattern of ESTs from *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells and analysis of the ribosomal protein genes reveal insect-specific features and unexpectedly low codon usage bias. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 18, p. 2343-2350, 2003.

LAWRENCE, P.O. Host-parasitoid hormonal interactions: an overview. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 32, n.4, p. 295-298, 1986.

LEE, S.; KIM, Y. Juvenile hormone esterase of diamondback moth, *Plutella xylostella*, and parasitism of *Cotesia plutellae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 7, n. 3, p. 283-287, 2004.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the PCR. **Science**, Washington, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIBERSAT, F.; DELAGO, A.; GAL, R. Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 54, p. 189-207, 2009.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R.; MAGRINI, E.A. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**: manual de instrução. Piracicaba: IAA, PLANALSUCAR, 1983. 22p.

MACKAUER, M.; SEQUEIRA, R. Patterns of development in insect parasites. . In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. v. 1, chap. 1, p. 1-23.

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

MARGEE, J.; KRAYNACH, N.; MASSEY, H.C.; TELFER, W.H. Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 25, p. 137-157, 1994. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 25 fev. 2009.

MORALES, J.; MEDINA, P.; VIÑUELA, E. The influence of two endoparasitic wasps, *Hyposoter didymator* and *Chelonus inanitus*, on the growth and food consumption of their host larva *Spodoptera littoralis*. **BioControl**, Dordrecht, v. 52, p. 145-160, 2006.

MUNN, E.A.; GREVILLE, G.D. The soluble proteins of developing *Calliphora erythrocephala*, particularly calliphorin, and similar proteins in other insects. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 15, p. 1935-1950, 1969.

NAKAMATSU, Y.; TANAKA T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 49, n. 2, p. 149-159, 2003.

_____. Correlation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 50, n. 2, p. 135-141, 2004.

NAKAMATSU, Y.; FUJI, S.; TANAKA, T. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 48, n. 11, p. 1041-1052, 2002.

NAKAMATSU, Y.; GYOTOKU, Y.; TANAKA, T. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n. 6, p. 573-584, 2001.

NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. **Protein Engineering**, Berlin, v. 12, p. 3-9, 1999.

OGAWA, K.; TOJO, S. Quantitative changes of storage proteins and vitellogenin during the pupal-adult development in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 16, p. 288-296, 1981.

PAN, M.L.; TELFER, W.H. Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 33, n. 2, p. 149-162, 1996.
Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 27 jun. 2009.

_____. Storage hexamer utilization in two lepidopterans: differences correlated with the timing of egg formation. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 1, n. 2, 2001.
Disponível em: <<http://www.insectscience.org>>. Acesso em: 22 fev. 2009.

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

PENNACCHIO, F.; STRAND, M.R. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 233-58, 2006.

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

PENNACCHIO, P.; FALABELLA, P.; SORDETTI, R.; VARRICCHIO, P.; MALVA, C.; VINSON, S.B. Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 9, p. 845-857, 1998.

- PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Stage dependent influences of polydnviruses and the parasitoidlarva on host ecdysteroids. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 55, n. 8, p. 707-715, 2009.
- PRICE, D.R.G.; GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.
- PRUIJSSERS, A.J.; FALABELLA, P.; EUM, J.H.; PENNACCHIO, F.; BROWN, M.R.; STRAND, M.R. Infection by a symbiotic polydnvirus induces wasting and inhibits metamorphosis of the moth *Pseudoplusia includens*. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 212, p. 2998-3006, 2009.
- RAHBÉ, Y.; DIGILIO, M.C.; FEBVAY, G.; GUILLAUD, J.; FANTI, P.; PENNACCHIO, F. Metabolic and symbiotic interactions in amino acid pools of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, parasitized by the braconid *Aphidius ervi*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 48, n. 5, p. 507-516, 2002.
- RICHARDS, R.H.; DANI, M.P. Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, n. 6, p. 1041-1049, 2008.
- RIVERS, D.B.; DENLINGER, D.L. Redirection of metabolism in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, following envenomation by the ectoparasitoid, *Nasomia vitripennis*, and correlation of metabolic effects with the diapause status of the host. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 40, n. 3, p. 207-215, 1994.
- _____. Venom-induced alterations in fly lipid metabolism and its impact on larval development of the ectoparasitoid *Nasomia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 66, p. 104-110, 1995.
- SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F.L. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v. 45, n. 1, p. 103-110, 2008.
- SCHAFELLNER, C.; MARKTL, R.C.; SCHOPF, A. Inhibition of juvenile hormone esterase activity in *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) larvae parasitized by *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera, Braconidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 53, n. 8, p. 858-868, 2007.
- SCHEPERS, E.J.; DAHLMAN, D.L.; ZHANG, D. *Microplitis croceipes* teratocytes: in vitro culture and biological activity of teratocyte secreted protein. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 9, p. 767-77, 1998.

SCHOPF, A.; STEINBERGER, P. The influence of the endoparasitic wasp *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera: Braconidae) in the growth, food consumption and food utilization of its host larva, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **European Journal of Entomology**, Ceske Budejovice, v. 93, p. 555-568, 1996.

SHELBY, K.S.; WEBB, B.A. Polydnavirus infection inhibits synthesis of an insect plasma protein, arylphorin. **Journal of General Virology**, London, v. 75, n. 9, p. 2285–2292, 1994.

_____. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 263-270, 1997.

_____. Polydnavirus-mediated inhibition of lysozyme gene expression and the antibacterial response. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 265–272, 1998.

SHENG, L.; FALABELLA, P.; KURIACHAN, I.; VINSON, S.B.; BORST, D.W.; MALVA, C.; PENNACCHIO, P. Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 49, n. 11, p. 1021-1030, 2003.

SONODA, S.; FUKUMOTO, K.; IZUMI, Y.; ASHFAQ, M.; YOSHIDA, H.; TSUMUKI, H. Methionine-rich storage protein gene in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*, is expressed during diapause in response to cold acclimation. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 853–859, 2006.

SPYLIOTOPOULOS, A.; GKOUVITSAS, T.; FANTINO, A.; KOURTI, A. Expression of a cDNA encoding a member of the hexamerin storage proteins from the moth *Sesamia nonagrioides* (Lef.) during diapause. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 148B, n. 1, p. 44–54, 2007.

STAMP, N.E. Behavior of parasitized aposematic caterpillars: advantages to the parasitoid or the host? **American Naturalist**, Chicago, v. 118, p. 715-725, 1981.

STRAND, M.R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, Beijing, v. 15, p. 1-14, 2008.

STRAND, M.R.; WITHERELL, R.A.; TRUDEAU, D. Two *Microplitis demolitor* polydnavirus mRNAs expressed in hemocytes of *Pseudoplusia includens* contain a common cysteine-rich domain. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 2146-2156, 1997.

SUDERMAM, R.J.; PRUIJSSERS, A.J.; STRAND, M.R. Protein tyrosine phosphatase-H2 from a polydnavirus induces apoptosis of insect cells. **Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 6, p. 1411-1420, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596–1599, 2007.

TATUSOVA, T.A.; MADDEN, T.L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 174, p. 247-250, 1999.

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

THOMPSON, S.N. Redirection of host metabolism and effects on parasite nutrition. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 1, chap. 6, p. 125-144.

_____. Parasitism enhances the induction of gluconeogenesis by the insect *Manduca sexta* L. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 163 -173, 2001.

THOMPSON, S.N.; DAHLMAN, D.L. Aberrant nutritional regulation of carbohydrate synthesis by parasitized *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 44, n. 9, p. 745-753, 1998.

_____. Blood sugar formation due to abnormally elevated gluconeogenesis: aberrant regulation in a parasitized insect, *Manduca sexta* Linnaeus. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1454, n. 2, p. 133–142, 1999.

THOMPSON, S.N.; REDAK, R.A.; WANG, L.W. Altered dietary nutrient intake maintains metabolic homeostasis in parasitized larvae of the insect *Manduca sexta* L. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 204, p. 4065-4080, 2001.

TOJO, S.; MORITA, M.; AGUI, N.; HIRUMA, K. Hormonal regulation of phase polymorphism and storage protein fluctuation in the common cutworm, *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 31, n. 4, p. 283- 292, 1985.

TUNGJITWITAYAKUL, J.; SINGTRIPOP, T.; NETTAGUL, A.; ODA, Y.; TATUN, N.; SEKIMOTO, T.; SAKURAI, S. Identification, characterization, and developmental regulation of two storage proteins in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, n. 1, p. 62–76, 2008.

VINSON, S.B. Physiological interactions between the host genus *Heliothis* and its guild of parasitoids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 13, n. 1/2, p. 63-81, 1990. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 05 jun. 2008.

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

VINSON, S.B.; MOURAD, A.K.; SEBESTA, D.K. Source of possible host regulatory factors in *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 26, n. 2/3, p. 197–209, 1994. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 05 jun. 2008.

VINSON, S.B.; PENNACCHIO, F.; CONSOLI, F.L. The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective, In: EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J. (Ed.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford: BIOS Scientific Publ., 2001. chap. 11, p. 187-206.

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

YU, R.X.; CHEN, Y.F.; CHEN, X.X.; HUANG, F.; LOU, Y.G.; LIU, S.S. Effect of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 53, n. 1, p. 22–29, 2007.

ZHANG, D.; DAHLMAN, D.L. *Microplitis croceipes* teratocytes cause developmental arrest of *Heliothis virescens* larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 12, n. 1, p. 51–61, 2005. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 05 jun. 2008.

ZHENG, Y.; YOSHIGA, T.; TOJO, S. cDNA cloning and deduced amino acid sequences of three storage proteins in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepdoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 35, p. 31-39, 2000.

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

ZHU, Y.C.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K.J. cDNA sequences and mRNA levels of two hexamerin storage proteins PinSP1 and PinSP2 from the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, p. 525–536, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)