

CHRISTIANE DA COSTA CARREIRA NUNES

**EFEITO DO PARASITISMO DE LARVAS DE
Diatraea saccharalis (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) PELA
VESPA *Cotesia flavipes* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) NAS
REAÇÕES DE DEFESA FRENTE À INOCULAÇÃO DE AGENTE
ABIÓTICO: SISTEMA DE PROFENOLOXIDASE, PRODUÇÃO
DE ÓXIDO NÍTRICO E REAÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista, Campus
de Botucatu, como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTOR em Ciências
Biológicas, Área de Concentração Zoologia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. ELISA APARECIDA GREGÓRIO

UNESP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Nunes, Christiane da Costa Carreira.

Efeito do parasitismo de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) pela vespa *Cotesia Flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) nas reações de defesa frente à inoculação de agente abiótico: sistema de profenoloxidase, produção de óxido nítrico e reação de encapsulação / Christiane da Costa Carreira Nunes. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2006.

Orientador: Elisa Aparecida Gregório
Assunto CAPES: 21303002

1. Parasitismo - Comportamento 2. Hymenoptero 3. Pragas agrícolas - Controle biológico

CDD 595.7

Palavras-chave: *Cotesia flavipes*; *Diatraea saccharalis*; Encapsulação; Parasitismo; Profenoloxidase; Ultra-estrutura.

Dedico este trabalho aos meus pais Cláudio e Célia e ao meu querido irmão Júnior. Dedico este trabalho ao meu amado André e ao tesouro mais precioso que Deus me deu, Lucas. Sem vocês esta caminhada seria impossível.



“Amo ao Senhor, pois ele ouviu a minha voz e a minha súplica.

Porque inclinou para mim os seus ouvidos;

invocá-lo-ei enquanto viver.

Cordéis da morte me cercaram,

e angústias do inferno se apoderaram de mim;

encontrei aperto e tristeza.

Então, invoquei o nome do Senhor, dizendo:

Ó Senhor, livra a minha alma!

Piedoso e justo é o Senhor;

o nosso Deus tem misericórdia.

O Senhor guarda os simples;

quando eu estava abatido, ele me livrou.

Volta, minha alma, ao teu repouso, pois o Senhor te fez bem.

Pois tu, Senhor, livraste a minha alma da morte,

os meus olhos das lágrimas e os meus pés da queda.”

Salmo 116

Deus é maravilhoso e fiel, Deus de amor e de misericórdia!!!

A ti Senhor, toda Honra, toda Glória e todo Louvor, que Lhe é devido.

Meu profundo agradecimento:

Aos amigos Nivalde, Maria Helena, Claudete e Leda, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu, pela dedicação no processamento do material para análise ultra-estrutural, pelo auxílio junto ao microscópio eletrônico e pela documentação fotográfica.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração em Zoologia, pela prontidão em fornecer material e auxílio financeiro para a participação em Congressos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, principalmente ao Sérgio.

À bibliotecária Selma Maria, pelo auxílio na organização das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

À Usina Barra Grande, Lençóis Paulista-SP, pelo fornecimento do material biológico utilizado. Em especial ao Marino, por sua atenção. Também ao laboratório entomológico Bionovo, Novo Horizonte-SP, especialmente à Susana Dotti.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu, pelo uso do fotomicroscópio. Ao Prof. Francisco e à Camila, que conheci e tornou-se minha amiga.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu. À Ana e especialmente à professora Ângela pelo incentivo.

À Ana Carolina Faraldo, minha “tira dúvidas”, sempre pronta a me ajudar.

À Prof^a. Lúcia Helena Faccioli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, pelo uso do laboratório. Ao Anderson de Sá Nunes (nosso amigo Homer), pela enorme colaboração durante os experimentos de NO.

Ao Departamento de Hemoglobinopatias da UNESP/São José do Rio Preto e à Prof^a. Claudia Bonini, pelo uso do Leitor de ELISA. Ao Departamento de Bioquímica da UNESP/São José do Rio Preto, por ceder o laboratório para a realização da técnica da proteína total e em especial à aluna de pós-graduação, Patrícia, pelo auxílio.

Ao Departamento de Biologia da UNESP/São José do Rio Preto, pelas facilidades obtidas no uso do laboratório. Em especial ao Prof. Sebastião Taboga, se me permite, meu “co-orientador”, que abriu para mim importantes e inúmeras portas.

À Ângela e à Terezinha, cujas teses foram os meus livros de cabeceira.

À minha querida vizinha Dona Marilda pelo ombro amigo nas minhas horas mais difíceis. *“Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra.” Salmo 121.*

Ao CNPq, pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

À grande amiga Daniela Carvalho e à minha melhor amiga, Sheila. Jamais vou esquecer os momentos que passamos juntas, “na alegria e na tristeza”.

“Grandes coisas fez o Senhor por nós e por isso estamos alegres.” Salmo 126.

Eu agradeço a Deus pela vida da Pastora Maria, da Pastora Vanilda e especialmente da Pastora Glória, da igreja Missão da Fé, São José do Rio Preto/SP. Divido com essas mulheres abençoadas esta conquista, obrigada pelas orações, pelo carinho; obrigada por fazerem parte da minha vida.

“Não a nós, Senhor, não a nós, mas ao teu nome dá glória, por amor da tua benignidade e da tua verdade.” Salmo 115.

Elisa, faltam-me palavras. O que você fez por mim, foi muito grande! A profissional que eu sou hoje, devo a você. Obrigada pela paciência (sei que precisou ter muita) e pelo cuidado que veio de você. Obrigada pelas duas chances que me deu para realizar este nosso trabalho. O seu exemplo, levo comigo bem guardado no coração. O meu sincero agradecimento à minha “mãe de profissão”, minha querida orientadora Elisa.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 2 |
| OBJETIVOS | 17 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 1. OBTENÇÃO DOS INSETOS..... | 19 |
| 1.1. <i>Diatraea saccharalis</i> | 19 |
| 1.2. <i>Cotesia flavipes</i> | 19 |
| 2. INOCULAÇÃO EM LARVAS DE <i>Diatraea saccharalis</i> | 19 |
| 2.1. Grupos e subgrupos experimentais de <i>Diatraea saccharalis</i> | 20 |
| 3. COLETA DA HEMOLINFA..... | 21 |
| 4. EFEITO DO PARASITISMO E/OU AGENTE ABIÓTICO NO SISTEMA DE PROFENOLOXIDASE (proPO)..... | 21 |
| 4.1. Ativação <i>in vitro</i> do sistema de proPO em hemolinfa total..... | 21 |
| 4.2. Detecção <i>in vitro</i> de PO em monocamada de hemócitos..... | 22 |
| 5. EFEITO DO PARASITISMO E DE AGENTE ABIÓTICO NA FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)..... | 24 |
| 5.1. Dosagem de NO..... | 24 |
| 5.2. Localização celular de NO..... | 24 |
| 6. EFEITO DO PARASITISMO NA CAPACIDADE <i>in vivo</i> DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO..... | 25 |
| 6.1. Implantação do material abiótico..... | 25 |
| 6.2. Recuperação e processamento do agente abiótico..... | 25 |
| 6.3. Preparo do material para MET..... | 26 |
| RESULTADOS | 28 |
| 1. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA ATIVAÇÃO <i>in vitro</i> DO SISTEMA DE PROFENOLOXIDASE (proPO)..... | 28 |

| | Pág. |
|--|-------------|
| 1.1. Cinética da reação de ativação de proPO em larvas não parasitadas e definição do tempo de reação..... | 28 |
| 1.2. Cinética da reação de ativação de proPO em larvas parasitadas pela <i>Cotesia flavipes</i> | 30 |
| 1.3. Efeito da Laminarina na ativação do sistema de proPO..... | 32 |
| 1.4. Ativação do sistema de proPO em função da idade da larva de <i>Diatraea saccharalis</i> | 33 |
| 1.5. Efeito do parasitismo na ativação do sistema de proPO..... | 34 |
| 1.6. Efeito do veículo de inoculação e do agente abiótico na ativação do sistema de proPO..... | 35 |
| 1.7. Efeito do parasitismo e/ou inoculação do agente abiótico na ativação do sistema de proPO..... | 36 |
| 2. DETECÇÃO <i>in vitro</i> DE HEMÓCITOS COM REAÇÃO POSITIVA PARA PO..... | 41 |
| 3. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)..... | 49 |
| 3.1. Efeito da idade das larvas na produção de NO..... | 49 |
| 3.2. Efeito do parasitismo na produção de NO..... | 49 |
| 3.3. Efeito do parasitismo e/ou inoculação de agente abiótico na produção de NO, em diferentes tempos experimentais..... | 50 |
| 4. LOCALIZAÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)..... | 53 |
| 5. REAÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO EM LARVAS DE <i>Diatraea saccharalis</i> PARASITADAS PELA VESPA <i>Cotesia flavipes</i> | 56 |
| 5.1. Análise morfológica ultra-estrutural da cápsula em resposta à inoculação de esferas de Sephadex..... | 56 |
| 5.1.1. Inoculação intermediária (2 dias)..... | 56 |
| 5.1.2. Inoculação intermediária (3 dias)..... | 57 |
| 5.1.3. Inoculação tardia (6 dias)..... | 58 |
| 5.1.4. Inoculação tardia (10 dias)..... | 58 |

| | Pág. |
|--|-------------|
| DISCUSSÃO | 90 |
| 1. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA ATIVAÇÃO <i>in vitro</i> DO SISTEMA DE PROFENOLOXIDASE (proPO)..... | 90 |
| 2. DETECÇÃO <i>in vitro</i> DE HEMÓCITOS COM REAÇÃO POSITIVA PARA PO..... | 102 |
| 3. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)..... | 106 |
| 4. LOCALIZAÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)..... | 112 |
| 5. REAÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO EM LARVAS DE <i>Diatraea saccharalis</i> PARASITADAS PELA VESPA <i>Cotesia flavipes</i> | 113 |
| CONCLUSÕES | 128 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 130 |
| RESUMO | 152 |
| ABSTRACT | 154 |

INTRODUÇÃO

Desde o início do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil, os agricultores têm tido prejuízos causados por insetos. No seu estágio larval a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), é uma das espécies que mais afetam a produtividade agrícola e industrial da cana-de-açúcar, atacando também as culturas de milho, arroz, sorgo, trigo e alguns tipos de capins (METCALF & FLINT, 1966; SILVA *et al.*, 1968; CHIPPENDALE, 1979; TERÀN *et al.*, 1983).

O ciclo evolutivo completo deste inseto varia de 53 a 60 dias, ocorrendo até 4 gerações por ano, na natureza. Em condições naturais, a mariposa fêmea de *Diatraea saccharalis* faz a postura nas folhas da cana, após o acasalamento; a eclosão dos ovos ocorre em um período de 4 a 9 dias. As lagartas alimentam-se do parênquima e da bainha da folha e, após a primeira ecdise, penetram no colmo perfurando extensas galerias, geralmente no sentido longitudinal. Após um período médio de 40 dias de desenvolvimento nas galerias, as larvas atingem cerca de 25 mm de comprimento. No final do ciclo larval as lagartas fecham os orifícios no colmo da cana com fios de seda e restos da sua alimentação, passando para a fase de crisálida que dura de 9 a 14 dias, originando a mariposa que emerge pelo orifício da cana (GALLO *et al.*, 1978).

Durante muitos anos a broca-da-cana foi combatida através da aplicação de inseticidas nas lavouras de cana-de-açúcar. Entretanto, o uso de inseticidas pode ter ação tóxica ao ser humano, causar imensos prejuízos ao meio ambiente, além de ser oneroso para os produtores. A capacidade de alguns parasitóides em escapar da reação imune do hospedeiro tem sido utilizada como poderosa arma no controle biológico de insetos que causam prejuízos para a produção agrícola, como é o caso da *Diatraea saccharalis* (WIEDENMANN & SMITH, 1995).

Atualmente a espécie mais utilizada para controlar a *Diatraea spp* é a *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), devido às inúmeras vantagens que apresenta sobre os demais parasitóides (RISCADO, 1982; LIMA FILHO, 1989). A *Cotesia flavipes* apresenta ciclo de vida relativamente curto (16 a 25 dias) e período de pré-ovoposição menor quando comparados aos dos taquinídeos *Metagonistylum minense* e *Paratheresia claripalpis* (Diptera), os quais também foram utilizados no controle biológico da broca (BENNETT, 1977; BOTELHO *et al.*, 1980).

O termo “sistema imunológico” é utilizado para os sistemas de defesa onde as alterações, causadas por um antígeno, levam à produção de anticorpos específicos e ao estabelecimento de uma memória antigênica. Sistema imune, segundo os imunologistas de vertebrados, são os mecanismos de defesa possuidores de memória e especificidade,

envolvendo a produção de imunoglobulinas. O sistema imune é, portanto, regulado por uma combinação de células brancas do sangue e das substâncias solúveis que estas produzem. Existem basicamente 3 tipos destas células envolvidas no controle da resposta imune em mamíferos: linfócitos B (produtores de anticorpos), linfócitos T e os macrófagos (reguladores da produção). Os linfócitos T que estimulam a produção de anticorpos são chamados T auxiliares, e os que reprimem a produção são chamados de T supressores (NAOUM, 2001; FIELDING *et al.*, 1998).

Os insetos não possuem um sistema de defesa baseado na produção de imunoglobulinas, embora tenham a capacidade de evitar infecções por microorganismos e parasitos (NAPPI & STREAMS, 1969; WHITCOMB *et al.*, 1974; EHLERS *et al.*, 1992). Esta habilidade pode ser um dos fatores primordiais que explicam o sucesso de sobrevivência dos insetos em nichos ecológicos tão diversos, até mesmo inóspitos.

A hemolinfa dos insetos é constituída por componente líquido, o plasma, onde estão suspensos os elementos figurados, os hemócitos. Os hemócitos são células que se encontram circulando livremente na hemolinfa ou organizadas dentro de estruturas denominadas tecidos hemopoiéticos, hemocitopoiéticos (HOFFMANN *et al.*, 1979; GUPTA, 1985; MULLINS, 1985), ou ainda tecidos fagocitários (JONES, 1970).

GUPTA (1985) apresentou uma extensa revisão da literatura, identificando sete tipos de hemócitos nos diferentes insetos estudados, em nível ultra-estrutural: Prohemócito (PR), Plasmatócito (PL), Granulócito (GR), Esferulócito (ES), Adipohemócito (AD), Oenocitóide (OE) e Coagulócito (CO). Estes tipos celulares também foram identificados na hemolinfa de muitas espécies de Lepidoptera (BEAULATON & MONPEYSSIN, 1977; SCHMIT & RATCLIFFE, 1978; ROWLEY & RATCLIFFE, 1981; TANAKA, 1987b; LACKIE, 1988; STRAND & NODA, 1991; SAXENA, 1992; STRAND & JOHNSON, 1996).

Os insetos protegem-se contra agentes patogênicos produzindo moléculas ou reações celulares que combatem invasores, porém com estratégias diferentes das observadas em vertebrados (RATCLIFFE *et al.* 1985; RATCLIFFE & ROWLEY, 1987; GUPTA, 1991).

O arsenal defensivo dos insetos é composto por barreiras estruturais passivas e por mecanismos de defesa ativos, mediados por células e moléculas. Dentre as barreiras físicas temos o exoesqueleto, as barreiras intestinais e respiratórias; já o sistema de defesa ativo compreende uma cascata de respostas, principalmente na hemolinfa, contra os organismos que penetram a hemocele (DUNN, 1986).

Quando um invasor penetra a hemocele de um inseto, geralmente via cutícula ou trato digestivo, este freqüentemente reconhece o organismo estranho como "não-próprio" e desencadeia uma série de reações celulares e/ou humorais para combater o invasor, resultado do esforço cooperativo entre o plasma e os hemócitos, presentes na hemolinfa (RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b; COOMBE *et al.*, 1984; GÖTZ & BOMAN, 1985; RATCLIFFE *et al.*, 1985; DUNN, 1986; FALLEIROS & GREGÓRIO, 1995; GILLOT, 1995). Vale ressaltar que os hemócitos possuem ainda outras funções, participando do transporte de substâncias como metabólitos (CROSSLEY, 1975, 1979) e hormônios (SCHARRER, 1965; TAKEDA, 1977), dos processos de remodelação de tecidos que ocorrem durante as mudas (CROSSLEY, 1979; SECCO, 1990; QUAGIO-GRASSIOTO, 1993), e ainda da reprodução (LANDUREAU & SZÖLLÖSI, 1974) e como fonte de hormônios (WIGGLESWORTH, 1979).

As reações de defesa dos insetos relacionadas diretamente com os hemócitos compreendem a coagulação da hemolinfa, a fagocitose, a formação de nódulos e a encapsulação (TYSON & JENKIN, 1974; SMITH & RATCLIFFE, 1978; RATNER & VINSON, 1983; PERSSON *et al.*, 1987; MELLO *et al.*, 1995, NIGAN *et al.*, 1996; GILLESPIE *et al.*, 1997; FEDER, *et al.*, 1997; AZAMBUJA *et al.*, 1998). Já as reações que envolvem indiretamente os hemócitos abrangem a produção de uma grande variedade de substâncias, tais como aglutininas, fatores líticos, antibacterianos, lisozimas, profenoxidase (proPO) e óxido nítrico (NO), entre muitos outros descritos na literatura (SÖDERHÄLL, 1982; RATCLIFFE *et al.*, 1984; RAVINDRANATH *et al.*, 1984; SÖDERHÄLL & SMITH, 1986; GUZO & STOLTZ, 1987; RATCLIFFE, 1982, 1986; ROHLOFF *et al.*, 1994; STRAND & PECH, 1995a; FEDER *et al.*, 1998; SHELBY & WEBB, 1999; NAPPI *et al.*, 2000; AZAMBUJA *et al.*, 2005; AZAMBUJA & GARCIA, 2005). Estes processos podem ocorrer isoladamente ou em conjunto, quando os insetos são agredidos por agentes estranhos na natureza, ou em laboratório quando da inoculação artificial de agente abiótico ou mesmo de parasitos.

Em muitas espécies de insetos, a resposta imune celular contra patógenos depende de dois tipos de reações: formação de nódulos/cápsulas e fagocitose por hemócitos (RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b). Quando um número muito grande de microorganismos invade a hemocele do inseto ou o corpo estranho é muito grande para ser fagocitado, ocorre a formação de nódulos ou cápsulas ao redor do invasor. Tais estruturas são encontradas em diferentes espécies de insetos coletados no campo e podem ser induzidas experimentalmente (HOROV & DUNN, 1983; GÖTZ, 1986a, 1986b).

A formação de nódulos é difícil de ser distinguida da encapsulação. A encapsulação celular é caracterizada pela superposição de diversas camadas de hemócitos circundando o agente invasor e originando uma cápsula multicelular hemocítica (SCHMIT & RATCLIFFE, 1977; LACKIE, 1981; RATCLIFFE, 1982, 1986; GUPTA 1985, 1987; GUZO & STOLTZ, 1987; RISKI & RISKI, 1987 entre outros), diferindo dos nódulos onde ocorre apenas um agrupamento de hemócitos ao redor do agente invasor (RATCLIFFE & GAGEN, 1976, 1977; RATCLIFFE & WALTERS, 1983; RATCLIFFE *et al.*, 1985). Um nódulo pode resultar em uma cápsula, como evolução natural da reação de defesa contra a invasão em massa de microorganismos.

Persistem dúvidas de como o invasor é morto ou tem seu desenvolvimento inibido dentro das cápsulas ou nódulos. Muitos trabalhos sugerem que a melanização destas estruturas, com a liberação de produtos tóxicos, seria a responsável pela morte dos parasitos (NAPPI, 1975; BERESKY & HALL, 1977; RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b). Outros estudos (SALT 1963, 1970) atribuem a morte ou inativação do agente infectante à asfixia ou desnutrição do invasor.

SCHMIT & RATCLIFFE (1977), trabalhando com implante de cordão nervoso em larvas de *Galleria mellonella*, descreveram o processo de encapsulação como bifásico, semelhante à formação de nódulos. A primeira fase, 5 min após o implante, envolve o contato e a lise de GR (hemócito granular), com liberação de material sobre o elemento estranho, resultando na formação de um coágulo. A segunda fase envolve a adesão de PL, 30 min após o implante; estas células continuam a aderir à cápsula por até 72 h, concomitante com a lise de GR.

Cápsulas são formadas em torno de materiais biológicos ou não biológicos. Os agentes biológicos incluem fungos, cestódeos, nematódeos, protozoários e vários tecidos estranhos (POINAR *et al.*, 1968, 1979, GÖTZ & VEY, 1974, 1987; RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b, entre outros). Os materiais não biológicos incluem peças de araldite, esferas de látex, fragmentos de celofane, esferas de Sephadex entre muitos outros (GRIMSTONE *et al.*, 1967; BREHÉLIN *et al.*, 1975; WIESNER & GÖTZ, 1993; BOMBONATO, 1999).

Espécies de insetos com baixo número de hemócitos circulantes reagem à presença de invasores grandes ou numerosos, por meio da formação de cápsulas do tipo humoral (SALT, 1963; POINAR & LEUTENEGGER, 1971; GÖTZ *et al.*, 1977; POINAR *et al.*, 1979 FARALDO *et al.*, 2006). As cápsulas humorais consistem de material amorfo e pigmentado, composto principalmente por melanina, entre outros elementos, sem a participação direta dos hemócitos (GÖTZ & BOMAN, 1985). Na encapsulação humoral o processo também é

bifásico, com a deposição inicial de material capsular, seguido de solidificação e melanização da cápsula (GÖTZ, 1986a, b). Este fenômeno garante a proteção de insetos contra fungos pouco virulentos, mas não contra os invasores mais patogênicos, que freqüentemente exaurem a capacidade de encapsulação do inseto (BUTT *et al.*, 1988).

Durante o processo de formação dos nódulos ou de encapsulação o invasor torna-se necrótico e melanizado (SCHMIT & RATCLIFFE, 1977; RATCLIFFE *et al.*, 1984, 1985; FORTON *et al.*, 1985; LACKIE *et al.*, 1985; RATCLIFFE *et al.*, 1991). A melanização é o resultado final da ativação de um complexo sistema enzimático em cascata, o sistema de proPO.

O sistema de proPO é um dos principais componentes dos mecanismos de defesa dos artrópodes. A fenoloxidase (PO) é a principal enzima produzida a partir da proPO, como resultado da ativação desse sistema, que envolve reação enzimática em cascata. Durante a ativação, a proPO é convertida em enzima ativa, PO, por clivagem proteolítica controlada, catalisada por diversas serina-proteases (ASHIDA, 1981; SÖDERHALL, 1982; LEONARD *et al.* 1985b; SAUL & SUGUMARAN, 1986, 1987 e 1988).

Toxinas de algumas espécies de fungos inibem a resposta de encapsulação, ao mesmo tempo em que diminuem a ativação do sistema proPO, sugerindo uma estreita relação entre esses dois mecanismos de defesa, em insetos (VEY & QUIOT, 1975; HUXMAN & LACKIE, 1986; VEY & GÖTZ, 1986).

A PO representa o componente terminal do sistema proPO. Ela catalisa o estágio inicial do processo de melanização, observado na hemocele em resposta à presença de material estranho ou injúria (KRAMER & HOPKINS, 1987; SUGUMARAN, 1987).

Freqüentemente, a PO pode ser encontrada sob a forma de proPO, dificultando sua identificação na hemolinfa de insetos (SCHMIT & RATCLIFFE, 1977; FISHER & BRADY, 1983; RATCLIFFE *et al.*, 1984, 1991; BROOKMAN *et al.*, 1988).

Quando um elemento estranho penetra à hemocele, ocorre a ativação do sistema de proPO, o que acarreta a produção de proteínas que agem semelhantemente a opsoninas na superfície do material estranho, e também de quinonas tóxicas e melanina, as quais matam ou inativam o invasor (SÖDERHÄLL, 1982). Um detalhe importante é a PO ser tóxica, tanto para o patógeno quanto para o inseto; assim, é importante para o inseto prevenir a ativação desnecessária do sistema proPO, ou inativar rapidamente esta enzima após a agressão do invasor (ZLOTKIN *et al.*, 1973).

O mecanismo pelo qual a melanina e/ou seus precursores, como as quinonas, levam os parasitos a morte é discutido. Acredita-se que estes compostos sejam altamente tóxicos, resultando na morte dos parasitos (RATCLIFFE *et al.*, 1985). Adicionalmente, a melanina e seus precursores têm propriedades fungistáticas (RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b; SÖDERHÄLL & AJAXON, 1982), além de serem citotóxicos (RATCLIFFE *et al.*, 1985).

A distinção entre sistema imune celular e humoral é arbitrária, uma vez que essas respostas costumam ocorrer simultaneamente e mostram-se cada vez mais complexamente relacionadas. Como exemplo temos a constatação de que aglutininas isoladas de larvas de *Spodoptera exigua* aumentaram em 80% a fagocitose de blastósporos de *Paucilomyces farinasus* por GR, em preparações *in vitro* (PENDLAND *et al.*, 1988). Também, a ativação da proPO em preparações de hemócitos *in vitro*, induziu um aumento na capacidade de fagocitose destas células (RATCLIFFE *et al.*, 1984; LEONARD *et al.*, 1985a), o que posteriormente confirmou-se em outros trabalhos (BROOKMAN *et al.*, 1988; RICHARDS & PARKINSON, 2000).

A complexidade das reações de defesa foi constatada por AZAMBUJA *et al.* (2005) em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera), inseto vetor do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, que observaram interações desses parasitos com moléculas presentes não apenas no tubo digestivo, mas também na hemolinfa. No caso do *Trypanosoma rangeli* invadir a hemocele do inseto vetor, poderá ser reconhecido e provocar não apenas a ativação do sistema de proPO, mas também a fagocitose, a micro-agregação hemocitária, a atividade superóxido, de NO e a via de biossíntese dos eicosanóides. Os eicosanóides têm a função de mediar as reações de imunidade de insetos a bactérias e fungos (STANLEY, 2000) e as interações hospedeiro-parasito (CARTON *et al.*, 2002). Um exemplo da ação dos eicosanóides é a formação de micro-agregados em *Rhodnius prolixus* inoculados com *Trypanosoma rangeli* (GARCIA *et al.*, 2004a, b). Numa visão ampla, os eicosanóides desempenham importantes funções na organização biológica em nível das células, dos organismos e das interações ecológicas.

Estudos das reações do hospedeiro a parasitóides mostram que pode haver uma supressão da imunidade pelo parasito (VINSON, 1986). Em alguns casos, os hemócitos do inseto hospedeiro estão alterados e mostram uma redução em sua capacidade de fagocitar ou encapsular partículas introduzidas em sua hemocele, na vigência do parasitismo (VINSON, 1977; STOLTZ & GUZO, 1986; PREVOST *et al.*, 1990; LAVINE & BECKAGE, 1996).

Sabe-se que várias estratégias são utilizadas por insetos parasitóides para escapar das reações de defesa de seus hospedeiros. Alguns parasitóides podem desenvolver-se em locais onde o fluxo da hemolinfa é menor, dificultado o acesso dos hemócitos ao reconhecimento de sua superfície estranha (SALT, 1970; CARTON, 1977; EDSON *et al.*, 1981). Outros podem apresentar características na sua superfície que evitam a resposta de encapsulação por parte do hospedeiro (SALT, 1963, 1968; DAVIES & VINSON, 1986). Ovos de *Nemeritis canescens* são resistentes à encapsulação pelas larvas do hospedeiro *Ephestia kuhniella*, por apresentarem cobertura que impede a adesão de hemócitos à sua superfície (SALT, 1963).

DAVIES & VINSON (1986), usando sistema de encapsulação *in vitro*, observaram que ovos do parasitóide *Cardiochiles nigriceps* escapavam da encapsulação pelos hemócitos de seu hospedeiro *Heliothis virescens*. Propuseram que a camada fibrosa que o ovo do parasitóide apresenta teria, entre outras funções, a capacidade de adiar a resposta imune até que se estabelecesse a supressão da encapsulação do ovo. Estudo realizado por VINSON & SCOTT (1974) em *Heliothis zea*, não susceptível ao mesmo parasitóide, mostrou que a remoção da camada fibrosa que envolve o ovo do parasitóide, por enzimas presentes na hemolinfa, promove a opsonização do ovo, facilitando a encapsulação pelos hemócitos do hospedeiro, explicando assim sua resistência ao parasitóide.

Durante a ovoposição, várias espécies de vespas braconídeas e ichneumídeas injetam veneno ou partículas semelhantes a vírus, a exemplo dos polidnavírus (PDV) (FLEMING *et al.*, 1983; WHIFIELD, 1990; FLEMING & SUMMERS, 1991; STRAND, 1994; STRAND & PECH, 1995b; ASGARI *et al.*, 1996; WEBB & LUCKHART, 1996; BECKAGE, 1998; SHELBY & WEBB, 1999). O veneno e o PDV possuem propriedades tóxicas e há fortes indícios de que estejam envolvidos também na supressão imune do hospedeiro (KITANO, 1982; DAVIES *et al.*, 1987; TANAKA, 1987a, 1987b; DAVIES & VINSON, 1988; BECKAGE, 1998).

Além disso, ovos de algumas vespas das famílias Braconidae e Scelionidae liberam na eclosão, células derivadas da membrana serosa, chamadas de teratócitos (TE) (VINSON & LEWIS, 1973; GÖTZ & BOMAN, 1985; STRAND, 1986; TANAKA & WAGO, 1990; DAHLMAN, 1991; STRAND & WONG, 1991; DAHLMAN & VINSON, 1993; STRAND & PECH, 1995a). O papel do TE na eficiência do parasitismo não está claro. Acredita-se que tenha função trófica (SLUSS, 1968), com base na observação de que esta célula aumenta em tamanho e, por vezes, desaparece da hemolinfa do inseto hospedeiro na medida em que a larva do parasitóide vai crescendo. Isto sugere que os TE seriam fonte de nutrientes específicos, particularmente nos últimos instares do parasitóide. De fato, foram encontrados

tanto fragmentos de TE quanto células inteiras no trato digestivo de muitas larvas de parasitóides (SCHLINGER & HALL, 1960; SLUSS & LEUTENEGGER, 1968; ARAKAWA & KITANO, 1989; STRAND & WONG, 1991). Existem ainda indicações, em nível ultra-estrutural, de que os TE teriam também a função de síntese e secreção de proteínas e outras substâncias necessárias para a efetivação do parasitismo (KOSCIELSKI et al., 1978; LAWRENCE, 1990).

Os insetos possuem uma resposta imune inata que consiste em reações humorais com a ativação de cascata proteolítica, que dá início a muitos eventos incluindo a produção de NO.

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO é considerado um dos mais importantes mediadores de processos fisiológicos intra e extracelulares. Em animais superiores, está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Possui também um papel como mensageiro/modulador de diversos processos biológicos essenciais em mamíferos superiores. Constitui ainda, um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir células tumorais e patógenos, fazendo parte assim, do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, de ação antibactericida, antiviral e antiparasítica (DRAPIER *et al.*, 1988, FENG & WALKER, 1993; OSWALD *et al.*, 1994, GAZZIELLI *et al.*, 1992 e LOWENSTEIN *et al.*, 1993). A sua ação está presente na inflamação e nos mecanismos de auto-imunidade (FLORA & ZILBERSTEIN, 2000). Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microorganismos invasores. Entretanto, o NO apresenta uma papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. O NO, à semelhança da proPO, é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobicida (STUEHR & MARLETTA, 1985; HIBBS *et al.*, 1987; SCHMIDT, 1994).

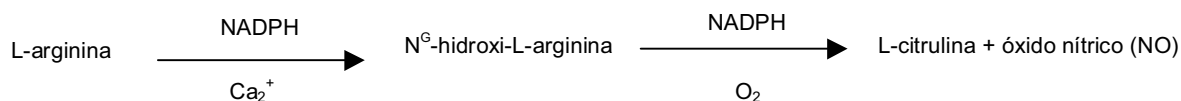
Um exemplo disso é o que ocorre no coma de pacientes que apresentam a chamada malária grave. Existem cerca de 150 espécies de *Plasmodium* causadores de malária em diferentes hospedeiros vertebrados, mas somente 4 espécies parasitam o ser humano. Durante a fase aguda da malária ocorre a ativação e mobilização de células imunocompetentes que produzem citocinas, que agirão direta ou indiretamente sobre o parasito, mas que, assim

como a proPO, podem ser nocivas para o hospedeiro. Estas citocinas aumentam a produção de NO pelos leucócitos, músculo liso, micróglia e endotélio vascular. Sendo o NO um potente inibidor da função celular, esta substância tem sido recentemente relacionada na patogenia de algumas complicações da malária grave, principalmente o coma em pacientes humanos (NEVES, 2005).

Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o NO é um gás. Sua solubilidade é moderada em água, sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tais como hexano. Desta forma, quando presente em sistemas biológicos o NO tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas (KERWIN *et al.*, 1995). Tanto na fase gasosa como na fase aquosa, o NO reage com O₂ formando dióxido de nitrogênio (NO₂). Este, por sua vez, pode reagir com outra molécula de NO e produzir trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), ou com o próprio NO₂ (dimerização) gerando tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄). Estes compostos reagem rapidamente com água, formando íons nitrito e nitrato.

A demonstração da produção de NO é ainda difícil, feita sempre de maneira indireta. Todas as pesquisas pioneiras não demonstraram o NO propriamente dito devido à sua evanescência, utilizando-se a concentração de nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) como prova de sua produção. Em nosso trabalho consideramos o teor de íon nitrito como parâmetro da produção de NO. A evidência inicial de óxidos de nitrogênio no metabolismo veio de experimentos que demonstraram produção de nitratos em camundongos “germ-free”, no início da década de 80 (GREEN *et al.*, 1981). Em 1985 demonstrou-se que macrófagos ativados por lipopolissacarídeos bacterianos eram capazes de levar à produção de nitritos e nitratos (STUEHR & MARLETTA, 1985).

Na clássica reação química de formação do NO, a L-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina, com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e Ca²⁺, sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO. A nomenclatura N^G significa que o grupo hidroxila está ligado ao nitrogênio do grupo guanidina.



Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas da família citocromo P450-like, chamadas de NO sintases (NOS). As NOS são dependentes de O₂, NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade (MARLETTA, 1989; BREDDT *et*

al., 1991; MAYER, 1994). Até o presente momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de c-NOS e i-NOS (MARLETTA, 1993; MONCADA, 1991). Todas as três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e 17 (isoforma III). O NO é, portanto, produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e NO-sintase induzível (i-NOS).

A i-NOS ou isoforma II não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente de modo habitual, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos e/ou citocinas (STUEHR, *et al.*, 1991). Esta isoenzima também pode ser chamada de mac-NOS (macrophage NO synthase). Vários autores consideram que qualquer célula do organismo tem a capacidade de produzir i-NOS, sob estímulos apropriados (NICHOLSON *et al.*, 1996; HAYNES *et al.*, 1997; TENG *et al.*, 1998). Uma vez induzida, a i-NOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos ou por outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, células tumorais ou parasitos, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes (STUEHR & MARLETTA, 1985; HIBBS *et al.*, 1987; GAZZINELLI *et al.*, 1992; OSWALD *et al.*, 1994; SCHMIDT, 1994; MOILANEN & VAPPATALO, 1995).

O Ca^{2+} é um importante sinalizador citoplasmático, atuando a partir de ligações com proteínas intracelulares receptoras específicas. Uma destas proteínas citoplasmáticas (Ca^{2+} -receptora) é a calmodulina. Quando o Ca^{2+} se liga à calmodulina forma-se o complexo Ca^{2+} /calmodulina, este, um elemento regulatório de algumas atividades enzimáticas intracelulares. Quando a concentração intracelular de Ca^{2+} cai, desfaz-se o complexo Ca^{2+} /calmodulina e a atividade enzimática é desativada. Este mecanismo Ca^{2+} /calmodulina é responsável pela ativação da NOS. No caso da c-NOS, segue-se o mecanismo descrito, ou seja, é necessária determinada concentração de Ca^{2+} intracelular para a atividade enzimática, ocorrendo inativação da c-NOS com a queda do Ca^{2+} citoplasmático abaixo de determinado nível. Para a i-NOS, o mecanismo de ação depende da concentração intracelular de Ca^{2+} somente para ativação, sendo que a queda do Ca^{2+} intracelular não inibe a atividade da i-NOS. Assim pode-se também classificar as NOS como cálcio-dependentes (que são as isoformas I e III) e cálcio-independentes (isoforma II), segundo NATHAN & XIE (1994).

Há revisões sobre o NO e também sobre a NOS em vertebrados (HUANG & LO, 1998;

WANG *et al.*, 1999). Muito do nosso entendimento de NO e NOS deriva destes trabalhos, em modelos de vertebrados. Quanto ao papel do NO em invertebrados, estudos básicos comparando fisiologia e bioquímica em organismos simples, têm fornecido forte evidência de que o NO está funcionalmente preservado na escala evolutiva (SNYDER & BREDT, 1992; ARCHERS, 1993; MARLETTA, 1993, 1994). O NO funciona como uma molécula sinalizadora em todas as ordens de invertebrados estudados (COLASANTI & VENTURINI, 1998), à semelhança dos vertebrados e em alguns contextos bastante surpreendentes. É sabido de longa data, por exemplo, que insetos hematófagos utilizam-se de anti-coagulantes salivares no processo de alimentação, a fim de inibir a agregação plaquetária e a vasoconstrição de suas vítimas (LAW *et al.*, 1992). Porém, recentemente foi descoberto em alguns insetos hematófagos o envolvimento do NO neste processo. *Rhodnius prolixus* possui um vasodilatador salivar, que consiste em uma hemeproteína que armazena e libera NO (RIBEIRO *et al.*, 1993).

Insetos têm sido particularmente valiosos nas considerações sobre o papel do NO. Larvas de *Manduca sexta* têm sido utilizadas em estudos sobre o papel do NO na rede neuronal durante o processo de aprendizado (WEEKS *et al.*, 1997), do papel do NO no olfato (OLAND & TOLBERT, 1996) e do processo celular e neuronal que acompanha a metamorfose (TRUMAN, 1992, 1996).

Os gafanhotos *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria*, também foram insetos utilizados para estudos neuronais. Estes modelos têm sido importantes para fisiologistas de insetos. O alto pH luminal do intestino de *Manduca* é recorde (pH 12!) e suas células foram usadas como fontes de tecido para o primeiro isolamento e purificação de H⁺ - ATPase (WIECZOREK, *et al.*, 2000).

Insetos foram usados para estudar aspectos fisiológicos em que o NO está envolvido. Não é surpresa que investigações sobre o NO em insetos têm sido extensivamente realizadas. Assim, foi realizada caracterização molecular dos genes da NOS em insetos e também a análise bioquímica da NOS, sendo este fato notável devido ao tamanho minúsculo de algumas espécies utilizadas.

Quanto aos genes da NOS e das isoformas de insetos, muitos estudos foram realizados em *Drosophila melanogaster* (REGULSKI & TULLY, 1995), *Anopheles stephensi* (LUCKHART & ROSENBERG, 1999), *Manduca sexta* (NIGHORN *et al.*, 1998) e *Rhodnius prolixus* (YUDA *et al.*, 1996).

Com relação à função fisiológica da NOS em insetos, alguns estudos tomaram por objeto o sistema nervoso, por sua relativa simplicidade em insetos, permitindo estudar o

papel do NO no aprendizado, memória, locomoção e olfato, como mencionado anteriormente. É grande o interesse sobre papel do NO no contexto neuronal, em insetos. O'SHEA *et al.* (1998) trabalhando com tecido cerebral de *Schistocerca gregaria*, demonstraram que altos níveis de NO localizados em áreas específicas do cérebro, estão associados com o aprendizado e a memória desses animais; este estudo também se aplica para *Apis mellifera* (MULLER & HILDEBRANDT, 1995). NO tem demonstrado ser muito importante no olfato de vertebrados; estudos em insetos demonstraram que NO também contribui neste processo em invertebrados (ELPHICK *et al.*, 1995; OLAND & TOLBERT, 1996). A percepção quimio-sensorial em insetos ocorre através das antenas, com processamento e integração de sinais ocorrendo no lóbulo antenal. Em *Manduca sexta* a NOS é altamente expressiva na antena (NIGHORN *et al.*, 1998), sugerindo que a comunicação entre receptores olfativos e centros processadores é modulada por NO. Além disso, em *Manduca sexta* o NO também é muito importante para o desenvolvimento dos neurônios do lóbulo antenal (SCHACHTNER *et al.*, 1998).

Em *Drosophila*, a estrutura dos órgãos do inseto adulto é determinada no disco imaginal da larva (COHEN, 1993). Na estruturação final de qualquer órgão, o tempo e a contribuição da proliferação celular versus a diferenciação celular tem que ser muito bem controlada. Um trabalho com *Drosophila* mostrou que o NO é uma importante molécula para mediar o balanço entre a proliferação e a diferenciação celular (KUZIN *et al.*, 1996). Os autores demonstraram que a NOS é expressa em todo o disco imaginal da larva de terceiro instar.

Há uma estimativa de 30 milhões de espécies de insetos no planeta. Dentre as espécies estudadas, todas utilizam o NO como molécula sinalizadora. Algumas dessas espécies de insetos são vetores de doenças, outras são pragas agrícolas de interesse econômico, como é o caso da *Diatraea saccharalis*. Fica claro que os estudos sobre NO e NOS em insetos podem gerar não somente resultados significativos quanto à biologia, mas também alternativas do controle para pragas agrícolas.

Pouco se sabe sobre a morfofisiologia dos hemócitos de *Diatraea saccharalis*, bem como o papel de cada um de seus tipos nas reações de defesa deste inseto. Trabalhos iniciais (GONÇALVES 1983; TOLEDO & GREGÓRIO, 1983a, 1983b; BARDUCO *et al.* 1988) identificaram morfologicamente sete tipos de hemócitos, a saber: prohemócito (PR), plasmatócito (PL), granulócito (GR), adipohemócito (AD), oenocitóide (OE), esferulócito (ES) e célula vermiforme (VE), em nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Posteriormente, BOMBONATO & GREGÓRIO (1995) e FALLEIROS (1995) confirmaram

estes dados iniciais, em estudos sistemáticos ao longo do desenvolvimento larval de *Diatraea saccharalis*.

Quanto à morfologia de órgãos/tecidos de *Diatraea saccharalis* em situação de parasitismo pela *Cotesia flavipes*, ou de inoculação com agentes abióticos, os trabalhos são escassos. CONTE & CRUZ-LANDIM (1993a, 1993b) analisaram a ultra-estrutura e a histoquímica do corpo gorduroso de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas por *Cotesia flavipes*, correlacionando as modificações das células do corpo gorduroso, órgão sintetizador e armazenador de substâncias metabolicamente ativas, com o desenvolvimento do parasitóide.

BOMBONATO (1994), estudando hemócitos de larvas controle e parasitadas por *Metagonistylum minense*, observou que o número total de hemócitos de insetos parasitados apresentou alterações, variáveis em função da idade do hospedeiro no momento do parasitismo, o que não afetou, entretanto, a eficiência do desenvolvimento do parasitóide. Posteriormente, BOMBONATO (1999) analisando os hemócitos de *Diatraea saccharalis* frente ao parasitismo pela vespa *Cotesia flavipes*, bem como frente à inoculação de diferentes materiais inertes, observou que não houve alterações na morfologia dos hemócitos presentes na hemolinfa destes insetos, em nível de microscopia de luz. Houve queda do número total de hemócitos circulantes durante o período experimental analisado, em larvas parasitadas ou inoculadas, indicando reação da broca da cana frente aos agentes invasores. Já a contagem diferencial dos hemócitos mostrou, em larvas parasitadas ou inoculadas com material inerte, flutuações semelhantes na população de diferentes tipos celulares (GR, ES, OE e VE), que diferiram do controle. Assim, o quadro hemocitário na vigência do parasitismo sugere que a broca da cana reage à presença do parasitóide como se estivesse encapsulando o invasor.

O estudo dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis*, em diferentes fases do parasitismo pela *Cotesia flavipes*, foi abordado em nosso trabalho de mestrado (NUNES, 2001). Observamos, através da análise morfológica ultra-estrutural e citoquímica dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis*, ao longo do parasitismo pela vespa *Cotesia flavipes*, que o desenvolvimento da larva de *Cotesia flavipes* na hemocele do inseto hospedeiro não desencadeou processo de adesão de hemócitos e/ou formação de cápsula ao redor do parasitóide. Porém, os diferentes tipos de hemócitos de *Diatraea saccharalis* evidenciaram alterações morfológicas ultra-estruturais específicas e importantes, ao longo do parasitismo. Assim, embora não houvesse reação efetiva de eliminação da larva do parasitóide pelos hemócitos do hospedeiro, os diferentes tipos de hemócitos de *Diatraea saccharalis*

evidenciaram alterações morfológicas ultra-estruturais, ao longo do parasitismo, as quais sugerem reação contra a presença do elemento estranho, a larva do parasitóide.

Entretanto, ficaram ainda perguntas a serem respondidas. Será que o inseto hospedeiro, na vigência do parasitismo pela *Cotesia flavipes*, conseguiria identificar e reagir contra um agente abiótico? Será que a introdução deste agente seria capaz de desencadear o sistema de defesa, teoricamente bloqueado pelo parasitóide, e assim torná-lo apto a eliminar o parasitóide? Teria o sistema de proPO e a produção de NO, papel importante nestes eventos?

Assim, poderia haver alterações morfológicas sub-celulares dos hemócitos de *Diatraea saccharalis* na vigência do parasitismo pela *Cotesia flavipes* e/ou inoculação de agente abiótico, não perceptíveis em nível de microscopia de luz, evidenciadas em análise ultra-estrutural; poderia também estar havendo alterações na ativação do sistema de proPO e produção de NO. Estas modificações poderiam contribuir para o entendimento da não reação do inseto hospedeiro ao parasitóide.

Nosso interesse neste trabalho, prende-se ao estudo das reações de defesa de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pela *Cotesia flavipes* e/ou inoculadas com agente abiótico (Sephadex), especialmente relacionadas com a ativação do sistema de proPO, com a produção de NO e com a reação de encapsulação do agente abiótico em larvas parasitadas.

OBJETIVOS

Considerando a lacuna existente na literatura quanto ao estudo das reações de defesa de larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas, parasitadas pela vespa *Cotesia flavipes* e/ou inoculadas com agente abiótico, propusemo-nos a:

- ◆ Analisar os níveis de ativação do sistema de proPO e os níveis de produção de NO, em larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas (em função da idade larval) e na vigência do parasitismo pela *Cotesia flavipes*.
- ◆ Analisar os níveis de ativação do sistema de proPO e os níveis de produção de NO, em larvas de *Diatraea saccharalis* após a inoculação de agente abiótico e concomitante ao parasitismo pela *Cotesia flavipes*.
- ◆ Observar se a introdução de um agente abiótico é capaz de desencadear os sistemas de defesa, particularmente o sistema de proPO e a produção de NO, teoricamente bloqueados pelo parasitóide, e se isto torna o hospedeiro apto a eliminar este parasitóide.
- ◆ Identificar o(s) tipo(s) de hemócito(s) responsável(is) pela produção da proPO e do NO.
- ◆ Observar em MET a encapsulação de agente abiótico (esferas de Sephadex) em larvas de *Diatraea saccharalis* na vigência do parasitismo pela *Cotesia flavipes*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DOS INSETOS

Tanto o inseto hospedeiro, a *Diatraea saccharalis*, como o inseto parasitóide, a *Cotesia flavipes*, foram fornecidos pelo Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande - Lençóis Paulista, SP, pelo Laboratório Entomológico Bionovo - Novo Horizonte, SP e pelo Laboratório Entomológico da Fazenda São Marcos - Ipiranga, SP.

1.1. *Diatraea saccharalis*

As larvas da *Diatraea saccharalis* foram cultivadas em tubos de vidro esterilizados, preenchidos parcialmente com dieta artificial semi-sólida (HENSLEY & HAMMOND, 1968), em câmara climatizada a 25-27°C e umidade relativa de 70±10% (MENDES, 1980). Cada tubo continha de 15 a 20 exemplares.

1.2. *Cotesia flavipes*

Fêmeas fertilizadas da vespa *Cotesia flavipes* foram colocadas, manualmente, para ovopositar na superfície dorsal de larvas de *Diatraea saccharalis* com 20 dias de desenvolvimento. As larvas parasitadas foram mantidas em placas de Petri (5 larvas por placa) contendo cubos de dieta artificial. Aproximadamente 10 dias após a inoculação, havia o rompimento do tegumento das larvas da *Diatraea saccharalis* e liberação de “massas” de parasitóides, os quais completavam o seu desenvolvimento fora do inseto hospedeiro. Após a emergência dos adultos, estes se cruzaram ao acaso, obtendo-se as fêmeas fertilizadas que foram utilizadas em nosso experimento.

2. INOCULAÇÃO EM LARVAS DE *Diatraea saccharalis*

Duas soluções foram utilizadas nos experimentos envolvendo a inoculação da *Diatraea saccharalis*:

a) Solução salina para inseto (SSI): 1,80g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16g de CaCl e 0,004g de NaHCO₃ para 100ml de água destilada.

b) Sephadex em SSI (**Sephadex**): esferas de Sephadex G-200-120 (Sigma®), com diâmetro variando de 40 a 120µm, foram suspensas em SSI na concentração de 0,1mg/ml de solução.

As soluções foram inoculadas na hemocele das larvas de *Diatraea saccharalis*, com auxílio de seringas para insulina e sob lupa estereoscópica. Foram inoculados 20µl de solução na superfície dorsal das larvas, próximo à porção cefálica, nos primeiros segmentos torácicos

(DAVIES *et al.*, 1987). As larvas inoculadas foram mantidas em placas de Petri (5 larvas por placa) contendo dieta artificial.

2.1. GRUPOS E SUBGRUPOS EXPERIMENTAIS DE *Diatraea saccharalis*

Os grupos experimentais de *Diatraea saccharalis* utilizados foram:

- 1) **Grupo C** = larvas controle total;
- 2) **Grupo S** = larvas controle injetadas com SSI;
- 3) **Grupo Se** = larvas injetadas com Sephadex;
- 4) **Grupo P** = larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes*;
- 5) **Grupo P+S** = larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* e concomitantemente injetadas com SSI;
- 6) **Grupo P+Se** = larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* e concomitantemente injetadas com Sephadex.

O Grupo C foi dividido em 3 subgrupos (larvas de *Diatraea saccharalis* de 20, 23 e 26 dias de desenvolvimento), que correspondem aos controles dos períodos **inicial** e **recente** (20 dias), **intermediário** (23 dias) e **tardio** (26 dias) de parasitismo/inoculação. Para cada experimento com parasitismo/inoculação, foi repetido o seu respectivo controle.

Além disso, os Grupos S, Se, P, P+S, e P+Se foram divididos em outros 4 subgrupos, referentes aos tempos de inoculação/parasitismo (**inicial**: 2 h; **recente**: 6 h; **intermediário**: 3 dias; e **tardio**: 6 dias).

Para melhor entendimento, o quadro abaixo mostra os grupos e subgrupos experimentais de insetos e os tempos de coleta de hemolinfa:

| | | GRUPOS | | | | | |
|-----------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | C | S | Se | P | P+S | P+Se |
| SUBGRUPOS | 20 dias | | 2 horas | 2 horas | 2 horas | 2 horas | 2 horas |
| | 23 dias | | 6 horas | 6 horas | 6 horas | 6 horas | 6 horas |
| | 26 dias | | 3 dias | 3 dias | 3 dias | 3 dias | 3 dias |
| | 26 dias | | 6 dias | 6 dias | 6 dias | 6 dias | 6 dias |

Quadro 1 - Demonstrativo dos grupos e subgrupos experimentais de *Diatraea saccharalis* e os tempos de coleta da hemolinfa. C (controle); S (SSI - solução salina para inseto); SE (Sephadex); P (parasitada); P+S (parasitada e inoculada com SSI); P+Se (parasitada e inoculada com Sephadex).

3. COLETA DA HEMOLINFA

As larvas foram submetidas a resfriamento a 0 °C durante 5 min, para facilitar a sua manipulação. A hemolinfa foi retirada com o auxílio de pipeta Pasteur, através de punção abdominal, e colocada diretamente em tubos Eppendorf, sendo então processada conforme a recomendação das técnicas aplicadas.

4. EFEITO DO PARASITISMO E/OU AGENTE ABIÓTICO NO SISTEMA DE proPO

4.1. ATIVAÇÃO *in vitro* DO SISTEMA DE proPO EM HEMOLINFA TOTAL

Para este experimento, os grupos experimentais de *Diatraea saccharalis* e os tempos de coleta utilizados foram os mencionados no item 2.1 e exemplificados no Quadro 1.

A análise de ativação de proPO foi realizada segundo o método de GREGÓRIO & RATCLIFFE (1991b), adaptado às nossas peculiaridades, relatadas a seguir.

Inicialmente o tampão utilizado foi o CacS-360 (10mM cacodialto de sódio; 10mM CaCl₂; 280mM sacarose pH 7,4; osmolaridade de 360mOsmKg⁻¹), como proposto por GREGÓRIO & RATCLIFFE (1991b). Entretanto, como o material ficou imediatamente melanizado independente do grupo de insetos, testamos diferentes concentrações de Ca⁺² para esta solução, 1mM; 2,5mM e 5mM de CaCl₂, sempre com os mesmos resultados insatisfatórios. Testamos posteriormente o tampão TBS (50mM Tris base, 1mM NaCl e 1M HCl para ajustar o pH em 7,4 e NaCl para ajustar a osmolaridade em 360mOsmKg⁻¹) com diferentes concentrações de Ca⁺²: 1mM; 2,5mM; 5mM e 10mM de CaCl₂. O melhor resultado obtido foi com o TBS com Ca⁺² na concentração de 2,5mM.

Como possíveis ativadores do sistema de proPO utilizamos as soluções de tripsina e laminarina, preparadas em tampão TBS na concentração de 1mg/ml⁻¹, imediatamente antes de seu uso. O substrato da PO, a L-DOPA (L-β-3,4-dihidroxifenilalanina), foi preparado como solução saturada (4g/ml) também em tampão TBS, e estocado em alíquotas congeladas.

De cada grupo experimental, aproximadamente 60μl de hemolinfa foi coletada e colocada em microtubos de polipropileno contendo 200μl de tampão TBS, mantida a 4°C e usada imediatamente sem outro tratamento. A concentração de proteínas desta hemolinfa total diluída foi estimada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A leitura das amostras, para a determinação da quantidade de proteína total da hemolinfa, foi feita em espectrofotômetro Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec

2000, com filtro de 595nm.

A ativação da proPO da hemolinfa total foi determinada através de misturas reativas preparadas em placas com 96 poços de fundo chato. As misturas reativas continham: 30µl de tripsina (tipo III, de pâncreas bovino, EC 3.4.21.4; 11.600 unidades mg⁻¹ - Sigma®), ou 30µl de laminarina (de *Laminaria digitata*), ou 30µl de tampão TBS + 30µl de substrato L-DOPA + 10µl de hemolinfa, perfazendo o volume total de 70µl.

O nível de formação de produto (dopacromo/melanina) foi avaliado através de leitura a A₄₉₂ em analisador para teste de ELISA, modelo 550 da Bio-rad. Inicialmente, estas leituras foram realizadas em diferentes tempos após a adição de hemolinfa, a saber, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 6 h. Com base na cinética da ativação do sistema de proPO, o tempo de leitura escolhido foi de 2 h.

A ativação da PO foi expressa em unidades onde:

$$1 \text{ U}' = 1 \Delta A_{492} \text{ mg}^{-1} \text{ de proteína}$$

Os experimentos foram realizados em triplicatas, em períodos diferentes, tomando-se o cuidado de utilizar pelo menos 5 insetos/grupo/tempo experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para experimentos inteiramente casualizados, e as médias comparadas através de teste de Tukey, com nível de significância $\alpha = 0,05$.

4.2. DETECÇÃO *in vitro* DE PO EM MONOCAMADA DE HEMÓCITOS

Para a identificação do tipo de hemócito que continha a PO, utilizamos hemolinfa de larvas controle com 23 dias de desenvolvimento e de larvas com parasitismo de 3 e 6 dias. A técnica utilizada foi baseada em estudos de SÖDERHÄLL & SMITH (1983), adaptada segundo as nossas peculiaridades. As fixações e incubações foram realizadas à temperatura ambiente. Como substrato para a PO, foi utilizado solução saturada (4g/l) de L-DOPA.

A preparação da monocamada de hemócitos foi realizada sobre lâmina recoberta com poli-L-lisina a 0,1% em água, por gotejamento da hemolinfa; o tempo de adesão dos hemócitos utilizado foi de 5 min (FALLEIROS, 1995). Após lavagem com tampão TCS (cacodilato de sódio 0,01M, CaCl₂ 5mM e MgCl₂ 50mM, pH 7,0; com osmolaridade 342mOsmKg⁻¹), a preparação foi fixada em glutaraldeído 1,5% em tampão TCS por 5 min, e incubada em solução saturada de L-DOPA por 60 min; foi lavada em tampão, refixada em glutaraldeído 2,5% em tampão TCS por 30 min, montada em meio de gelatina a 4% em tampão TCS e observada ao microscópio de luz.

Como a PO deve estar presente na forma de proPO, alternativamente foi utilizada a incubação da monocamada de hemócitos por 10 min em solução de tripsina, para efetuar a sua ativação e possível detecção, antes da incubação com o substrato. A tripsina (tipo III, de pâncreas bovino, 11.600 unidades mg^{-1} - Sigma®), foi preparada em tampão TCS, na concentração de 1 mg/ml.

Na padronização da técnica, efetuamos testes variando os seguintes parâmetros:

1) Tipo e osmolaridade do tampão: a hemolinfa da *Diatraea saccharalis* tem uma osmolaridade de 360mOsmKg^{-1} . Utilizamos um tampão CacS-380 (cacodilato de sódio 10mM, CaCl_2 10mM e sacarose 280mM) com a osmolaridade ligeiramente acima da hemolinfa do nosso inseto, segundo FALLEIROS (1995). Alternativamente utilizamos o tampão TCS com osmolaridade de 342mOsmKg^{-1} .

2) Cobertura da lâmina com poli-L-lisina: utilizamos lâmina recoberta com poli-L-lisina ainda úmida ou estando completamente seca; variamos também o tempo de exposição da lâmina a poli-L-lisina (5, 10, 20 e 30 min).

3) Diluição da hemolinfa: a gota de hemolinfa posta na lâmina foi usada pura ou diluída (1:1 ou 1:4) em tampão.

4) Tempo de adesão dos hemócitos nas lâminas: 5, 10 e 15 min.

5) Fixação da monocamada: os tempos de fixação em glutaraldeído testados foram 5, 10, 15, 25, 30 e 45 min. As concentrações testadas do fixador foram: 1; 1,25; 1,5 e 2,5%.

6) Tempo de ativação e tipo de tripsina: quando esta foi utilizada, a monocamada foi incubada com a tripsina por 10 ou 15 min; por vezes a tripsina foi utilizada junto com a solução do substrato L-Dopa, que também teve sua concentração variando de 1mg/ml para 0,5mg/ml. Utilizamos a tripsina de bovino, proposta por GREGÓRIO & RATCLIFFE (1991b) e FALLEIROS (1995), e alternativamente a de suíno.

7) Tempo de incubação com substrato L-Dopa: variamos de 15, 30, 45 e 60 min.

8) Tempo de refixação do material em glutaraldeído: variamos em 30 e 60 min.

Os diversos testes foram feitos com estas variações em diferentes combinações, como mostrados nos Resultados.

5. EFEITO DO PARASITISMO E DE AGENTE ABIÓTICO NA FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

5.1. DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de NO na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* foi determinada pelo método colorimétrico, baseado na reação de Greiss (GREEN *et al.*, 1981). Foram realizadas comparações do teor do íon nitrito (NO_2^-) nas amostras de hemolinfa de insetos dos grupos experimentais descritos anteriormente no item 2.1 e exemplificados no Quadro 1.

Nos diferentes grupos cada ensaio foi repetido 12 vezes, e para cada ensaio utilizamos um “pool” de hemolinfa de 4 larvas, perfazendo cerca de 100 μl de hemolinfa, coletada diretamente em tubos de polipropileno e congelada (-20°C) até sua utilização.

O teor de NO_2^- foi determinado em placas de 96 poços de fundo chato, através da mistura de 33 μl de hemolinfa + 66 μl de água destilada (1:3) + 100 μl de reagente de Greiss [50 μl de NEED 0,1% (dihidroclorito de naftilenoamina, Sigma, St. Louis, MO) + 50 μl de sulfanilamida 1%, em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5%]. As soluções foram utilizadas imediatamente após sua retirada do refrigerador (4°C). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a densidade óptica das misturas reativas foi lida em analisador para teste de ELISA com filtro 540nm (Metertech Inc, modelo 960). Para a análise quantitativa das amostras, uma curva padrão com nitrito de sódio (NaNO_2) foi construída em cada placa de amostra, com concentrações variando entre 1,6 e 200 μM . O teor de NO_2^- das amostras experimentais foi correlacionado aos valores de absorbância obtidos na curva padrão. As análises estatísticas utilizadas para verificar se houve diferença significativa entre os grupos foram os testes *t* de Student e o ANOVA ($P < 0,05$).

5.2. LOCALIZAÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Para a localização do tipo de hemócito que continha o NO utilizamos hemolinfa de larvas controle (Grupo C - 20 23 e 26 dias de desenvolvimento) e de larvas parasitadas (Grupo P - parasitadas após 2 e 6 h, 3 e 6 dias). Cerca de 25 μl de hemolinfa de cada inseto/grupo/tempo experimental foi coletada diretamente em tubos de polipropileno contendo 50 μl de solução de sulfanilamida 1%, em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5%, à temperatura ambiente. Após 15 min, 50 μl de NEED 0,1% foi adicionado à mistura, aguardando-se mais 15 min de incubação. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota de cada amostra foi transferida para uma lâmina. As lâminas foram cobertas com lamínulas, observadas e fotografadas.

6. EFEITO DO PARASITISMO NA CAPACIDADE *in vivo* DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO

Para este experimento, os grupos experimentais de insetos utilizados foram:

Grupo Se = larvas injetadas com Sephadex;

Grupo P+Se = larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* e concomitantemente injetadas com Sephadex.

6.1. IMPLANTAÇÃO DO MATERIAL ABIÓTICO

As larvas de *Diatraea saccharalis* foram implantadas com agente abiótico (esferas de Sephadex) segundo o item 2.

6.2. RECUPERAÇÃO E PROCESSAMENTO DO AGENTE ABIÓTICO

A recuperação das esferas de Sephadex foi realizada nos seguintes tempos pós-inoculação: 2 h, 6 h e 12 h, e ainda 1, 2, 3, 6 e 10 dias.

Para facilitar a visualização das esferas na hemocele do inseto, houve uma tentativa de corá-las antes da inoculação, em solução aquosa de vermelho Congo por 24 h ou azul de Coomassie por 1 h, ambas a 0,1%, segundo TANAKA (1987b); em ambas tentativas não obtivemos resultados satisfatórios. Utilizamos ainda como técnica alternativa para corar as esferas, vários tipos de corantes: Azul Tripán (1%), Hematoxilina (0,5%), Sudan Black (0,7%), Fast Green (1%), Azul de Metileno (0,1%), Azul de Toluidina (0,1%) e Tinta da China (0,1%), como também realizamos testes com corantes fluorescentes, tais como DAPI, a Cromomicina e a Fluoresceína; todos sem resultados satisfatórios.

Para a recuperação dos materiais inertes inoculados, as larvas de *Diatraea saccharalis* foram dissecadas sob lupa estereoscópica, através da abertura da cavidade abdominal. Os materiais inoculados, quando visualizados na hemocele, foram gotejados com solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Os materiais coletados foram transferidos para recipientes de vidro contendo solução fixadora.

As esferas de Sephadex, nos tempos iniciais de inoculação (2 h, 6 h, 12 h e 1 dia), quando não eram perceptíveis sob a lupa, foram "recuperadas" com pipeta Pasteur, juntamente com a hemolinfa. Este material foi então centrifugado a 6500rpm por 2 min; o sedimento foi colocado em solução fixadora e processado para microscopia eletrônica de transmissão (MET). As esferas de Sephadex recuperadas da hemocele de larvas de *Diatraea saccharalis* também foram analisadas através da MET.

6.3. PREPARO DO MATERIAL PARA MET

O material foi deixado em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,3) por até 24 h, lavado em tampão fosfato e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h. A seguir o material foi lavado em água destilada e contrastado em bloco com acetato de uranila 0,5% em água destilada por 1 h. A desidratação foi realizada em série crescente de soluções de acetona, e a infiltração em mistura de Araldite[®] e acetona (1:1) por 12 h, sendo a inclusão feita em Araldite[®] puro. Os cortes semi-finos, obtidos dos blocos, foram corados com uma mistura de azul de metileno 1% com azur II 1% em bórax 1% (1:1) e examinados ao microscópio de luz para seleção de blocos com material de interesse. Dos blocos selecionados foram obtidos cortes ultrafinos, que foram contrastados com solução alcoólica saturada de acetato de uranila e posteriormente com citrato de chumbo. Os materiais foram analisados e fotografados ao MET, modelo CM-100 (Philips).

RESULTADOS

1. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA ATIVAÇÃO *in vitro* DO SISTEMA DE PROFENOLOXIDASE (proPO)

1.1. CINÉTICA DA REAÇÃO DE ATIVAÇÃO DE proPO EM LARVAS NÃO PARASITADAS E DEFINIÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO

Os Gráficos de 1 a 7 referem-se aos resultados obtidos para a ativação do sistema de proPO em misturas reativas dos diversos grupos experimentais, após 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 6 h a partir da adição de hemolinfa. Em todos os grupos foi observado um aumento na ativação do sistema de proPO, proporcional ao tempo de leitura. Entretanto, o Gráfico 3 demonstra que a hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* inoculadas com agente abiótico (Sephadex) obteve uma ativação acima da capacidade de leitura do equipamento, após 2 h de incubação. Isto nos fez definir o tempo de leitura em 2 h para os experimentos posteriores.

Em hemolinfa de larvas do grupo controle (Grupo C) existiu uma crescente ativação espontânea do sistema de proPO, conforme o tempo de incubação das misturas reativas (Gráfico 1), em hemolinfa de larvas com 20 e 26 dias de desenvolvimento. Em larvas com 23 dias, porém, ela foi muito reduzida. A adição de tripsina à mistura reativa potencializou a ativação do sistema de proPO das larvas, independente do tempo de desenvolvimento do inseto, sendo menos pronunciada em larvas de 26 dias.

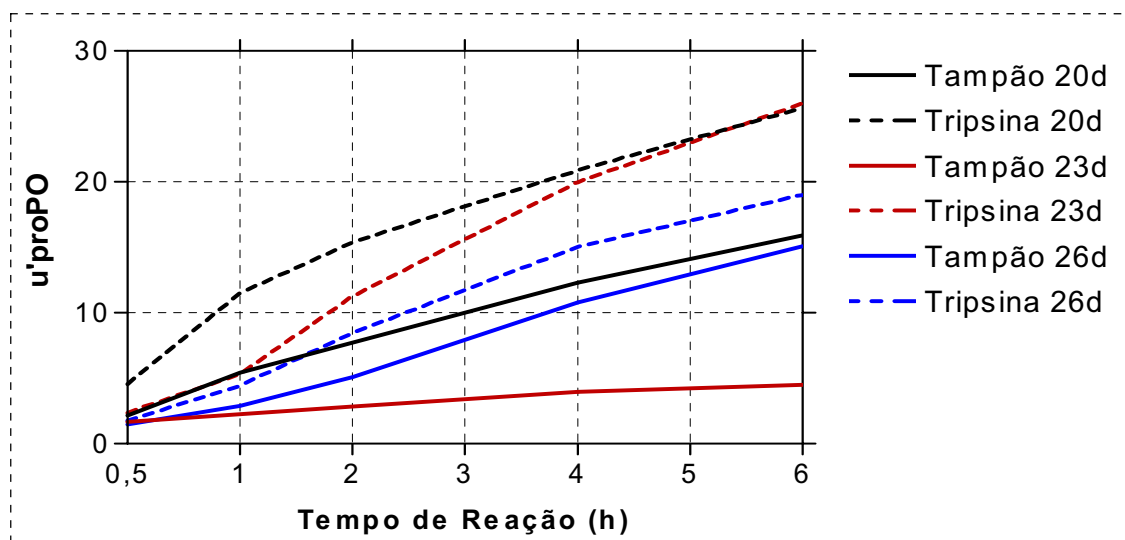


Gráfico 1 – Ativação de proPO em função do tempo de reação em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas/inoculadas (**Grupo C**), com 20, 23 e 26 dias de desenvolvimento, sem ativador (Tampão) e na presença de tripsina (Tripsina).

Conforme o Gráfico 2, a hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo S) em tempo inicial (2 h) e recente (6 h), mostrou uma ativação do sistema de proPO pela tripsina, mais pronunciada ao longo da incubação do que a hemolinfa de larvas nos tempos intermediário (3 dias) e tardio (6 dias).

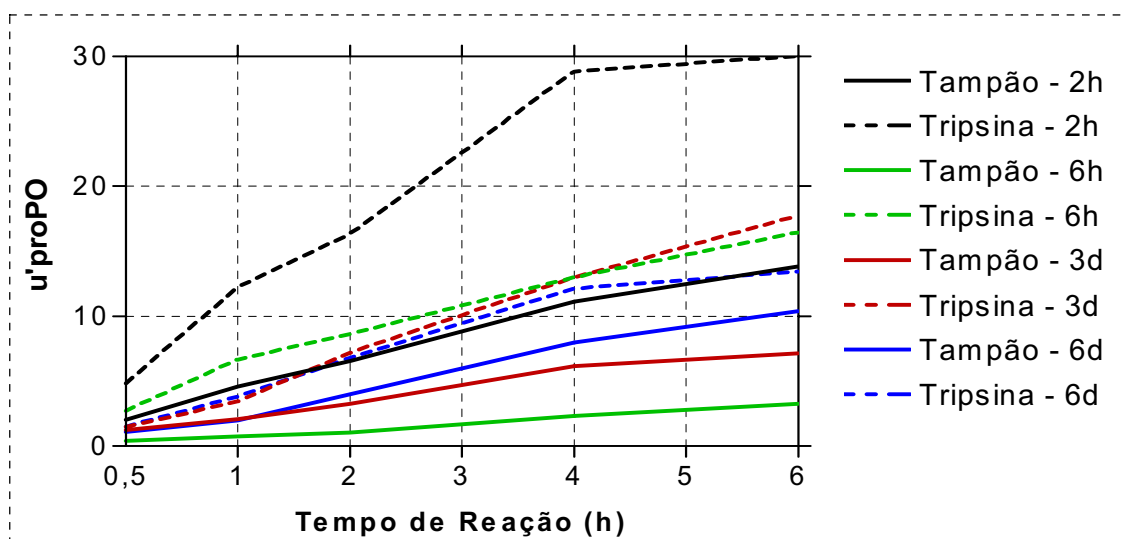


Gráfico 2 – Ativação de proPO em função do tempo de reação, na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo S**) após 2 h, 6 h, 3 dias e 6 dias da inoculação de SSI, sem ativador e na presença de tripsina.

A hemolinfa de larvas não parasitadas e inoculadas com agente abiótico (Sephadex - Grupo Se; Gráfico 3) exibiu reduzida ativação espontânea do sistema de proPO, em tempos de inoculação inicial (2 h), recente (6 h) e intermediário (3 dias). O sistema de proPO em tempos inicial (2 h) e recente (6 h) foi bastante potencializado pela adição de tripsina, e de forma mais branda no tempo intermediário (3 dias). Já na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* em tempo tardio de inoculação (6 dias) a ativação foi tão intensa que impossibilitou a leitura das amostras reativas (após 4 h na ativação espontânea e 2 h na ativada pela tripsina).

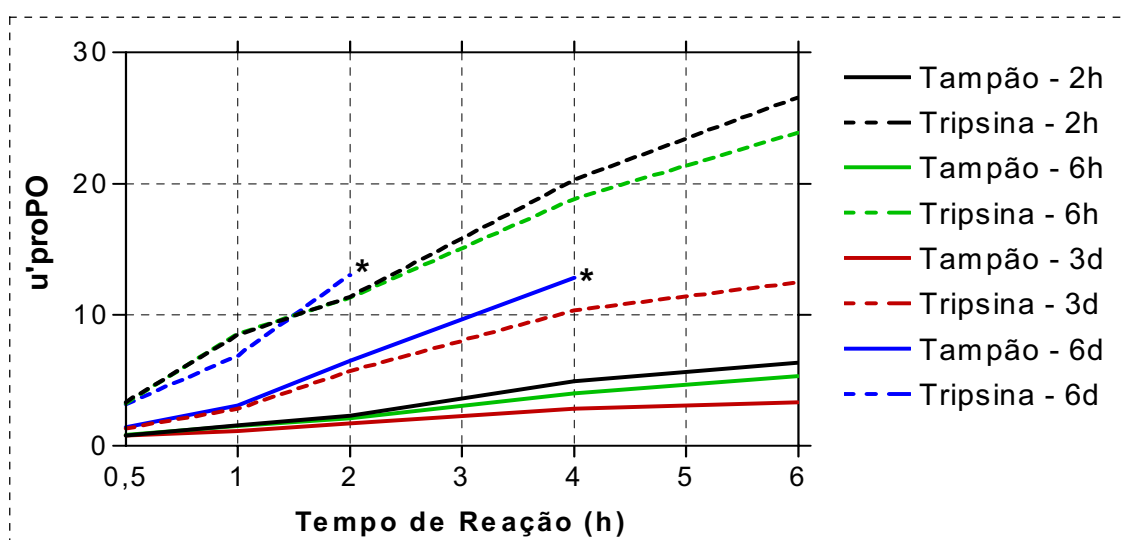


Gráfico 3 – Ativação de proPO em função do tempo de reação, na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo Se**) após 2 h, 6 h, 3 dias e 6 dias da inoculação de Sephadex, sem ativador e na presença de tripsina. (*) Registro de leitura acima da capacidade do equipamento.

1.2. CINÉTICA DA REAÇÃO DE ATIVAÇÃO DA proPO EM LARVAS PARASITADAS PELA *Cotesia flavipes*

A ativação do sistema de proPO ao longo da incubação das misturas reativas foi muito semelhante entre os insetos parasitados (Grupo P), parasitados e inoculados com SSI (Grupo P+S) e parasitados e inoculados com Sephadex (Grupo P+Se), em tempo inicial de parasitismo/inoculação (2 h), tanto na ativação espontânea como na induzida por tripsina. Porém, a adição do ativador tripsina fez com que o sistema de proPO fosse bastante potencializado nos três grupos experimentais (Gráfico 4).

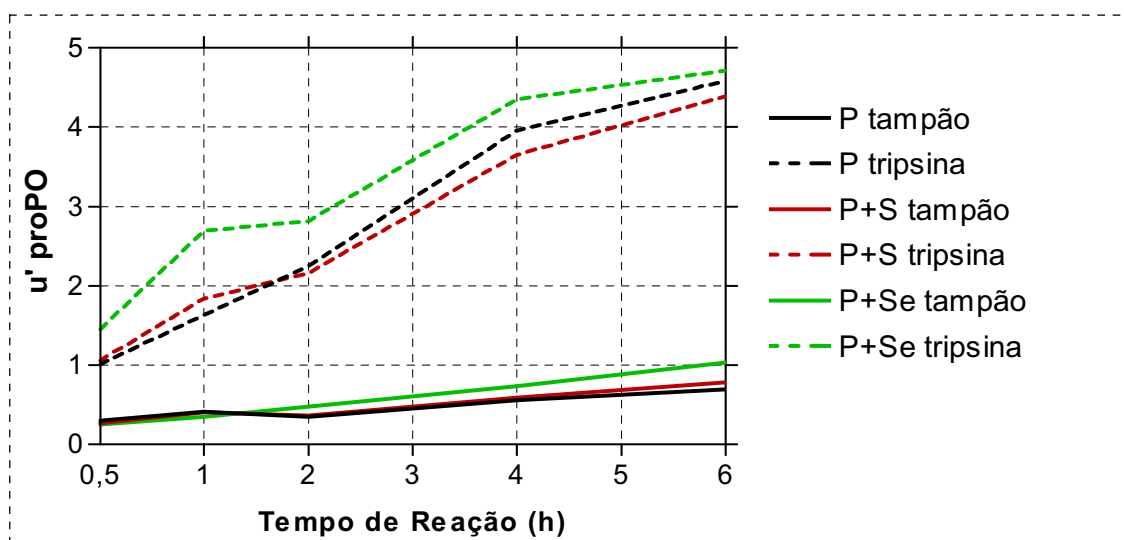


Gráfico 4 – Ativação de proPO em função do tempo de reação, após 2 h de parasitismo/inoculação, na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* parasitadas pela *C. flavipes* (**Grupo P**), parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo P+S**) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo P+Se**), sem ativador (tampão) e na presença de tripsina (tripsina).

Após 6 h de parasitismo/inoculação (Gráfico 5) a ativação espontânea do sistema de proPO foi menor no grupo de insetos somente parasitados (Grupo P). Comparativamente, no grupo de insetos parasitados e inoculados com SSI (Grupo P+S) o nível de ativação foi maior, e no grupo de insetos parasitados e inoculados com Sephadex (Grupo P+Se) o nível de ativação espontânea foi ainda maior. Nos três grupos (Grupos P, P+S e P+Se), a adição do ativador (tripsina) potencializou a ativação do sistema de proPO na hemolinfa dos insetos analisados.

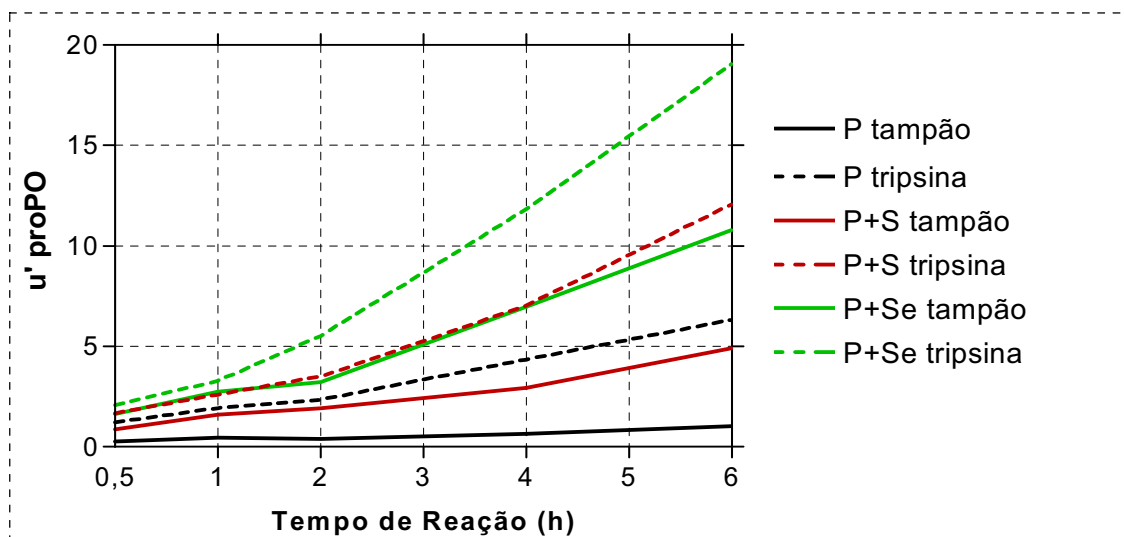


Gráfico 5 – Ativação de proPO em função do tempo de reação, após 6 h de inoculação, na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* parasitadas pela *C. flavipes* (**Grupo P**), parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo P+S**) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo P+Se**), sem ativador (tampão) e na presença de tripsina (tripsina).

Após 3 dias de parasitismo/inoculação (Gráfico 6) os níveis de ativação do sistema de proPO, na ativação espontânea, foram semelhantes em todos os grupos experimentais. Com a adição da tripsina houve aumento dos níveis de ativação, sendo bastante evidente para o grupo de insetos somente parasitados pela *Cotesia flavipes* (Grupo P).

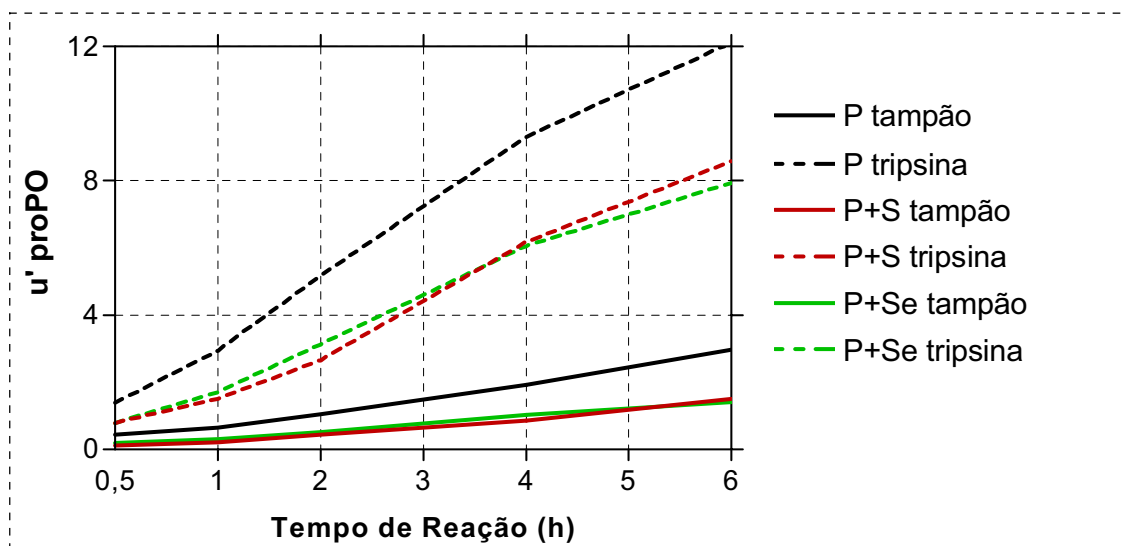


Gráfico 6 – Ativação de proPO em função do tempo de reação, após 3 dias de inoculação, na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* parasitadas pela *C. flavipes* (**Grupo P**), parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo P+S**) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo P+Se**), sem ativador (tampão) e na presença de tripsina (tripsina).

Após 6 dias de parasitismo/inoculação (Gráfico 7) os níveis de ativação do sistema de proPO, na ativação espontânea, foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais. Com a adição da tripsina o aumento dos níveis de ativação seguiu o mesmo padrão. A inoculação de SSI (Grupo P+S) proporcionou um aumento maior dos níveis de ativação do sistema de proPO, para este período.

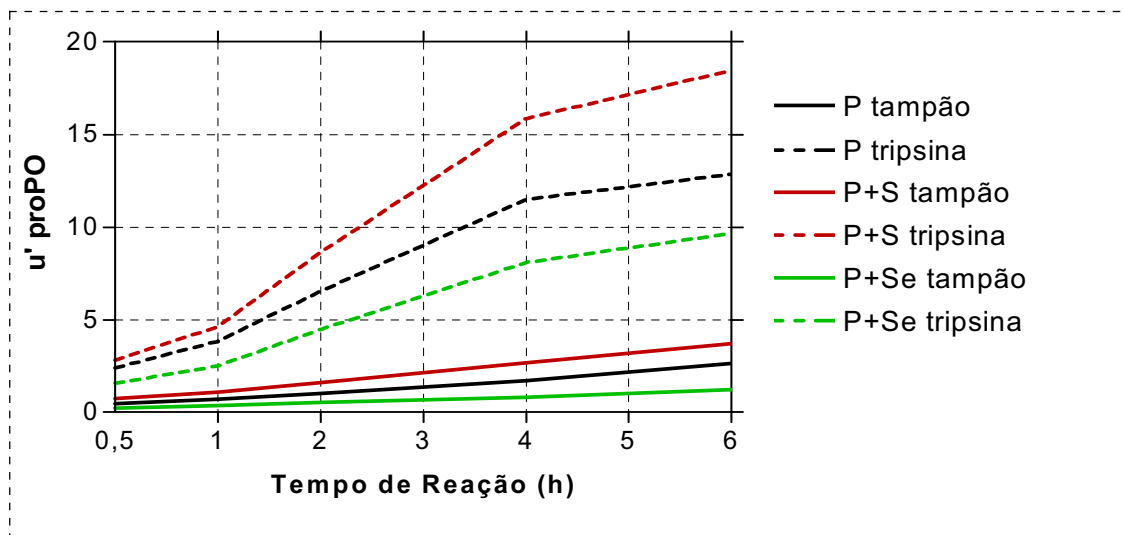


Gráfico 7 - Ativação de proPO em função do tempo de reação, após **6 dias** de inoculação, na hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* parasitadas pela *C. flavipes* (**Grupo P**), parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo P+S**) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo P+Se**), sem ativador (tampão) e na presença de tripsina (tripsina).

1.3. EFEITO DA LAMINARINA NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE proPO

A ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis*, parasitadas ou não pela *Cotesia flavipes*, na vigência de inoculação de SSI ou de agente abiótico (Grupos C, S, Se, P, P+S, P+Se), não mostrou diferença significativa após 2 h de incubação entre as misturas reativas com tampão ou laminarina, como mostra o Gráfico 8. Esta foi a razão pela qual não utilizamos a laminarina nos experimentos subsequentes.

Em todas as comparações estatísticas foram utilizados os métodos ANOVA e Tukey. As simbologias (***) , (**), (*) e (ns) correspondem aos resultados onde $P < 0.001$ (muito significativo), $P < 0.01$ (significativo), $P < 0.05$ (pouco significativo) e $P > 0.05$ (não significativo), respectivamente.

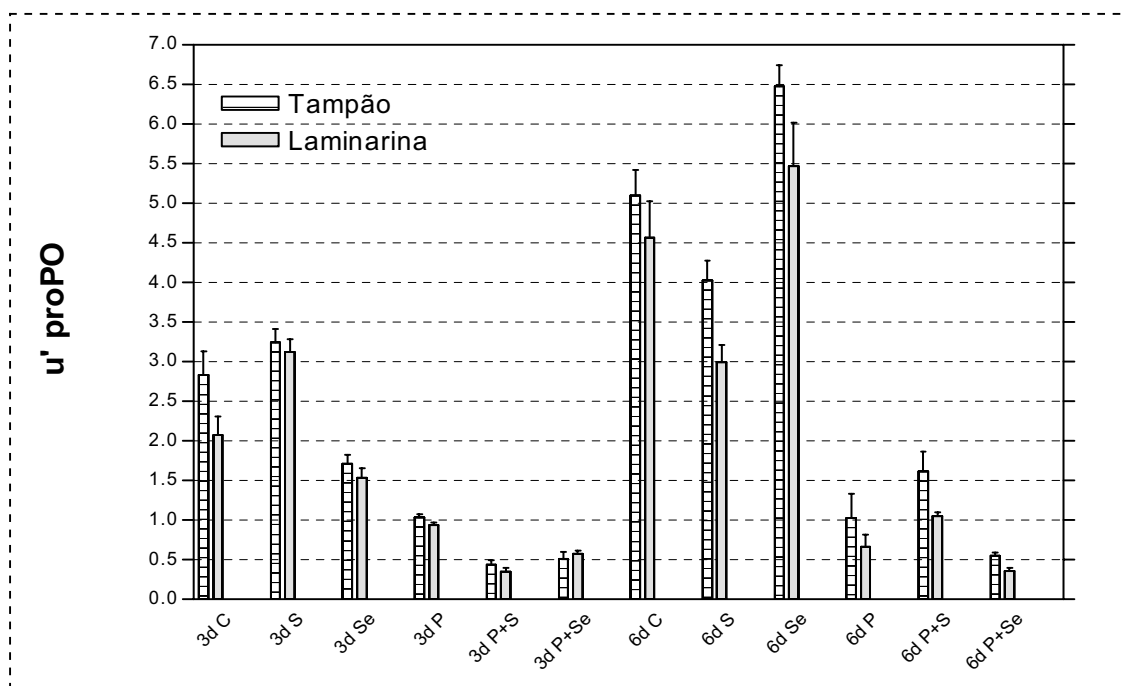


Gráfico 8 – Ativação do sistema de proPO após 3 e 6 dias da inoculação em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e parasitadas, inoculadas com SSI ou Sephadex, na presença de tampão ou laminarina, após 2 h de reação.

| Comparações (ANOVA) | Diferenças | q | P | |
|--------------------------------------|------------|-------|--------|----|
| 3d Grupo C/TA vs 3d Grupo C/LA | 0.8486 | 2.882 | P>0.05 | ns |
| 3d Grupo S/TA vs 3d Grupo S/LA | 0.1261 | 0.409 | P>0.05 | ns |
| 3d Grupo Se/TA vs 3d Grupo Se/LA | 0.1721 | 0.661 | P>0.05 | ns |
| 3d Grupo P/TA vs 3d Grupo P/LA | 0.0980 | 0.297 | P>0.05 | ns |
| 3d Grupo P+S/TA vs 3d Grupo P+S/LA | 0.1032 | 0.422 | P>0.05 | ns |
| 3d Grupo P+Se/TA vs 3d Grupo P+Se/LA | 0.0607 | 0.213 | P>0.05 | ns |
| 6d Grupo C/TA vs 6d Grupo C/LA | 0.6938 | 2.721 | P>0.05 | ns |
| 6d Grupo S/TA vs 6d Grupo S/LA | 0.9090 | 3.088 | P>0.05 | ns |
| 6d Grupo Se/TA vs 6d Grupo Se/LA | 0.8230 | 3.228 | P>0.05 | ns |
| 6d Grupo P/TA vs 6d Grupo P/LA | 0.3593 | 1.092 | P>0.05 | ns |
| 6d Grupo P+S/TA vs 6d Grupo P+S/LA | 0.5650 | 1.716 | P>0.05 | ns |
| 6d Grupo P+Se/TA vs 6d Grupo P+Se/LA | 0.1874 | 0.767 | P>0.05 | ns |

Tabela 1 – Comparação entre os experimentos realizados com o uso de Tampão e Laminarina.

1.4. ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE proPO EM FUNÇÃO DA IDADE DA LARVA DE *Diatraea saccharalis*

Foi observada uma redução significativa dos níveis de ativação espontânea (tampão) e induzida (tripsina) de proPO nas larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas/inoculadas (Grupo C), em função do desenvolvimento das larvas de 20 a 26 dias (Gráfico 9).

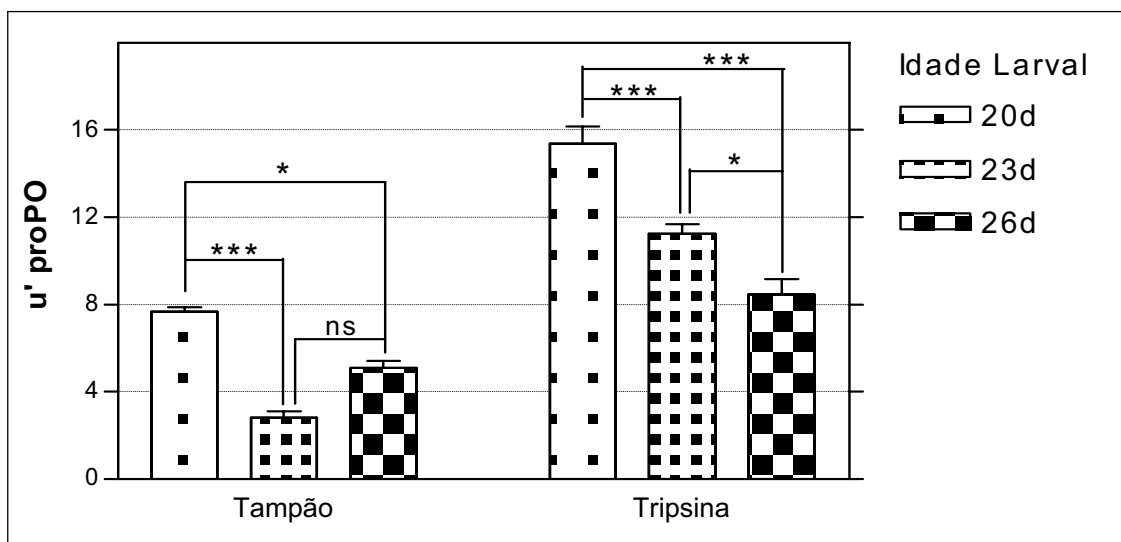


Gráfico 9 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas/inoculadas (Grupo C), em insetos com 20, 23 e 26 dias de desenvolvimento, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); * ($P < 0,05$ – pouco significativo); ns ($P > 0,05$ – não significativo).

1.5. EFEITO DO PARASITISMO NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE proPO

O Gráfico 10 mostra que houve uma diminuição significativa na ativação espontânea do sistema de proPO em todos os tempos de inoculação (inicial, recente, intermediário e tardio), na hemolinfa de larvas parasitadas (Grupo P) em relação aos seus respectivos grupo controle (Grupo C). Na presença do ativador tripsina, houve também uma redução significativa da ativação do sistema de proPO em todos os tempos experimentais, exceto para o grupo de parasitismo tardio (6 dias), em relação ao seu grupo controle.

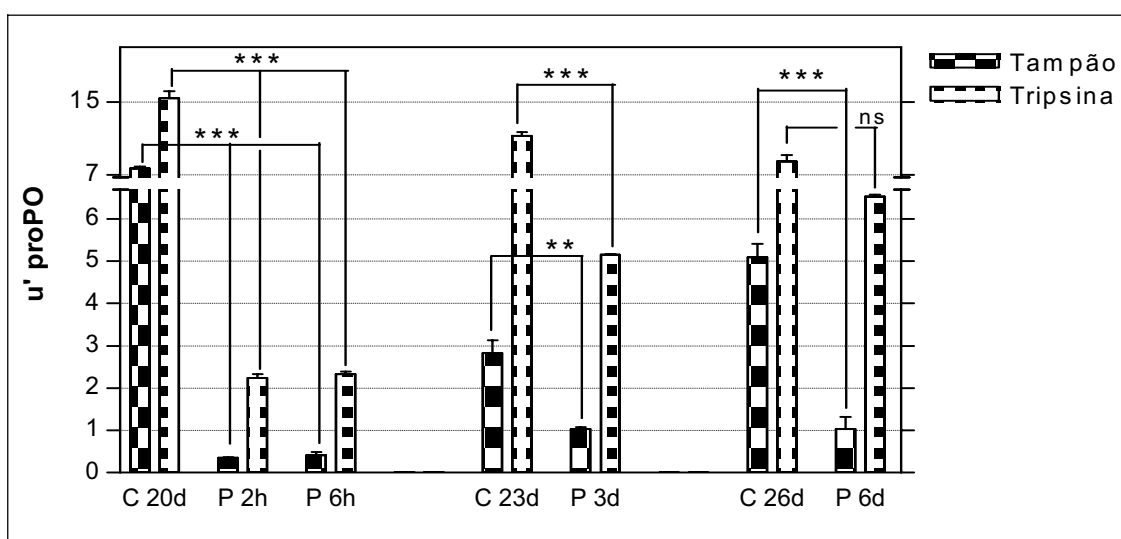


Gráfico 10 – Ativação do sistema proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas/inoculadas (Grupo C) e larvas parasitadas pela *C. flavipes* (Grupo P) por 2 h e 6 h, 3 e 6 dias sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo); ns ($P > 0,05$ – não significativo).

1.6. EFEITO DO VEÍCULO DE INOCULAÇÃO E DO AGENTE ABIÓTICO NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE proPO

Com a finalidade de melhor analisarmos os efeitos da inoculação de Sephadex, que utiliza a SSI como veículo, devemos inicialmente observar o efeito da inoculação de SSI na ativação do sistema de proPO. Assim, no Gráfico 11 temos os resultados do Grupo S em comparação ao seu respectivo controle (Grupo C).

A inoculação de SSI produziu uma diminuição significativa na ativação espontânea do sistema de proPO, na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* em tempos inicial (2 h) e recente (6 h), em relação ao seu respectivo controle. Já na presença de ativador, não houve diferença significativa na ativação após 2 h de inoculação; porém, houve uma diminuição significativa em tempo recente (6 h). Em tempo intermediário (3 dias) houve diminuição significativa da ativação de proPO somente na presença do ativador (tripsina), e em tempo tardio (6 dias) esta diminuição foi significativa tanto na ativação espontânea como na induzida.

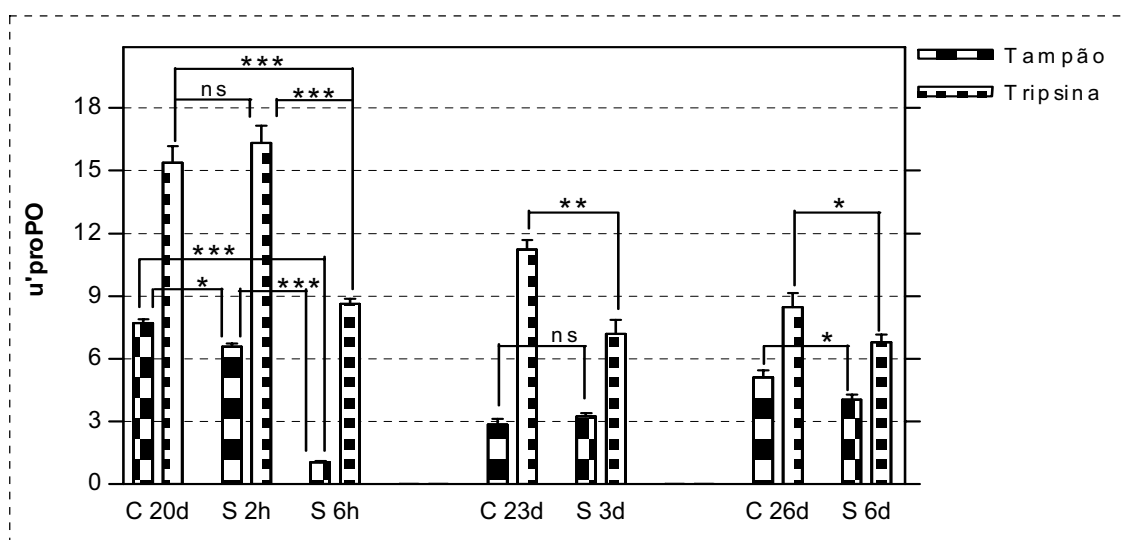


Gráfico 11 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas/inoculadas (**Grupo C**) e larvas inoculadas com SSI (**Grupo S**) por 2 h e 6 h, 3 e 6 dias, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo); * ($P < 0,05$ – pouco significativo); ns ($P > 0,05$ – não significativo).

O Gráfico 12 mostra os resultados obtidos a partir da comparação de hemolinfa de larvas inoculadas com SSI (Grupo S) com hemolinfa de larvas inoculadas com Sephadex (Grupo Se). Observamos que a presença do agente abiótico induziu uma inibição significativa na ativação do sistema de proPO em hemolinfa de insetos após inoculação recente (2 h), seja em ativação espontânea (tampão) ou na presença de ativador (tripsina). Já nos insetos do grupo de inoculação recente (6 h), houve um aumento significativo na ativação do sistema de proPO, tanto espontaneamente como induzida pela tripsina. Em inoculação recente (3 dias) apenas a ativação espontânea foi significativamente inibida nos insetos inoculados com Sephadex. Por fim, em inoculação tardia (6 dias) houve uma nova reversão, com ativação muito significativa do sistema de proPO, espontânea e induzida, no Grupo Se.

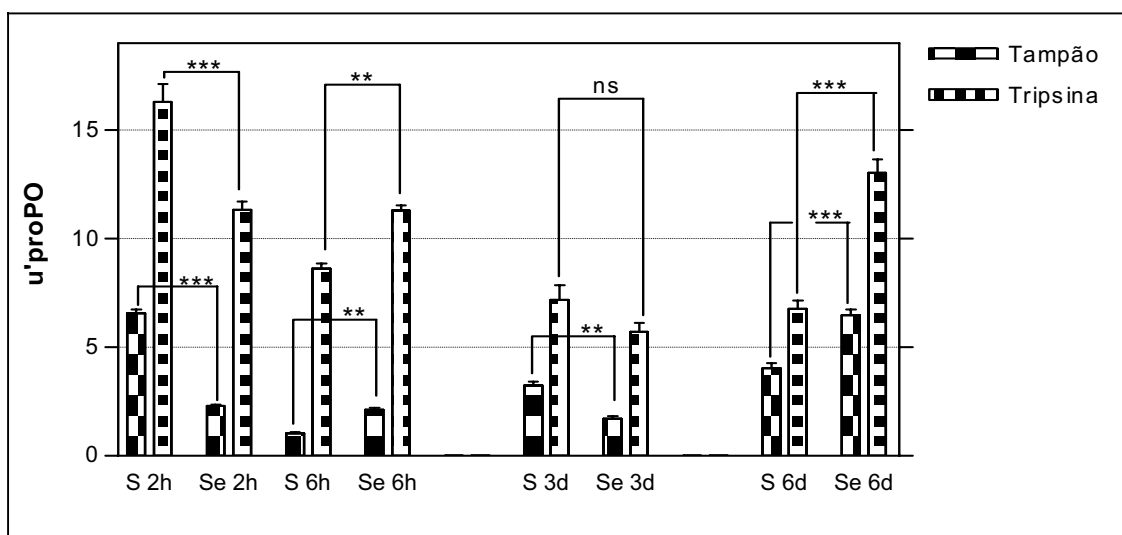


Gráfico 12 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* inoculadas com SSI (**Grupo S**) e inoculadas com Sephadex (**Grupo Se**) após 2 h de reação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo) e ns ($P > 0,05$ – não significativo).

1.7. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE proPO

Os Gráficos de 13 a 16 mostram os resultados obtidos para os tempos de 2 h, 6 h, 3 e 6 dias de parasitismo/inoculação. De um modo geral houve uma inibição significativa da ativação do sistema de proPO, quando comparamos os resultados dos insetos parasitados com seus respectivos grupos controle.

A hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pela vespa *Cotesia flavipes* (Grupo P) exibiu uma diminuição significativa da ativação do sistema de proPO, tanto espontaneamente como na presença do ativador, em insetos com inoculação inicial (2 h -

Gráfico 13) e recente (6 h - Gráfico 14), ocorrendo o mesmo com agente abiótico (Sephadex) ou seu veículo de inoculação (SSI). A exceção ocorreu na presença do agente abiótico ou da SSI, na ativação espontânea, após 6 h de parasitismo/inoculação (recente), quando ocorreu um aumento significativo na ativação do sistema de proPO (Gráfico 14).

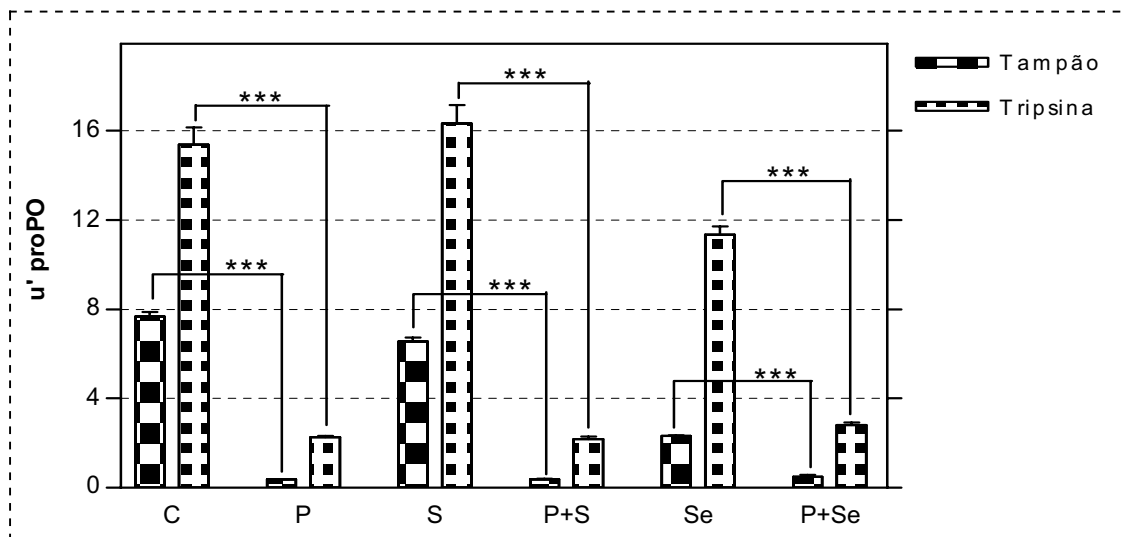


Gráfico 13 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* controle (**Grupo C**), parasitadas (**Grupo P**), inoculadas com SSI (**Grupo S**), parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo P+S**), inoculadas com Sephadex (**Grupo Se**) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo P+Se**), após 2 h de parasitismo/ inoculação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo).

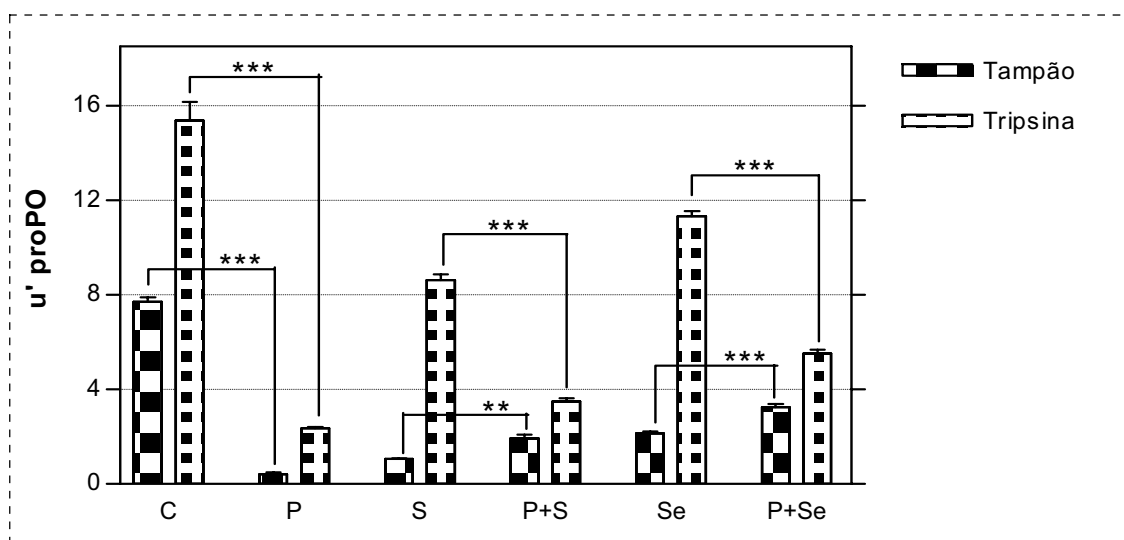


Gráfico 14 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* controle (**Grupo C**), parasitadas (**Grupo P**), inoculadas com SSI (**Grupo S**), parasitadas e inoculadas com SSI (**Grupo P+S**), inoculadas com Sephadex (**Grupo Se**) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (**Grupo P+Se**), após 6 h de parasitismo/ inoculação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo).

Nos insetos com inoculação intermediária (3 dias) houve uma diminuição significativa na ativação do sistema de proPO em todos os grupos experimentais, quando comparados com seus respectivos grupos controle, tanto na ativação espontânea como na ativada pela tripsina (Gráfico 15).

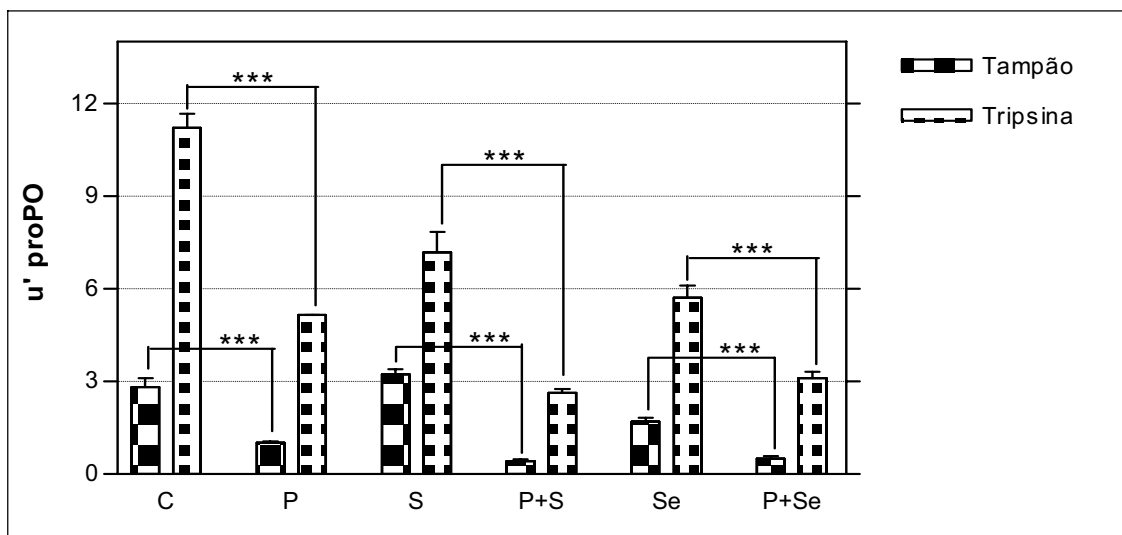


Gráfico 15 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* controle (Grupo C), parasitadas (Grupo P), inoculadas com SSI (Grupo S) parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S), inoculadas com Sephadex (Grupo Se) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se), após 3 dias de parasitismo/ inoculação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo).

Já na inoculação tardia (6 dias) houve uma diminuição significativa na ativação espontânea do sistema de proPO nos insetos parasitados (Grupo P), em relação ao grupo controle (Grupo C). Tal diminuição não foi significativa na presença de ativador (Gráfico 16).

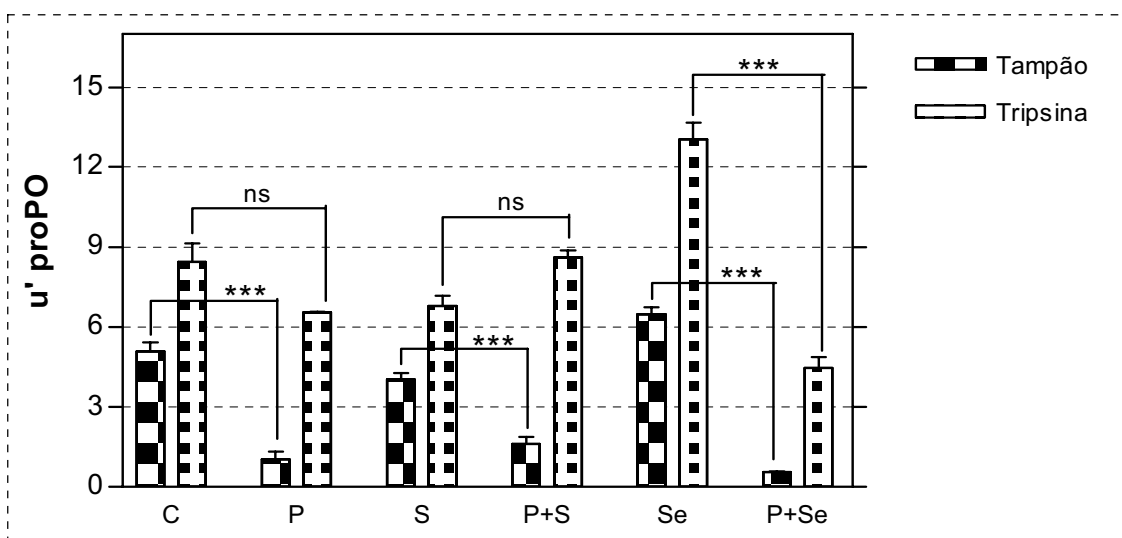


Gráfico 16 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* controle (Grupo C), parasitadas (Grupo P), inoculadas com SSI (Grupo S), parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S), inoculadas com Sephadex (Grupo Se) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se), após 6 dias de parasitismo/ inoculação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ns ($P > 0,05$ – não significativo).

Ainda com relação ao Gráfico 16, os níveis de ativação de proPO em insetos parasitados e inoculados com veículo (Grupo P+S), apresentaram diminuição significativa somente na ativação espontânea, comparativamente aos insetos somente inoculados com SSI (Grupo S). Para o grupo de insetos parasitados e inoculados com Sephadex (Grupo P+Se), os níveis de proPO diminuíram significativamente na ativação espontânea e em presença de ativador, quando comparados aos insetos somente inoculados com o agente abiótico (Grupo Se).

A ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas somente parasitadas (Grupo P), comparadas com larvas parasitadas e inoculadas com veículo (Grupo P+S) ou com agente abiótico (Grupo P+Se), pode ser observada no Gráfico 17. Com 2 h de parasitismo/inoculação não houve diferença significativa na ativação espontânea do sistema de proPO, nos três grupos experimentais. Já na presença de agente abiótico (Grupo P+Se) e na presença de tripsina, houve um aumento significativo dos níveis de ativação do sistema de proPO, quando comparado com os demais grupos (Grupos P e P+S). Após 6 h de parasitismo e/ou inoculação houve diferença significativa nos níveis de ativação do sistema de proPO em todos os grupos experimentais, tanto na ativação espontânea como na presença de ativador.

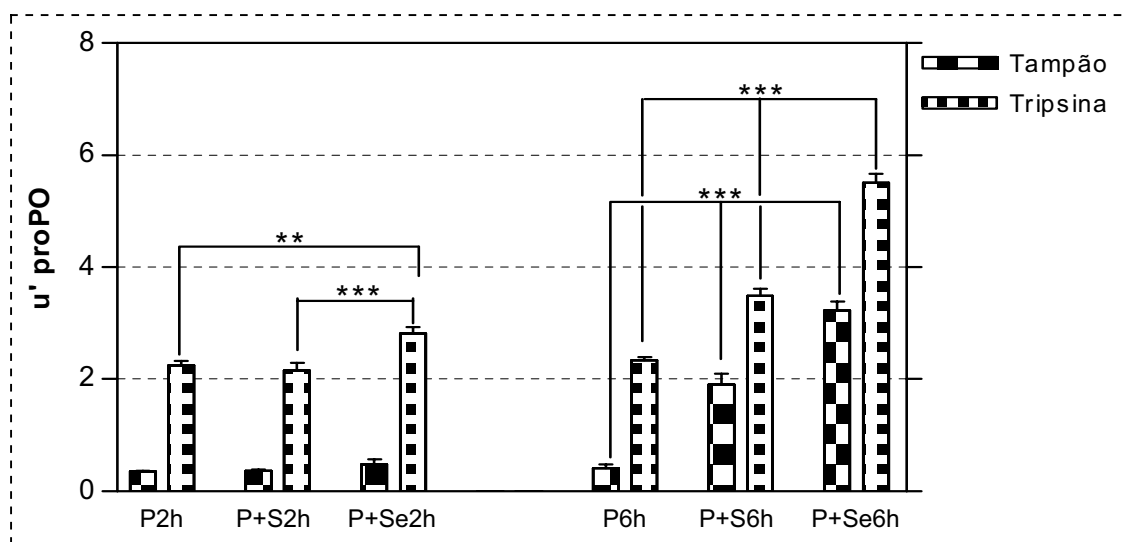


Gráfico 17 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* parasitadas (Grupo P), parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se), após 2 h e 6 h de parasitismo/ inoculação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador por 2 h (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo).

O Gráfico 18 mostra a ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas somente parasitadas (Grupo P), comparadas com larvas parasitadas e inoculadas com veículo (Grupo P+S) ou com agente abiótico (Grupo P+Se), após 3 e 6 dias de parasitismo/inoculação (intermediária e tardia, respectivamente). Observamos que com 3 dias de parasitismo/inoculação não houve diferença significativa dos níveis de ativação espontânea do sistema proPO, nos três grupos testados. Já na presença de ativador tripsina, houve uma diminuição significativa dos níveis de ativação do sistema de proPO na hemolinfa de insetos parasitados e inoculados com SSI (Grupo P+S) e também nos insetos parasitados e inoculados com Sephadex (Grupo P+Se), quando comparados com hemolinfa de insetos somente parasitados (Grupo P).

Após 6 dias de parasitismo/inoculação, também não ocorreu diferença significativa dos níveis de ativação espontânea do sistema proPO, nos três grupos experimentais. Já na presença de veículo de inoculação (Grupo P+S) e no caso em que utilizamos o ativador tripsina, houve um aumento significativo dos níveis de ativação do sistema de proPO quando comparado com os demais grupos (Grupos P e P+Se).

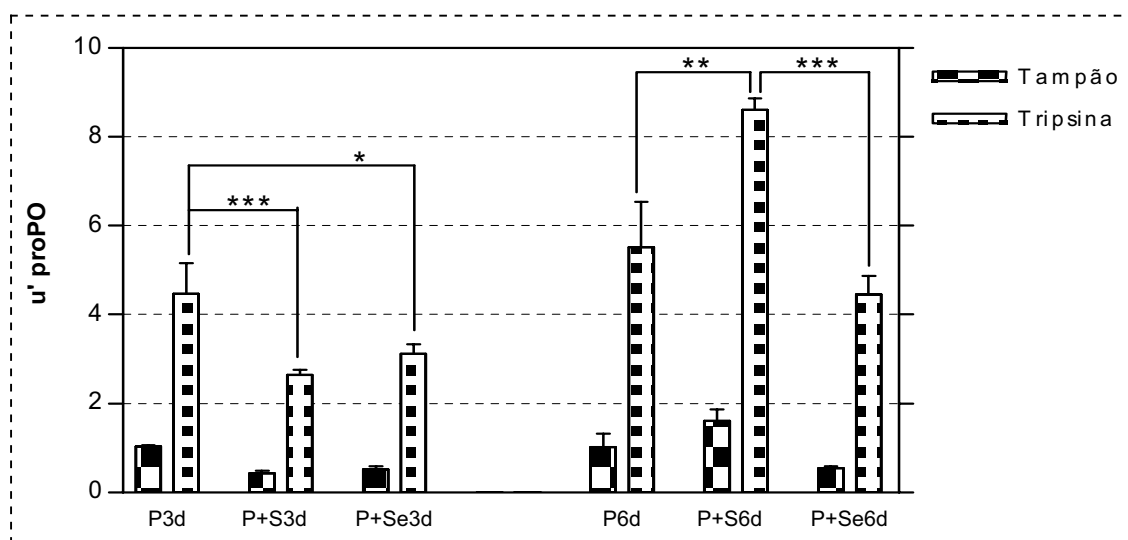


Gráfico 18 – Ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* parasitadas (Grupo P), parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S) e parasitadas e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se), após 3 e 6 dias de parasitismo/ inoculação, sem ativador (tampão) e na presença de ativador (tripsina). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo) e * ($P < 0,05$ – pouco significativo).

2. DETECÇÃO *in vitro* DE HEMÓCITOS COM REACÇÃO POSITIVA PARA PO

O protocolo apresentado para a detecção *in vitro* de hemócitos com reacção positiva para PO foi realizado com sucesso e conseguimos boa documentação fotográfica (Fig.1-4). Observou-se uma coloração marrom, indicativa da presença de PO, em células grandes e arredondadas interpretadas como OE (Fig. 1-4). Ficou evidente a variabilidade de tamanho dos OE presentes na hemolinfa de larvas controle de *Diatraea saccharalis* (Fig. 4B), bem como sua marcação positiva em diferentes graus de intensidade (Fig. 2A). Esse tipo celular evidenciou coloração em todo o citoplasma (Fig. 2B e 3B) e eventualmente detectamos uma reacção não homogênea no citoplasma do OE (Fig. 2B). Havia ainda a presença de um halo difuso ao redor do OE (Fig. 2B e 3B), com imagem que nos pareceu ser de liberação de conteúdo intracelular (Fig. 4A). Os outros tipos celulares presentes na monocamada (PL e GR) não apresentaram nenhuma indicação de reacção positiva para PO (Fig. 1A, 2A e 3A). Os ES foram dificilmente identificados na monocamada, provavelmente devido a sua degranulação.

Tivemos grande dificuldade em repetir a técnica com qualidade. Em inúmeras tentativas de conseguir resultados reprodutíveis, testamos reagentes de outras marcas e modificamos os tempos de todas as etapas. Estas tentativas não alcançaram o resultado esperado, e não foi possível detectar apurar quais os fatores que levaram às preparações insatisfatórias (Fig. 5A-B). Em algumas preparações, poucos OE foram observados e as células de uma maneira geral estouraram (Fig. 6A). Em outras, a maioria dos OE estava com aspecto “murcho” e negativo para a PO, como se tivessem perdido o seu conteúdo (Fig. 6B). A utilização de tampão CacS-360 em soluções e lavagens foi testada. A hemolinfa foi colhida pura ou diluída neste tampão e o material apresentou-se melanizado, em diferentes graus, sempre com prejuízo da visualização das células (Fig. 7A-B).

Assim, embora tenhamos confirmado que o OE é o hemócito que apresenta a PO, não pudemos prosseguir no estudo da contagem destas células PO+ nos grupos experimentais propostos, um dos objetivos iniciais deste trabalho.

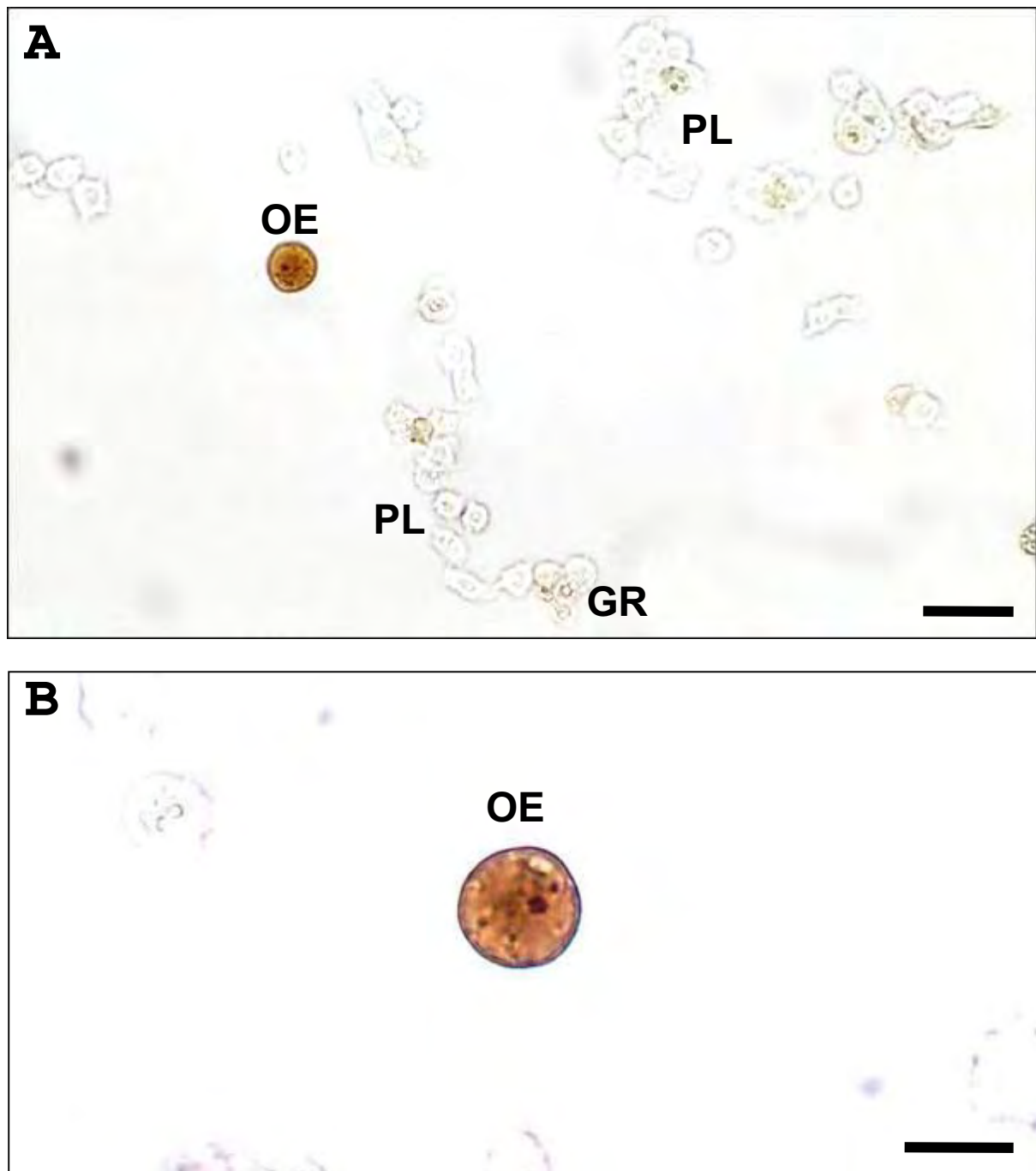


FIGURA 1 - Hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. As preparações de todos os reagentes foram realizadas em tampão TCS. Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa pura (sem adição de tampão); adesão de hemócitos na lâmina por 5 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 5 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

A) Vista geral dos hemócitos. Oenocitóide (OE) com reatividade positiva para fenoloxidase. Observar hemócitos não marcados: plasmatócitos (PL) e granulócitos (GR). Barra = 100 μ m.

B) Detalhe de oenocitóide (OE) com reatividade positiva para fenoloxidase por todo o citoplasma. Barra = 50 μ m.

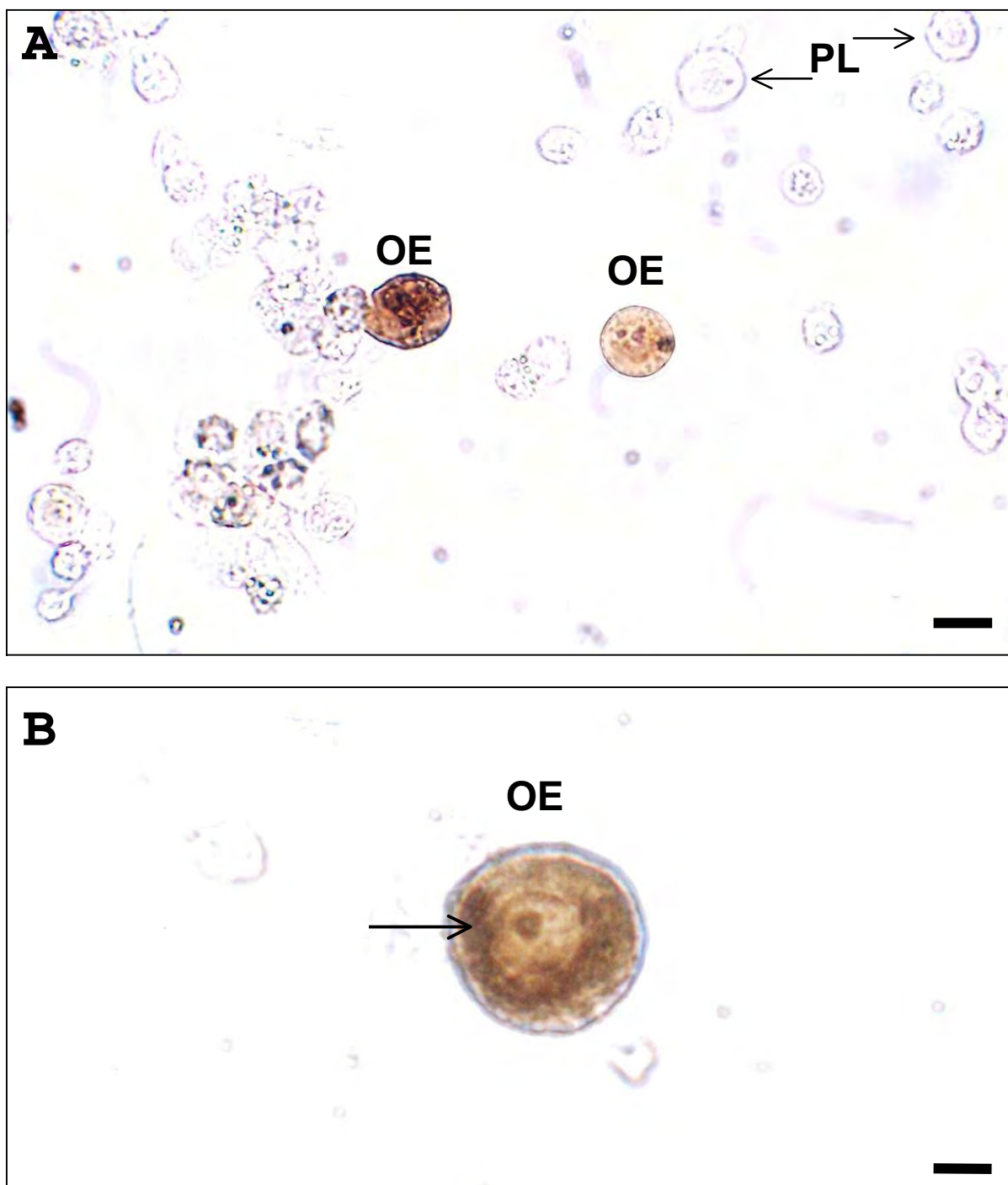


FIGURA 2 - Hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. As preparações de todos os reagentes foram realizadas em tampão TCS. Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa pura (sem adição de tampão); adesão de hemócitos na lâmina por 5 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 5 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

A) Vista geral dos hemócitos. Notar células não marcadas (PL) e oenocitoides (OE) com diferentes graus de reatividade positiva para fenoloxidase. Barra = 50µm.

B) Detalhe de oenocitóide (OE) com reatividade positiva para fenoloxidase. Notar halo difuso ao redor da célula e reação mais intensa em área focal citoplasmática (seta). Barra = 20µm.

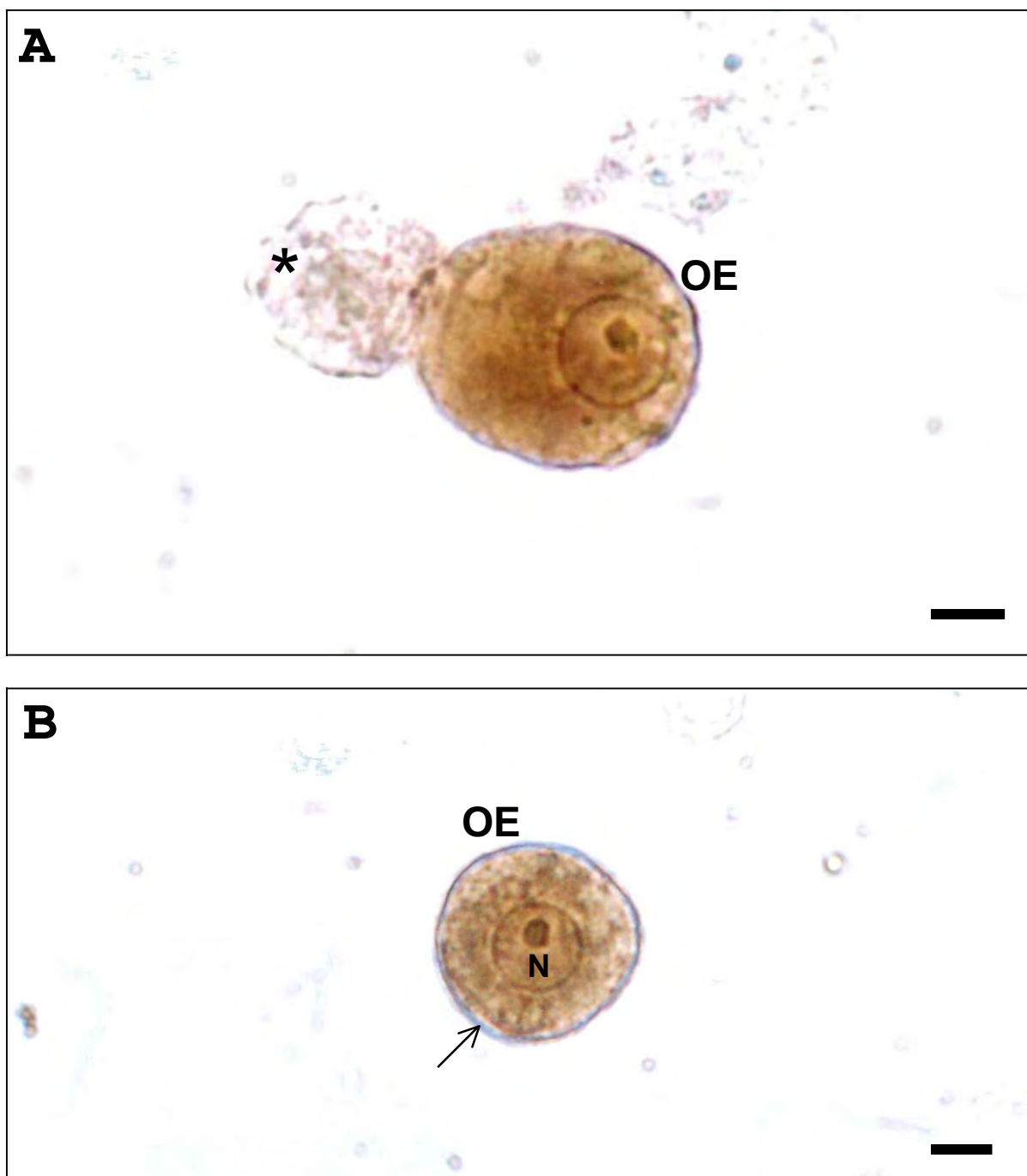


FIGURA 3 - Hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. As preparações de todos os reagentes foram realizadas em tampão TCS. Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa pura (sem adição de tampão); adesão de hemócitos na lâmina por 5 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 5 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

A) Detalhe de oenocitóide (OE) com reação positiva para fenoloxidase e hemócito adjacente não marcado (*). Barra = 20 μ m.

B) Detalhe de oenocitóide (OE) com reação positiva para fenoloxidase. Notar distribuição da cromatina característica deste tipo celular e halo difuso ao redor da membrana plasmática (seta). Núcleo (N). Barra = 20 μ m.

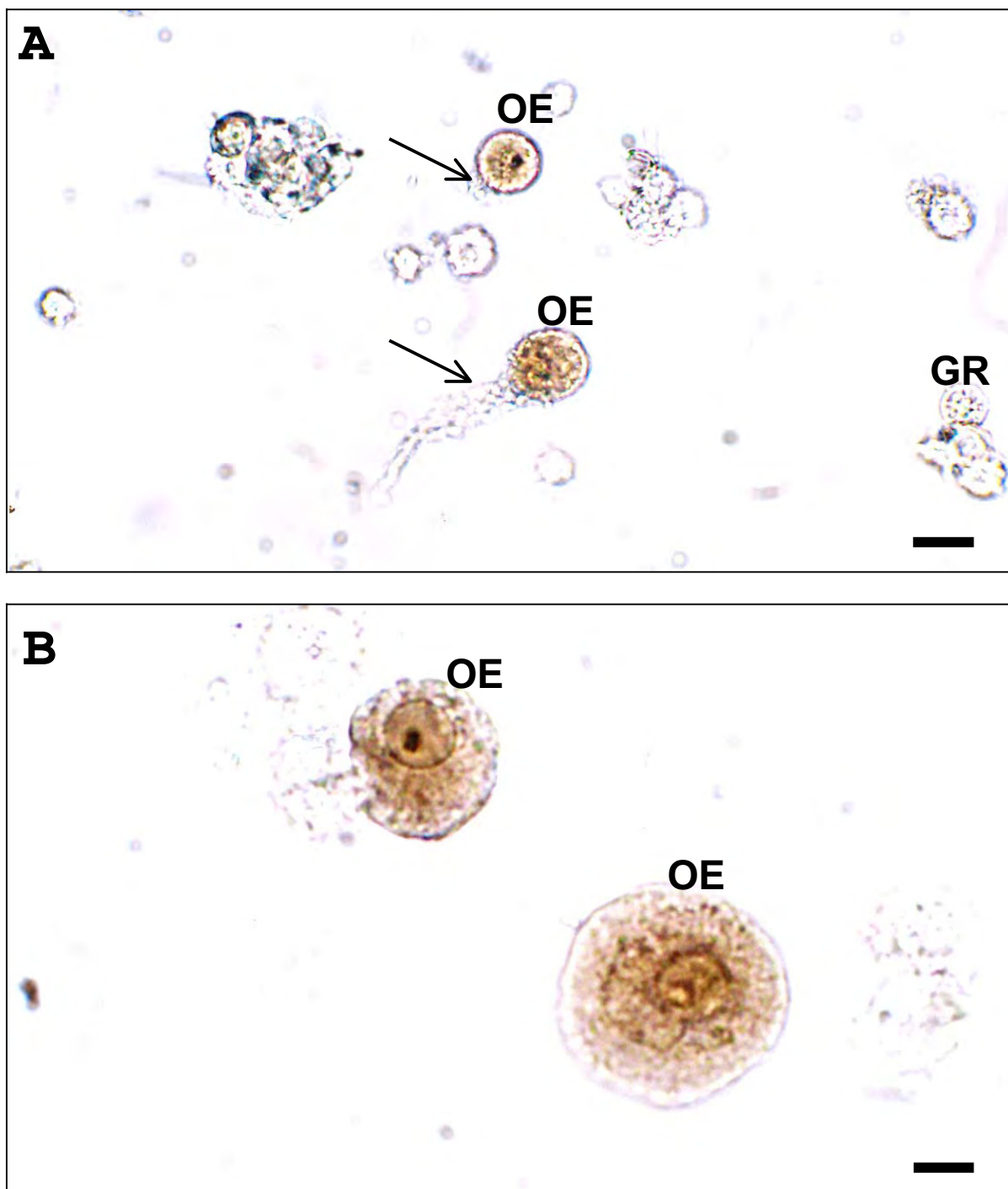


FIGURA 4 - Hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. As preparações de todos os reagentes foram realizadas em tampão TCS. Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa pura (sem adição de tampão); adesão de hemócitos na lâmina por 5 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 5 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

A) Vista geral de oenocitóides (OE) com reação positiva para fenoloxidase. Notar liberação de conteúdo celular para o meio extracelular (setas). Granulócito (GR). Barra = 50 μ m.

B) Detalhe de oenocitóides (OE) com diferentes tamanhos e com reação positiva para fenoloxidase. Barra = 20 μ m.

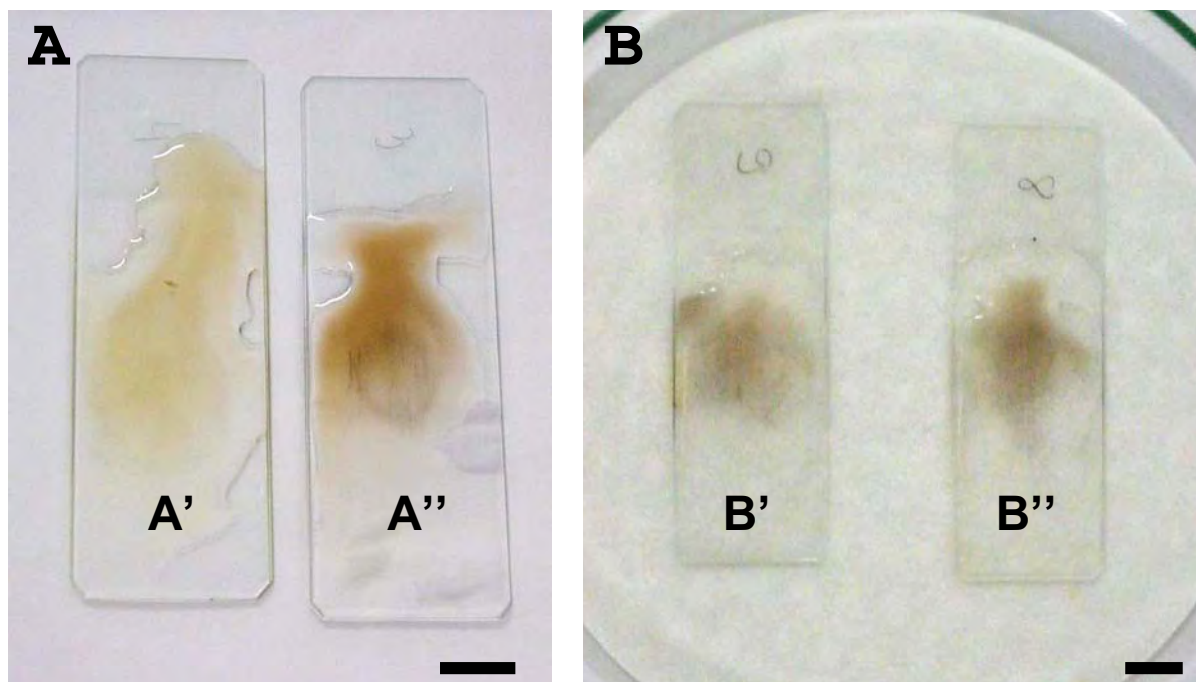


FIGURA 5 - Preparação de monocamadas de hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. Barras A e B = 1 cm.

A) Observar os diferentes graus de melanização.

As preparações dos reagentes foram realizadas em tampão TCS .

A': Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 10 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 10 min; fixação em glutaraldeído 1,5% por 15 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

A'': Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 15 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 5 min; ativação com tripsina suína (0,5mg/ml) por 10 min; incubação em L-dopa por 45 min e refixação do material por 30 min.

B) Observar a melanização do material, com conseqüente prejuízo da visualização das células.

As preparações dos reagentes foram realizadas em tampão Cac-S-380.

B': Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 10 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 5 min; fixação em glutaraldeído 1,5% por 25 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

B'': Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 15 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 10 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 10 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 30 min.

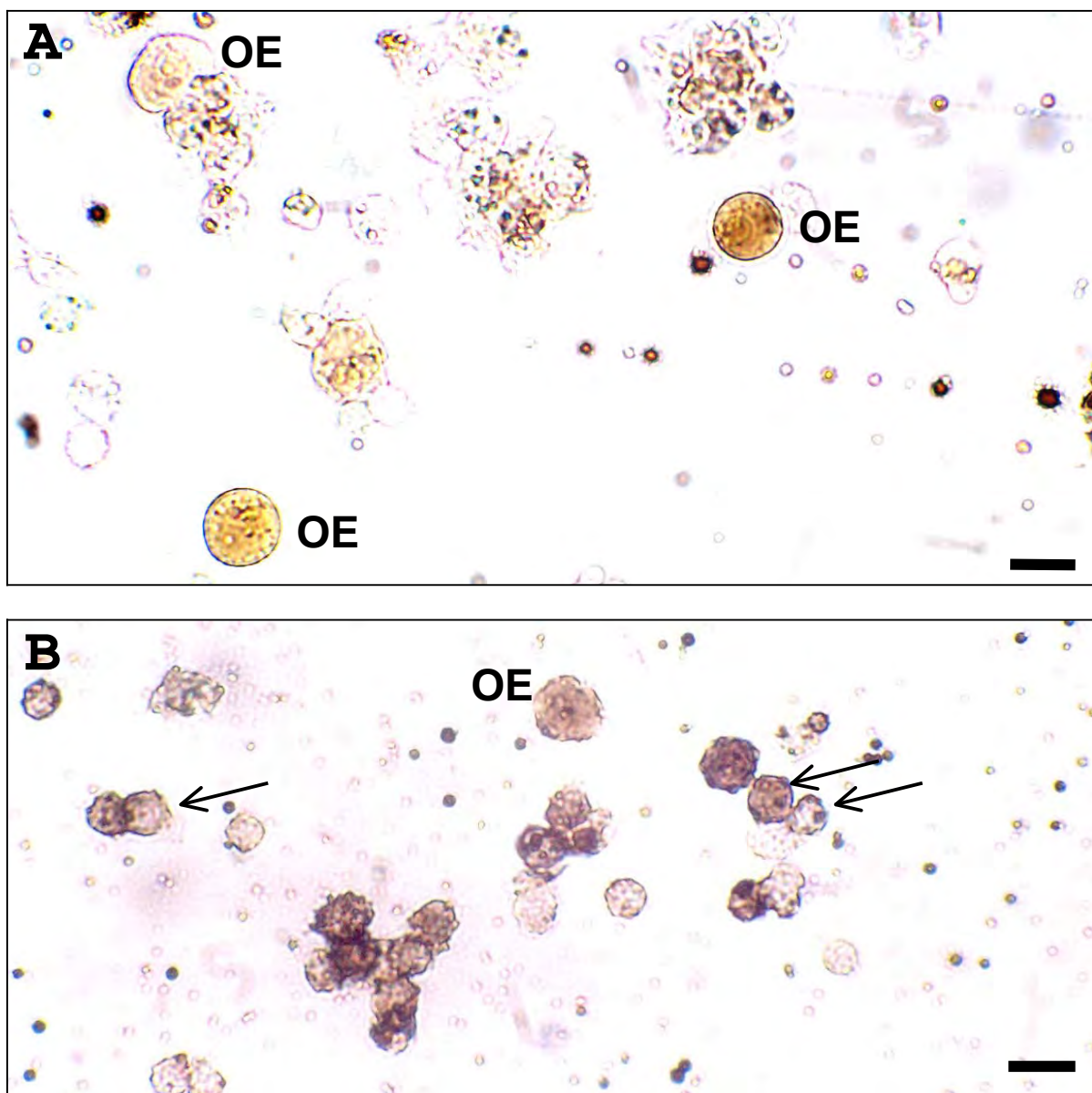


FIGURA 6 - Hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. As preparações dos reagentes foram realizadas em tampão TCS.

A) Aspecto geral dos hemócitos melanizados. Notar marcação em quase todas as células que estavam “estouradas” e oenocitóides (OE) fracamente positivos. Barra = 50µm.

A monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 10 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 10 min; fixação em glutaraldeído 1,5% por 15 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

B) Vista geral dos hemócitos. Notar oenocitóides murchos e às vezes com marcação negativa para a fenoloxidase (setas) e oenocitóides (OE) fracamente positivos. Barra = 50µm.

A monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 15 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 5 min; ativação com tripsina suína (0,5mg/ml) por 10 min; incubação em L-dopa por 45 min e refixação do material por 30 min.

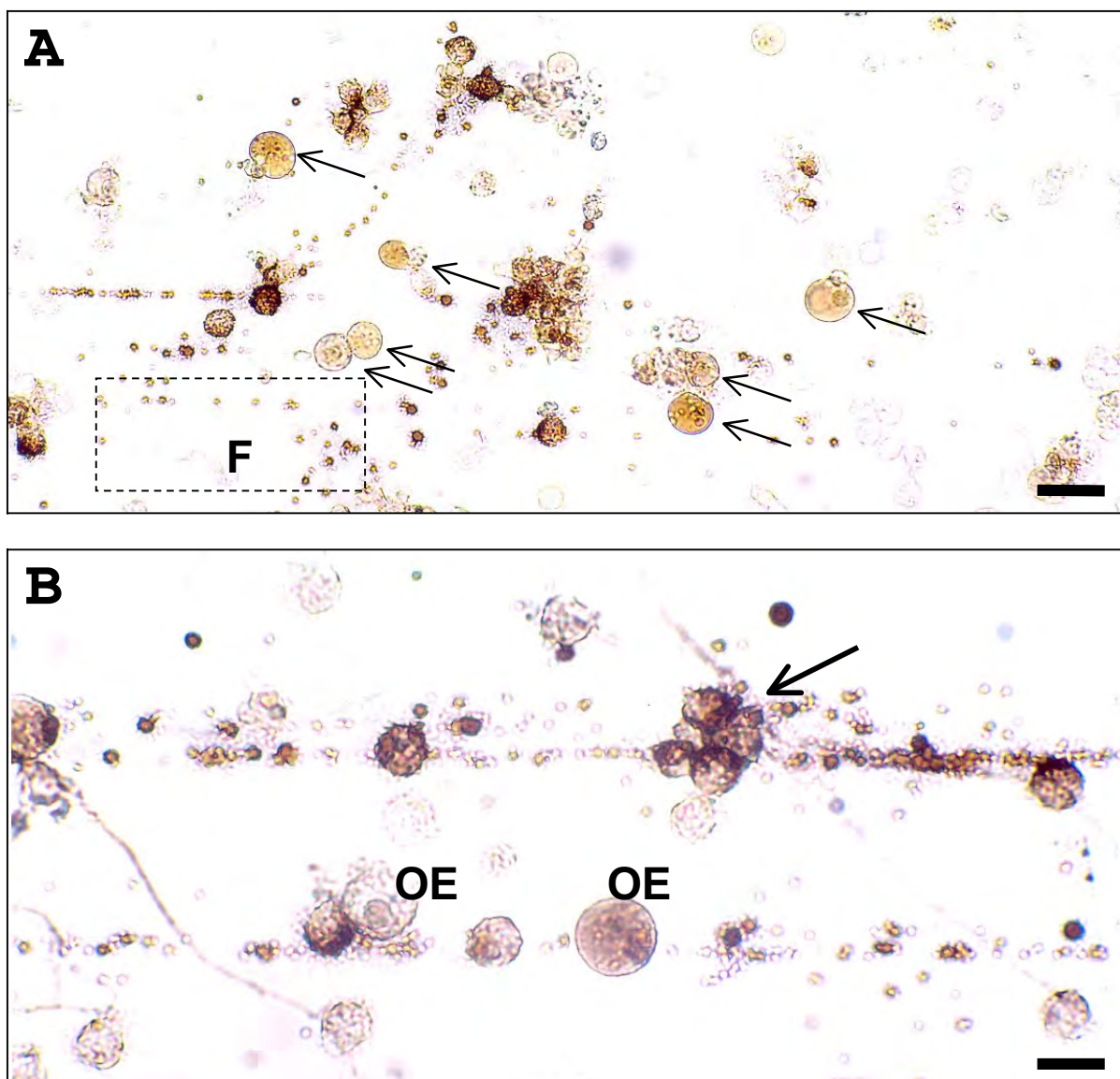


FIGURA 7 - Hemócitos de larvas de *D. saccharalis* com 23 dias de desenvolvimento. As preparações dos reagentes foram realizadas em tampão Cac-S-380.

A) Vista geral dos hemócitos. Notar oenocitóides (setas) positivos para a reação de fenoloxidase, e outros tipos celulares também fracamente marcados. Fragmentos celulares (F). Barra = 50µm.

Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 10 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 5 min; fixação em glutaraldeído 1,5% por 25 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 15 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 60 min.

B) Vista geral dos hemócitos. Observar hemócitos melanizados, grumos de células (seta) e oenocitóides (OE) com diferentes graus de marcação positiva para fenoloxidase. Barra = 50µm.

Monocamada de hemócitos foi preparada em lâminas recobertas com poli-L-lisina por 5 min; gotejou-se a hemolinfa diluída em tampão; adesão de hemócitos na lâmina por 15 min; fixação em glutaraldeído 2,5% por 10 min; ativação com tripsina bovina (1mg/ml) por 10 min; incubação em L-dopa por 60 min e refixação do material por 30 min.

3. EFEITO DO PARASITISMO E/OU DA INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

3.1. EFEITO DA IDADE DAS LARVAS NA PRODUÇÃO DE NO

Pudemos constatar pelo Gráfico 1 que houve uma queda na produção de NO ao longo do desenvolvimento de larvas não parasitadas (Grupo C). A análise estatística destes dados mostrou que houve uma redução significativa dos níveis de NO liberado na hemolinfa de larvas com 23 e 26 dias, quando comparados aos de larvas com 20 dias de desenvolvimento.

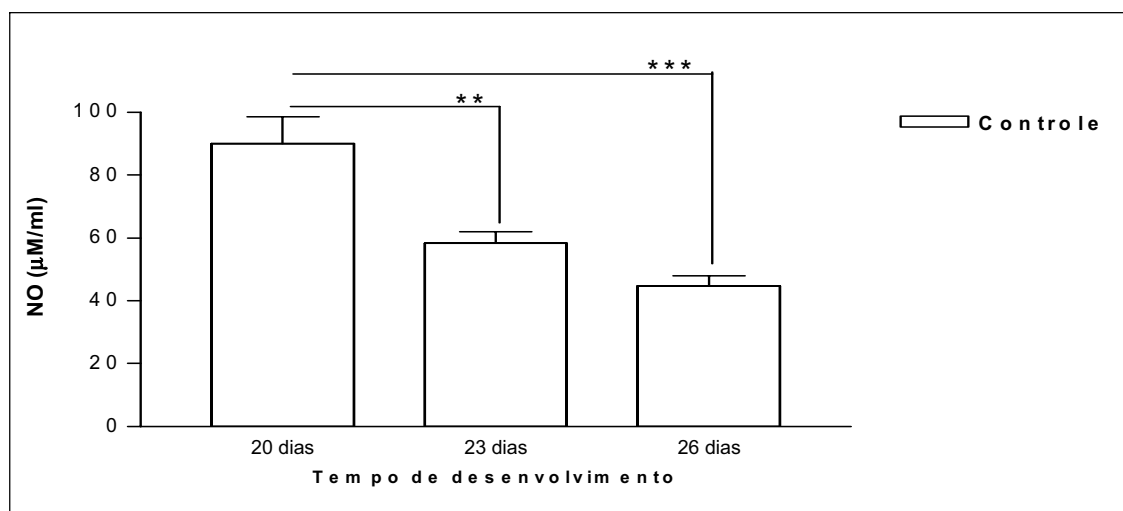


Gráfico 1 – Comparação da concentração de óxido nítrico (NO) em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* controle (Grupo C) nos diversos períodos de desenvolvimento. *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo).

3.2. EFEITO DO PARASITISMO NA PRODUÇÃO DE NO

O Gráfico 2 mostra que houve uma redução significativa dos níveis de NO liberado na hemolinfa de larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Grupo P), nas fases de parasitismo inicial e recente (2 h e 6 h de parasitismo), quando comparados ao grupo controle (Grupo C, larvas com 20 dias de desenvolvimento). Já nos tempos intermediário e tardio (Grupo P, após 3 e 6 dias de parasitismo), comparativamente aos respectivos controles (Grupo C, larvas com 23 e 26 dias de desenvolvimento), não houve variação significativa dos níveis de NO.

No mesmo gráfico, os dados do Grupo P+S (larvas parasitadas e inoculadas com SSI) revelaram o inverso. Foram nos períodos intermediário e tardio (após 3 e 6 dias de parasitismo) que houve a diminuição do nível de NO, comparativamente ao Grupo S (controle). Para este grupo (P+S), os níveis de NO nos tempos de parasitismo inicial e recente não diferiram significativamente do controle (Grupo S).

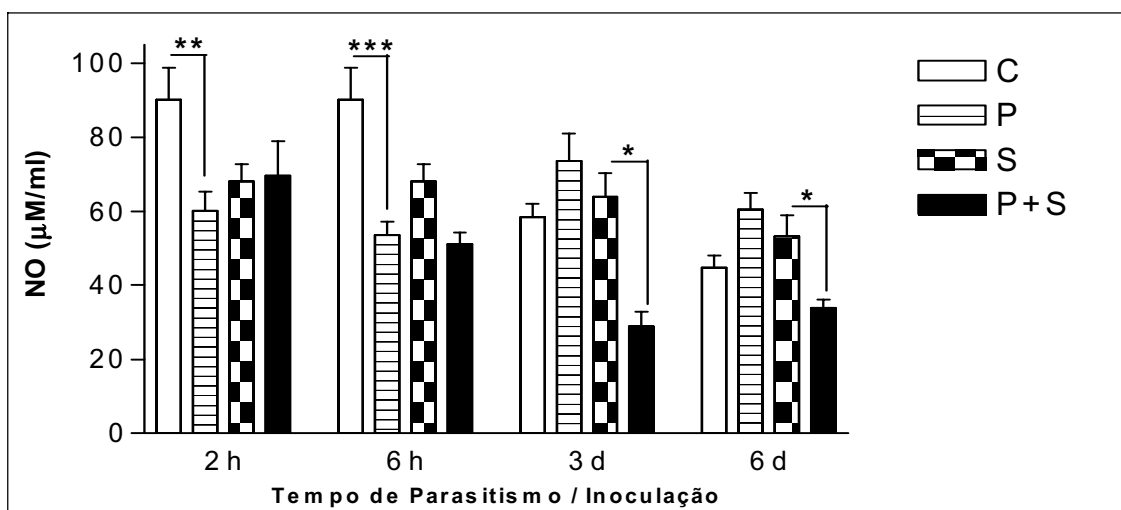


Gráfico 2 – Comparação da concentração de óxido nítrico (NO) em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* controle (Grupo C), larvas parasitadas pela *C. flavipes* (Grupo P), larvas inoculadas com SSI (Grupo S) e larvas parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com SSI (Grupo P+S). *** ($P < 0,001$ – muito significativo); ** ($P < 0,01$ – significativo) e * ($P < 0,05$ – pouco significativo).

3.3. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA PRODUÇÃO DE NO, EM DIFERENTES TEMPOS EXPERIMENTAIS

O Gráfico 3 mostra que em tempo inicial (2 h) de parasitismo e/ou inoculação de agente abiótico, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, isto é, a inoculação de solução salina ou partícula de Sephadex em larvas controle ou parasitadas não afetou a produção de NO.

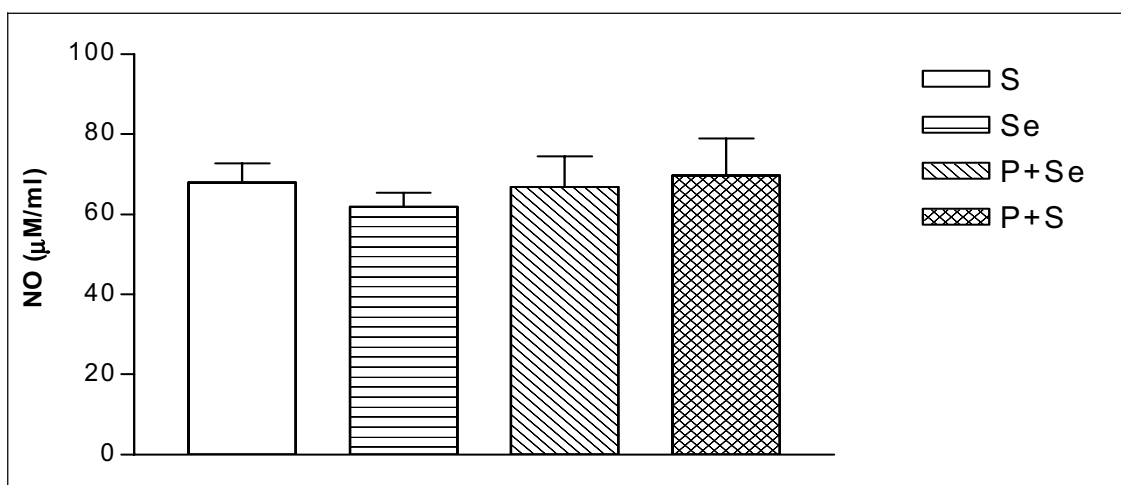


Gráfico 3 – Comparação da concentração de óxido nítrico (NO) 2 h após a inoculação, em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* inoculadas com SSI (Grupo S), com Sephadex (Grupo Se), parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se) e parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com SSI (Grupo P+S).

O Gráfico 4 mostra que em tempo de parasitismo recente (6 h), houve um aumento significativo da produção de NO em larvas parasitadas e inoculadas com agente abiótico (P+Se), quando comparadas com aquelas parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S). Nas larvas não parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo S) ou agente abiótico (Grupo Se) não houve diferença significativa na produção de NO.

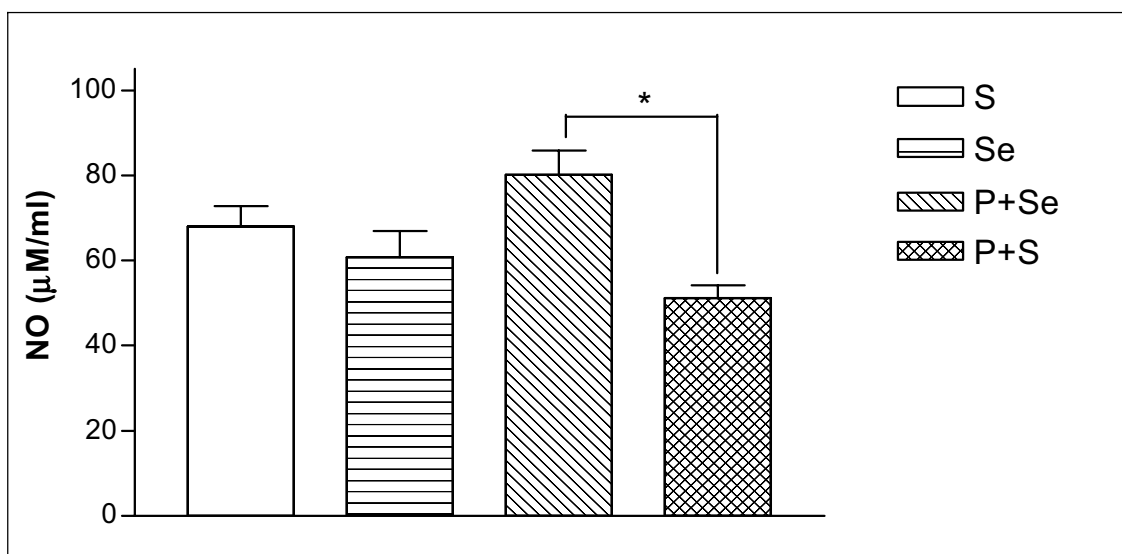


Gráfico 4 – Comparação da concentração de óxido nítrico (NO) 6 h após a inoculação, em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* inoculadas com SSI (Grupo S), com Sephadex (Grupo Se), parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se) e parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com SSI (Grupo P+S). * ($P < 0.05$ – pouco significativo).

O Gráfico 5 mostra que em tempo intermediário de parasitismo/inoculação de agente abiótico (3 dias), existiu uma diminuição significativa na produção de NO nas larvas parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S) quando comparadas às não parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo S). A inoculação de agente abiótico induziu uma diminuição significativa na produção de NO em larvas parasitadas e inoculadas com Sephadex (P+Se), em relação àquelas inoculadas somente com SSI (Grupo S). Entretanto, não houve diferença significativa entre as larvas inoculadas com SSI (Grupo S) e as inoculadas com esferas de Sephadex (Grupo Se).

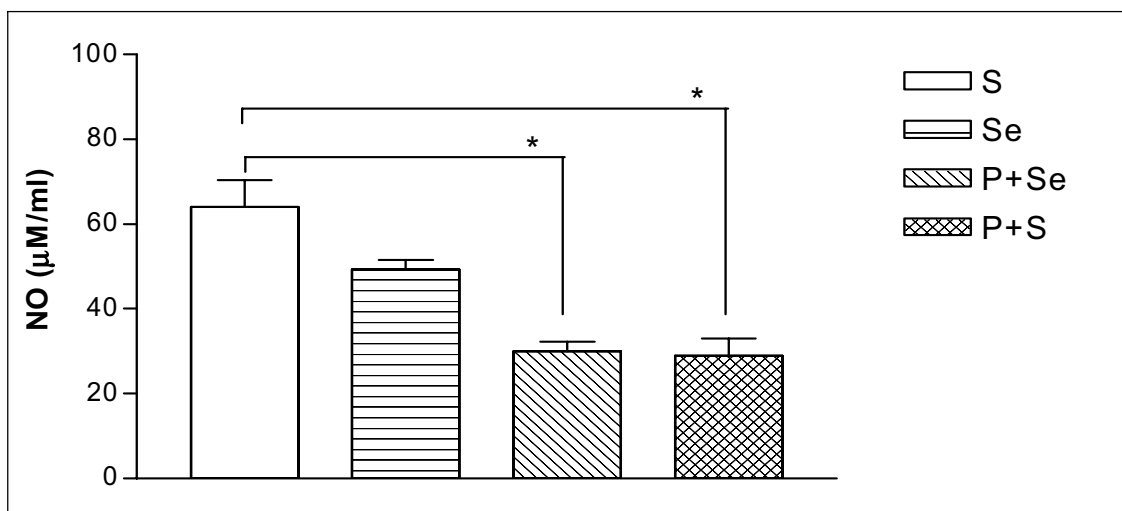


Gráfico 5 – Comparação da concentração de óxido nítrico (NO) 3 dias após a inoculação, em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* inoculadas com SSI (Grupo S), com Sepsadex (Grupo Se), parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com Sepsadex (Grupo P+Se) e parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com SSI (Grupo P+S). * ($P < 0.05$ – pouco significativo).

O Gráfico 6 mostra que em tempo tardio de parasitismo/inoculação de agente abiótico (6 dias), a inoculação de Sepsadex induziu uma diminuição na produção de NO em larvas não parasitadas (Grupo Se) quando comparadas com seu controle (Grupo S). Larvas parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S) não diferiram de larvas parasitadas e inoculadas com partícula abiótica (Grupo P+Se), quanto à produção de NO. Entretanto, o parasitismo induziu uma diminuição na produção de NO em larvas inoculadas com SSI (Grupo P+S), quando comparadas com aquelas não parasitadas (Grupo S).

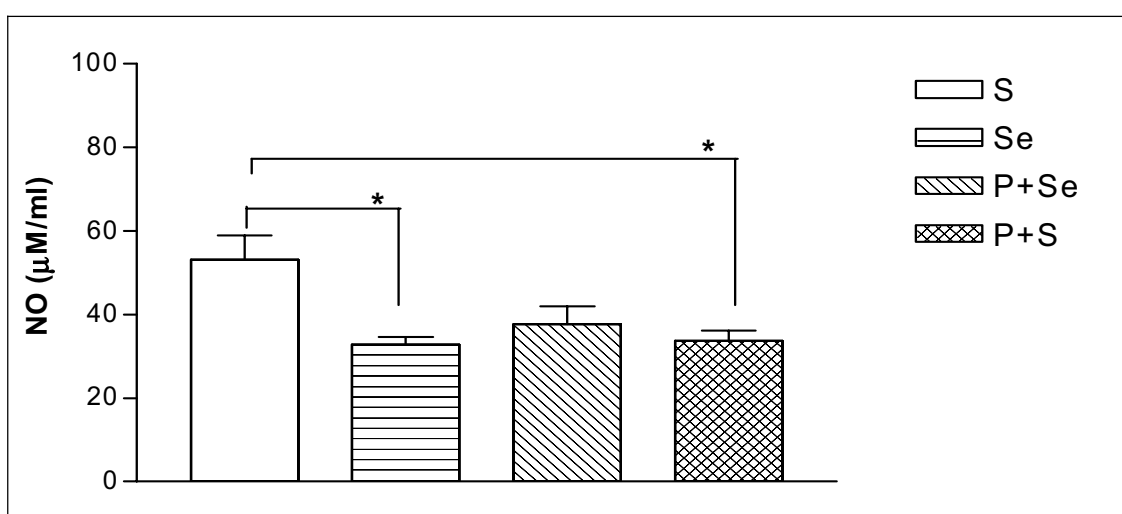


Gráfico 6 – Comparação da concentração de óxido nítrico (NO) 6 dias após a inoculação, em hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* inoculadas com SSI (Grupo S), com Sepsadex (Grupo Se), parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com Sepsadex (Grupo P+Se) e parasitadas pela *C. flavipes* e inoculadas com SSI (Grupo P+S). * ($P < 0.05$ – pouco significativo).

4. LOCALIZAÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A localização celular de NO foi realizada em hemolinfa de larvas dos grupos controle (Grupo C - Larvas com 20, 23 e 26 dias de desenvolvimento) e parasitadas (Grupo P - Larvas com 2 h e 6 h, 3 e 6 dias após o parasitismo).

Nenhum dos cinco tipos de hemócitos presentes na hemolinfa, neste período, plasmatócito (PL), granulócito (GR), esferulócito (ES), oenocitóide (OE) ou vermiforme (VE), reagiu positivamente ao reagente de Greiss, que detecta NO (Fig. 1-2).

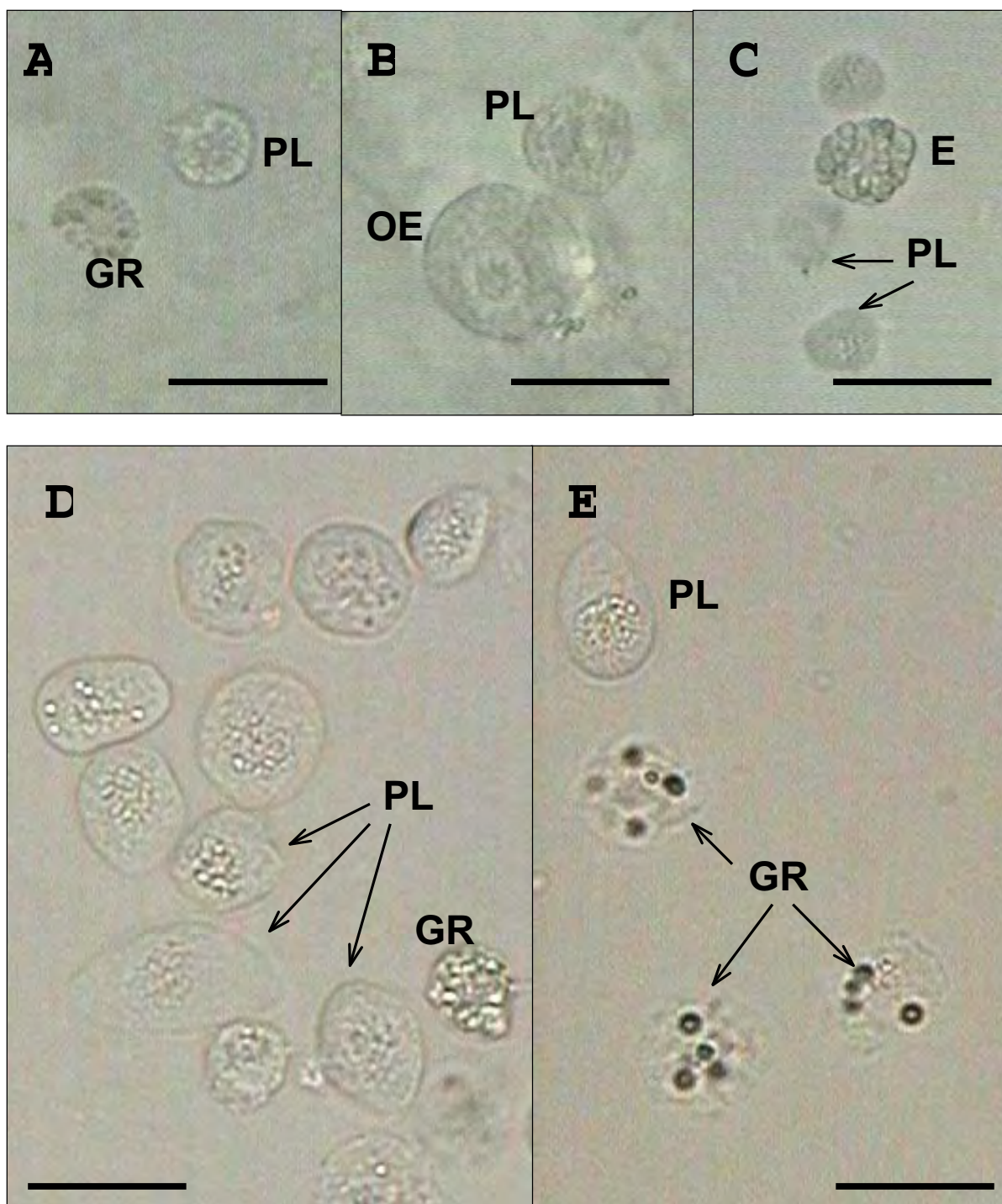


FIGURA 1 - Fotomicrografia de hemócitos de larvas de *D. saccharalis* do grupo controle (Grupo C), e parasitadas pela *C. flavipes* (Grupo P) após 2 h e 6 h de parasitismo.

A) Grupo C – larvas com 20 dias de desenvolvimento. Plasmatócito (PL) e granulócito (GR).

B) Grupo C – larvas com 20 dias de desenvolvimento. Plasmatócito (PL) e oenocitóide (OE).

C) Grupo C – larvas com 20 dias de desenvolvimento. Plasmatócito (PL) e esferulócito (ES).

D) Grupo P – após 2 h de parasitismo. Plasmatócitos (PL) e granulócitos (GR).

E) Grupo P – após 6 h de parasitismo. Plasmatócitos (PL) e granulócitos (GR).

Barras das figuras de A-E = 25 μ m.

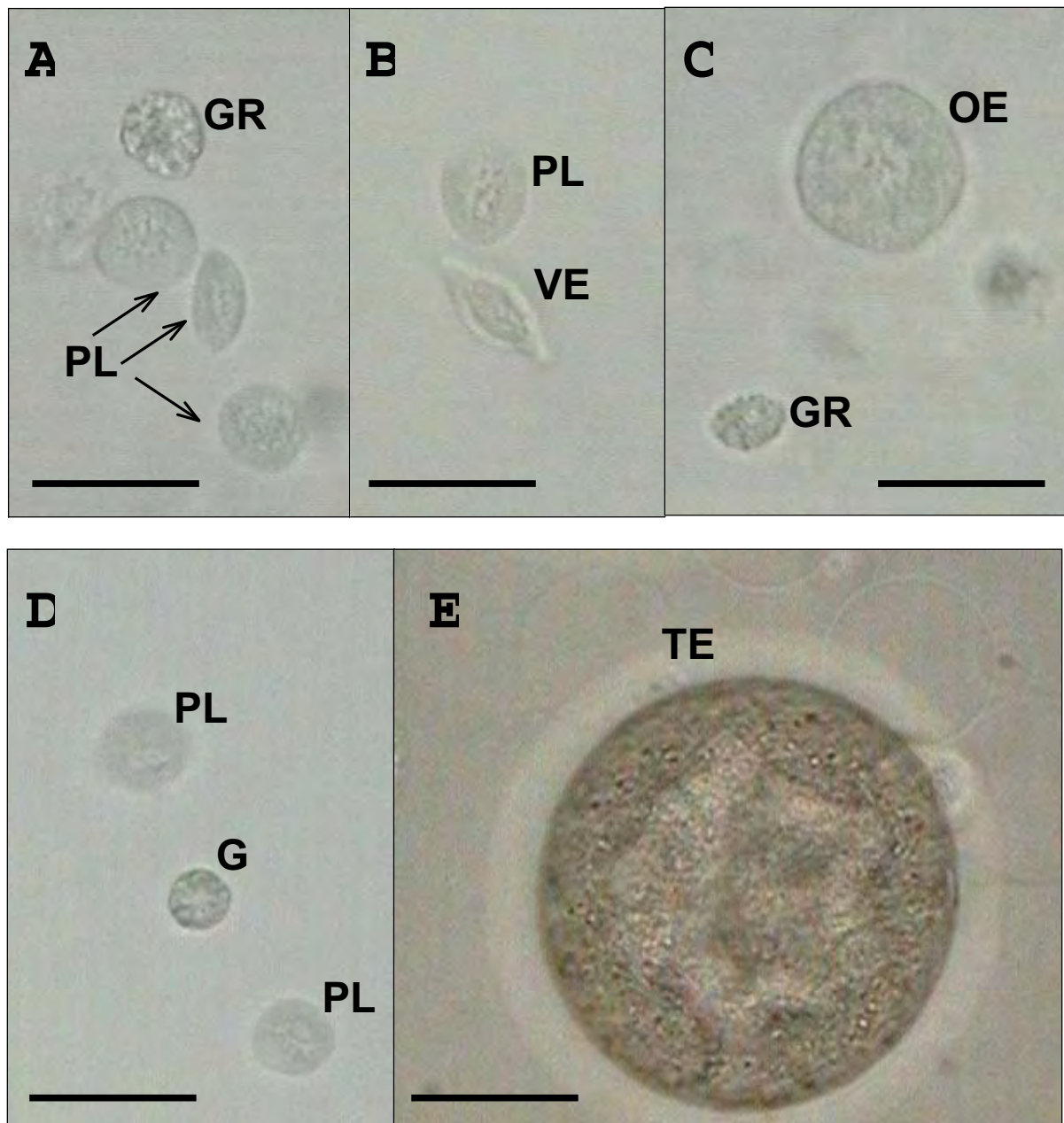


FIGURA 2 - Fotomicrografia de hemócitos de larvas de *D. saccharalis* do grupo controle (Grupo C), e parasitadas pela *C. flavipes* (Grupo P) após 3 e 6 dias de parasitismo.

A) Grupo C – larvas com 23 dias de desenvolvimento. Plasmatócito (PL) e granulócito (GR).

B) Grupo P – após 3 dias de parasitismo Plasmatócito (PL) e vermiforme (VE).

C) Grupo P – após 3 dias de parasitismo. Oenocitóide (OE) e granulócito (GR).

D) Grupo C – larvas com 26 dias de desenvolvimento. Plasmatócito (PL) e granulócito (GR).

E) Grupo P – após 6 dias de parasitismo. Teratócito (TE).

Barras das figuras de A-E = 25 μ m.

5. REAÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO EM LARVAS DE *Diatraea saccharalis* PARASITADAS PELA VESPA *Cotesia flavipes*

Não foi possível realizar a observação macroscópica das esferas de Sephadex na hemocele de insetos com 2 h, 6 h, 12 h e 1 dia após a inoculação, tanto em larvas não parasitadas como na vigência do parasitismo, uma vez que as esferas inoculadas confundiam-se com o corpo gorduroso e as estruturas internas da larva. Mesmo recuperando a hemolinfa e o lavado da hemocele, não conseguimos material para a análise, nos tempos acima mencionados.

Também não conseguimos recuperar as esferas de Sephadex da hemocele de larvas parasitadas por 10 dias, mesmo naquelas com ruptura do tegumento para liberação das larvas do parasitóide. Durante a dissecação a massa de parasitóides já ocupava toda a hemocele (Fig. 1A-B).

Nos tempos intermediários de inoculação (2 e 3 dias) as esferas já melanizadas eram facilmente encontradas dispersas na hemocele do inseto (Fig. 2A-B). Nos tempos tardios de inoculação (6 e 10 dias de implantação), as esferas concentravam-se na região posterior da hemocele do inseto, formando uma massa de esferas melanizadas (Fig. 3A-C).

Macroscopicamente e sob a lupa, em todos os tempos de inoculação, observou-se uma variabilidade de tamanho das esferas melanizadas, dentro de um mesmo inseto.

5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA ULTRA-ESTRUTURAL DA CÁPSULA EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO DE ESFERAS DE SEPHADEX

Apresentaremos os resultados separadamente, conforme o tempo de inoculação e o grupo experimental.

5.1.1. Inoculação intermediária (2 dias)

Grupo Se - Larvas não parasitadas inoculadas com Sephadex: A cápsula ao redor da esfera de Sephadex era constituída principalmente por células alongadas, achatadas e extremamente justapostas, interpretadas como sendo PL (Fig. 4A), que se dispunham em número variável de camadas envolvendo o material estranho. Os PL nas proximidades da superfície da esfera mostraram contorno irregular, citoplasma mais denso, com alguns vacúolos de conteúdo heterogêneo (Fig. 4B e 5B). Foi possível observar uma graduação de electrón-densidade do citoplasma de PL, que se mostrava mais contrastado na região interna da cápsula (Fig. 5A-B). Entre PL adjacentes foi possível observar a existência de evidentes

junções celulares, interpretadas como desmossomos (Fig. 6A-B). Os PL e GR das camadas mais externas da cápsula apresentavam-se arredondados, e seus núcleos menos achatados (Fig. 7A-B), com poucos e pequenos vacúolos citoplasmáticos. Raros foram os GR identificados constituindo a cápsula, aprisionados entre os PL ou na superfície da mesma (Fig. 7A). Nem sempre foi possível realizar uma distinção morfológica clara do limite das células próximas ao Sephadex, dificultando a quantificação do número de camadas da cápsula. Obtivemos imagens de ES na porção externa da cápsula, exibindo modificações morfológicas importantes: rarefação das esférulas, fusão destas estruturas e liberação dos conteúdos para o meio extracelular (Fig. 8A-B); foram observadas ainda esférulas soltas, em meio a restos de ES (Fig. 9A-B).

Grupo P+Se - Larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* e inoculadas com Sephadex: A constituição e morfologia da cápsula (Fig. 10A) eram muito semelhantes às do Grupo Se, com exceção de que, aparentemente, havia maior número de GR nas camadas mais externas (Fig. 10B), e que raros foram os ES observados no exterior da cápsula. Havia, a semelhança do grupo citado anteriormente, predomínio de PL na constituição da cápsula e estes eram arredondados quando presentes em sua porção mais externa (Fig. 11A-B).

5.1.2. Inoculação intermediária (3 dias)

Grupo Se: A constituição da cápsula ao redor da partícula de Sephadex era muito semelhante à do Grupo SE com 2 dias de inoculação. Na constituição da cápsula predominavam PL; havia uma região interna mais contrastada e uma porção externa menos contrastada (Fig. 12A-B). Observamos desmossomos entre as células adjacentes (Fig. 13A). Também observamos PL mais arredondados e raros ES, ambos na região superficial da cápsula (Fig. 13B).

Grupo P+Se: A constituição da cápsula (Fig. 14A) era muito semelhante a do Grupo Se, no mesmo tempo de inoculação, com desmossomos entre PL adjacentes (Fig. 14B) e, em sua porção mais externa, com PL mais arredondados e ES (Fig. 15A-B). Em alguns casos observamos PL na porção exterior da cápsula, arredondados e em íntima associação, com interdigitações entre suas membranas plasmáticas (Fig. 16A-B) e com seus retículos endoplasmáticos rugosos (RER) dilatados (Fig. 18A). Obtivemos imagens de TE próximos às cápsulas, com crescimento aparentemente normal para o período do parasitismo (Fig. 17A) e junto a estes, GR com RER dilatados (Fig. 17B e 18B).

Um achado interessante, neste tempo experimental, foi a recuperação de esferas de Sephadex com o início da formação da cápsula (Fig. 19A), onde os PL se dispunham mais frouxamente e seu formato era mais arredondado do que nas cápsulas já descritas, para este tempo de inoculação (Fig. 19B).

5.1.3. Inoculação tardia (6 dias)

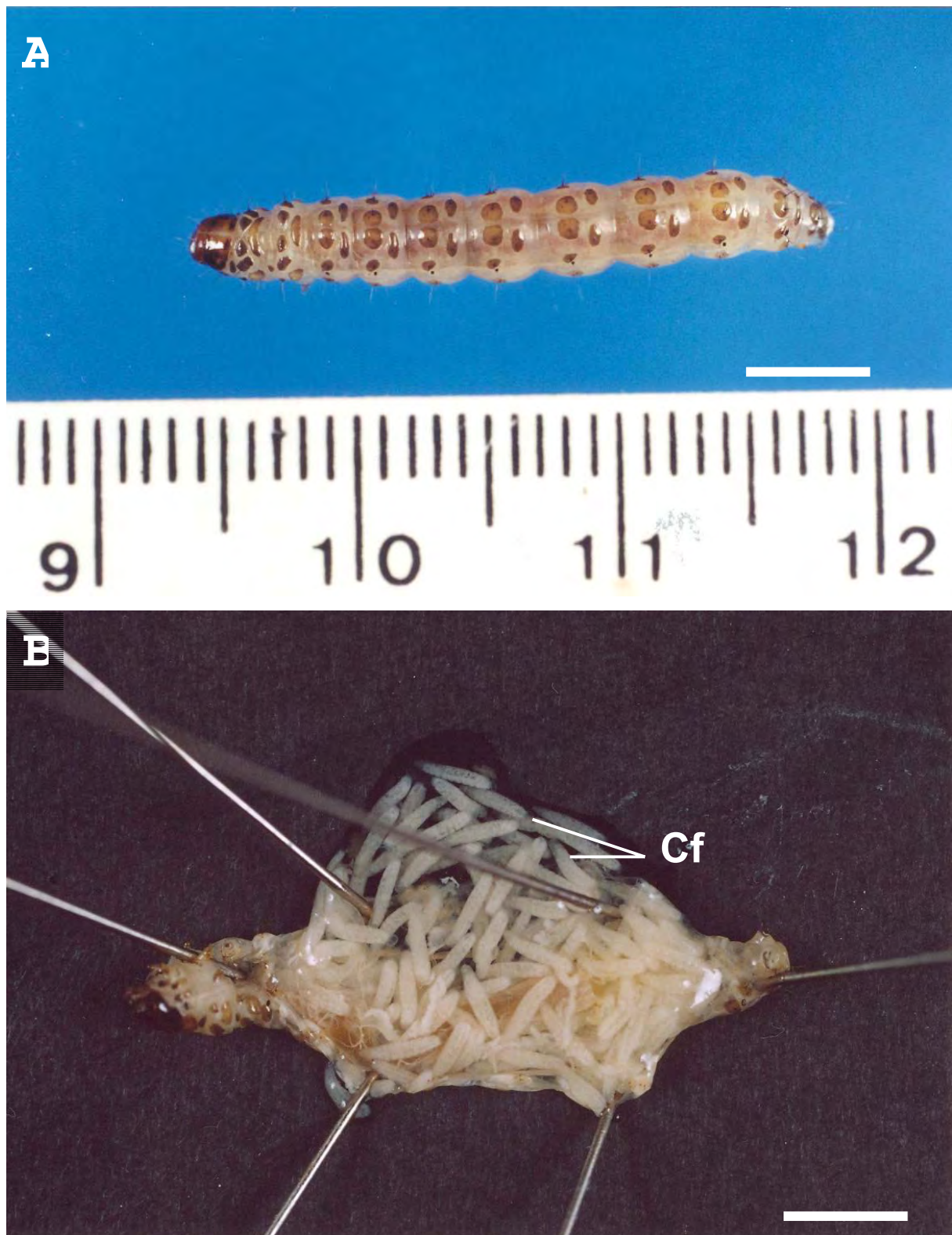
Grupo Se: A constituição da cápsula era muito semelhante a dos outros períodos estudados, porém com um grande número de PL em torno do material inerte (Fig. 20A-B). Estes PL possuíam vacúolos pouco densos e eventualmente um aspecto de degeneração, na região mais interna da cápsula (Fig. 20B e 21A). Na porção externa da cápsula, observamos PL arredondados e raros ES (Fig. 21B).

Grupo P+Se: As cápsulas mostraram uma grande variação quanto à espessura (camadas celulares) ao redor da partícula de Sephadex (Fig. 22A-B e 23B). Quanto à constituição, esta se assemelhava com outras cápsulas já descritas, com predomínio de PL e presença de desmosomas entre eles (Fig. 23A). Estes PL apresentavam forma menos achatada quando estavam na porção externa da cápsula (Fig. 23B). GR também estavam presentes e, quando se situavam na porção externa da cápsula, eram arredondados, exibindo vacúolos com conteúdo heterogêneo (Fig. 24). No caso dos PL, foi possível observar o aumento do RER e de vacúolos (Fig. 25 e 26). Observamos ES na porção externa da cápsula exibindo degranulação das esférulas (Fig. 26). Observamos ainda TE com morfologia alterada, quando comparados com TE advindos de hemolinfa de insetos somente parasitados (Grupo P), com grandes gotas lipídicas em seus citoplasmas (Fig. 27A-B).

5.1.4. Inoculação tardia (10 dias)

Grupo Se: A cápsula apresentou constituição muito semelhante à dos outros períodos, porém obtivemos algumas imagens em que as camadas celulares estavam em menor número, se comparada ao grupo analisado após 6 dias de inoculação de Sephadex (Fig. 28A), sendo que as células que compunham a cápsula estavam mais frouxamente dispostas (Fig. 28B e 29). Os PL próximos ao Sephadex apresentaram seu citoplasma mais denso e à medida que se distanciavam do material inerte, tinham o seu citoplasma menos denso (Fig. 28B e 29). Observamos ES degranulados na porção externa da cápsula (Fig. 30B), bem como esférulas intactas de ES constituindo as cápsulas (Fig. 28B e 30A).

Grupo P+Se: Não conseguimos recuperar as cápsulas, neste grupo.

**FIGURA 1**

- A) Larva de *D. saccharalis* não parasitada, aos 23 dias de desenvolvimento. Barra = 0,5 cm.
- B) Larva de *D. saccharalis* após 10 dias de parasitismo: a abertura do tegumento permite visualizar as larvas do parasitóide *C. flavipes* (Cf), ocupando sua hemocele. Barra = 0,5 cm.

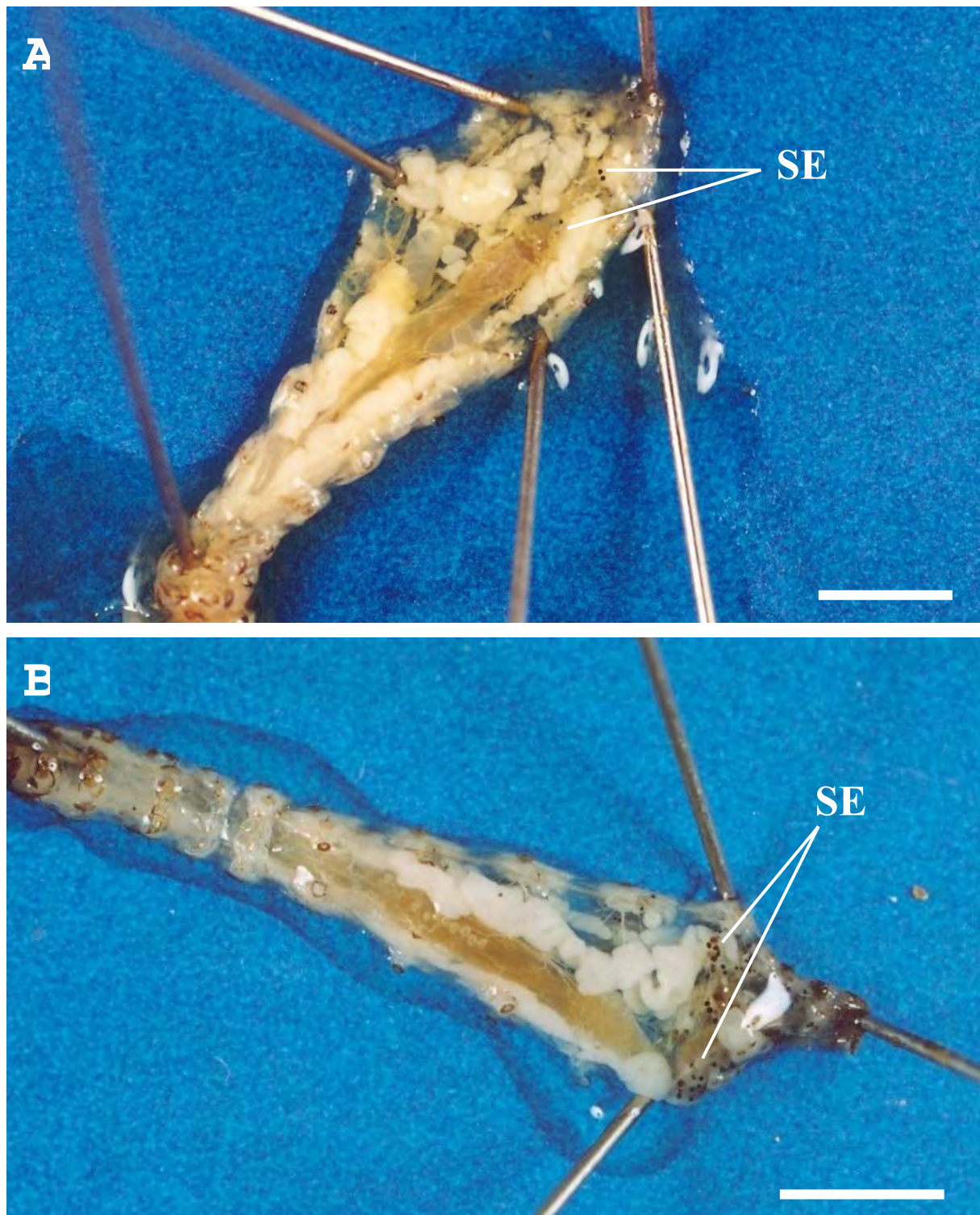


FIGURA 2 - Larvas de *D. saccharalis* não parasitadas, inoculadas com esferas de Sephadex (Grupo Se)

A) 2 dias após a inoculação do agente abiótico: observar as esferas de Sephadex (SE) melanizadas e dispersas na hemocele do inseto. Barra = 0,5 cm.

B) 3 dias após a inoculação do agente abiótico: observar as esferas de Sephadex (SE) dispersas na hemocele do inseto. Barra = 0,5 cm.

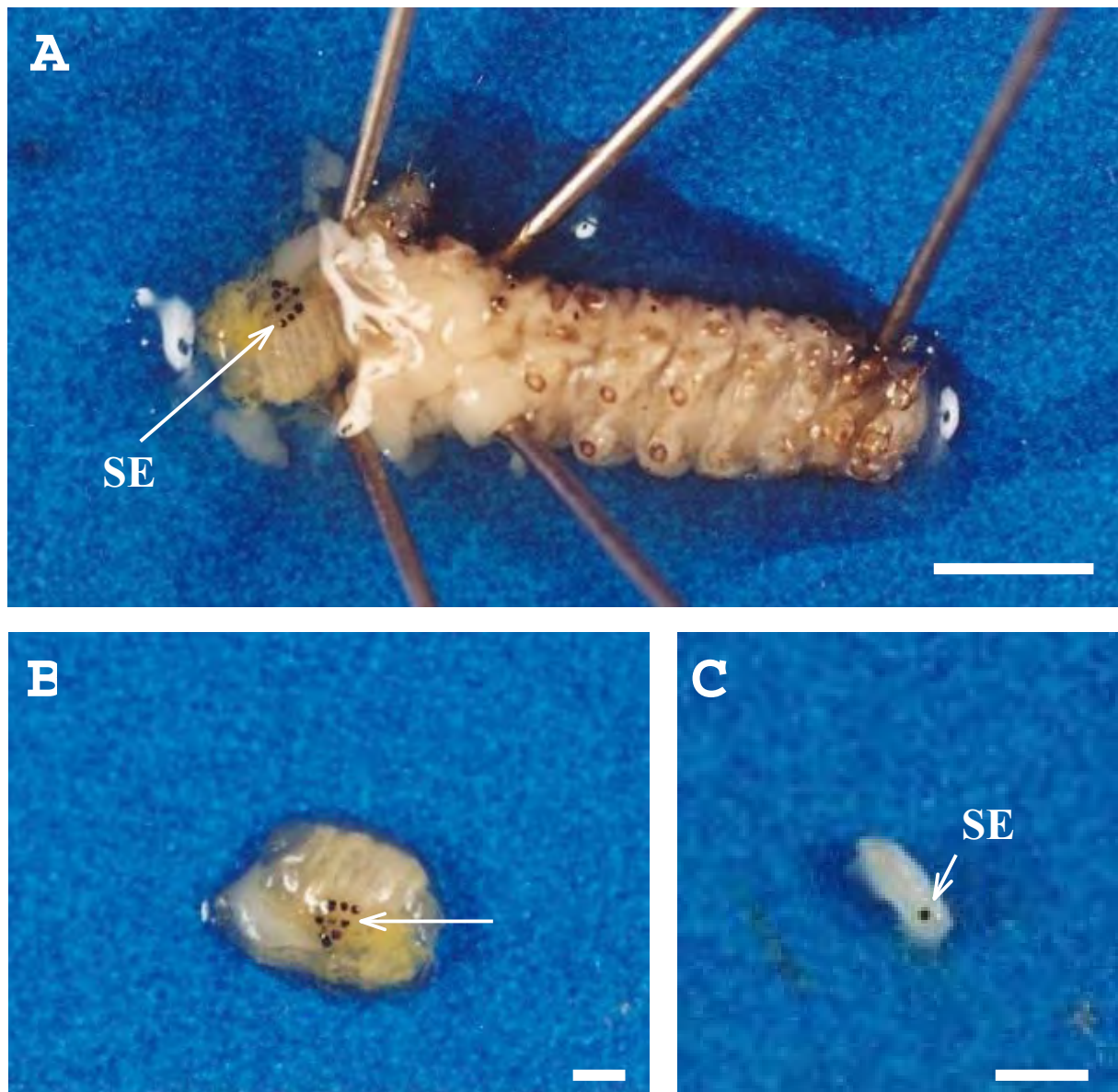


FIGURA 3 - Larvas de *D. saccharalis* não parasitadas, inoculadas com esferas de Sephadex (Grupo Se)

A) Figura mostrando esferas de Sephadex (SE) após 6 dias de inoculação, concentrando-se na região posterior do inseto. Barra = 0,5 cm.

B) Detalhe da massa de esferas de Sephadex (SE) melanizada. Barra = 1 mm.

C) Detalhe mostrando esfera de Sephadex (SE) individualizada. Barra = 1 mm.

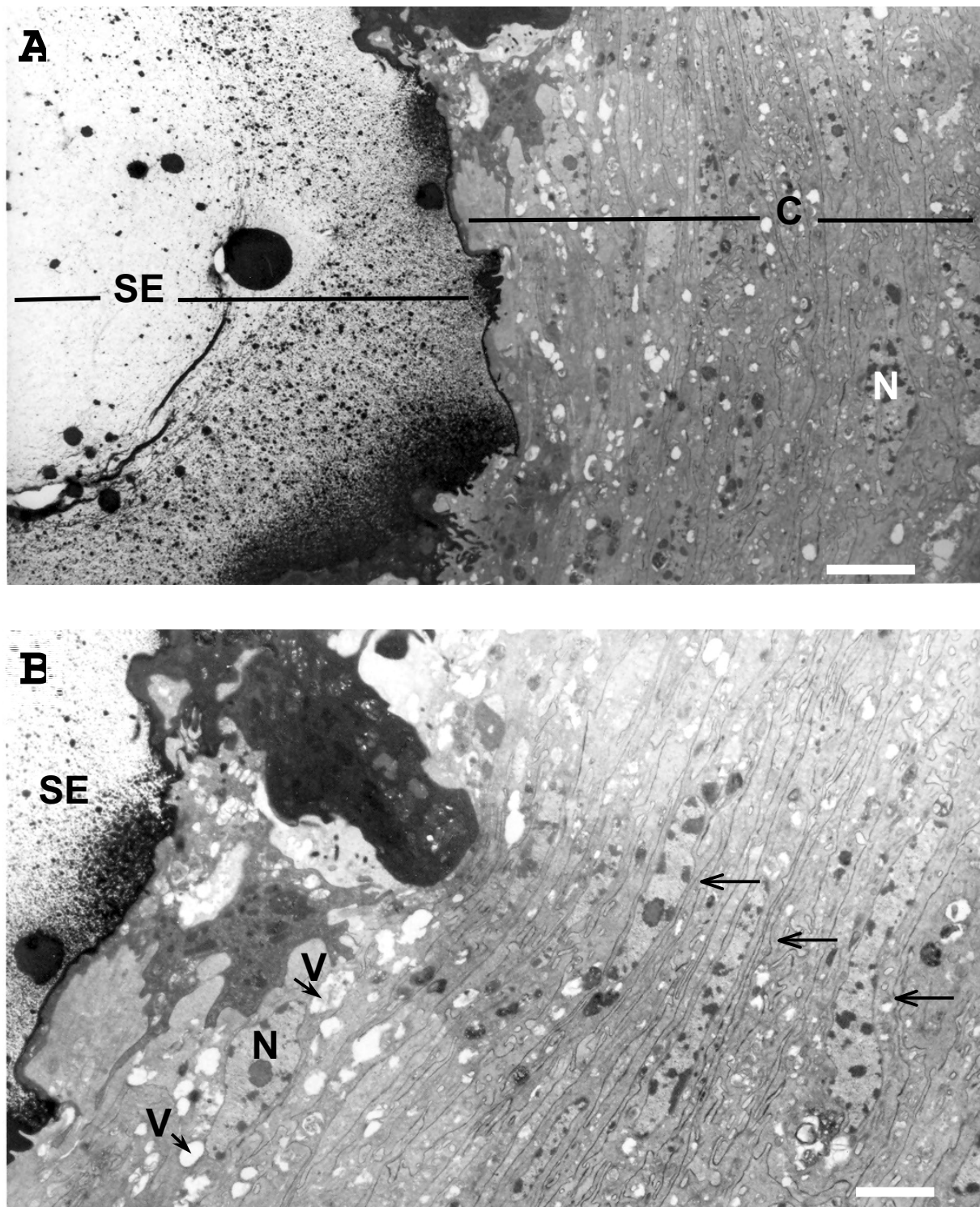


FIGURA 4 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação

A) Aspecto geral da cápsula (C) ao redor da esfera de Sephadex (SE), constituída por células achatadas interpretadas como plasmatócitos. Núcleo (N) do plasmatócito. Barra = 5 µm.

B) Detalhe da figura anterior mostrando região interna da cápsula. Observar os plasmatócitos (setas) e a presença de células eletron-densas adjacentes à cápsula, sem diferenciação precisa

dos constituintes celulares. Observar também vacúolos com conteúdo heterogêneo (V). Núcleo (N); esfera de Sephadex (SE). Barra = 2,5 μm .

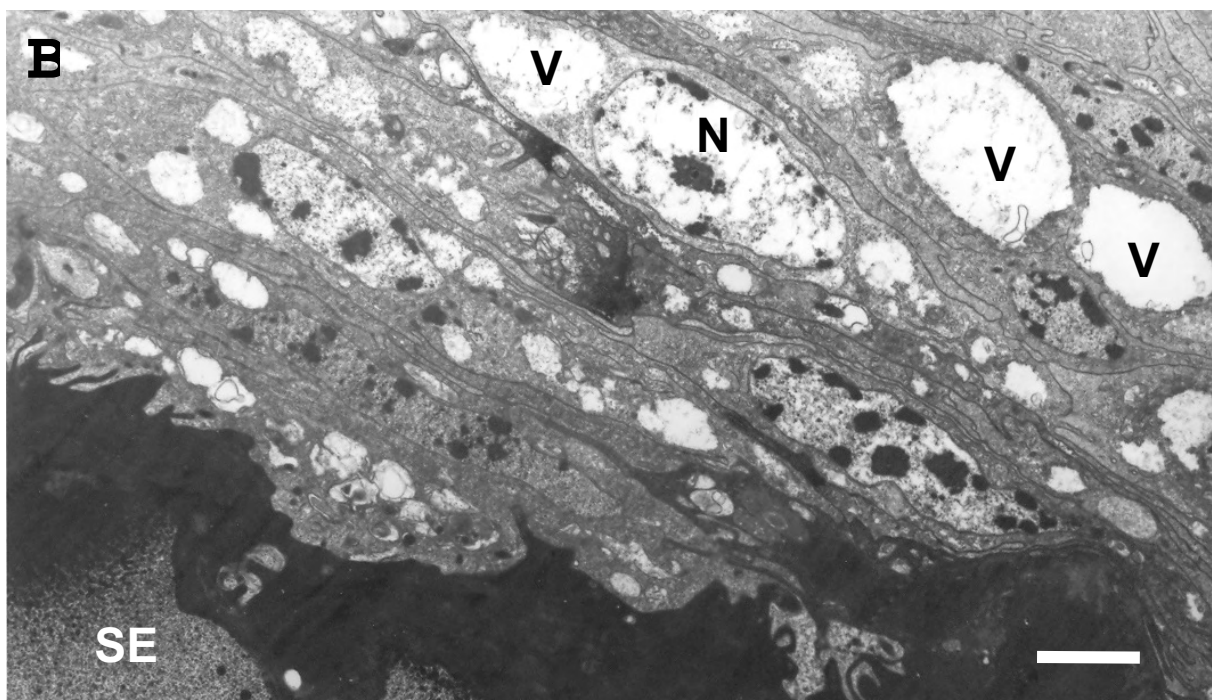
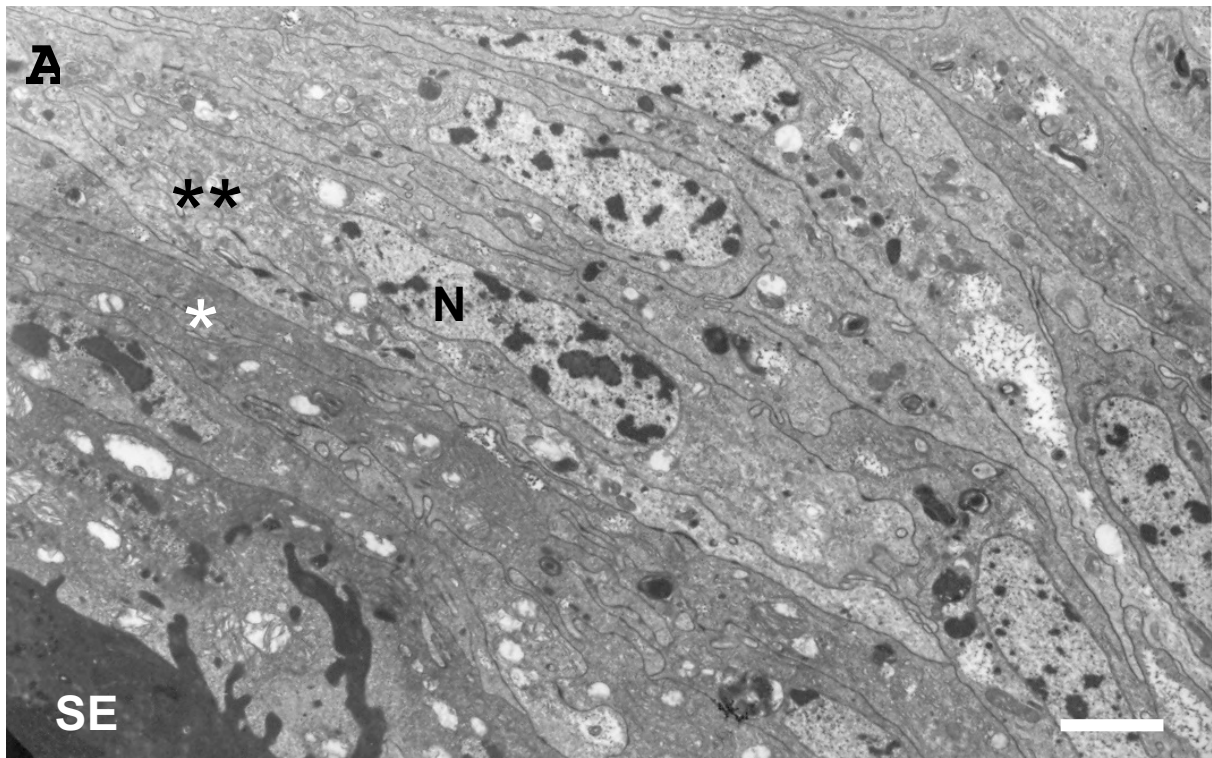


FIGURA 5 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação

A) Vista geral da região interna da cápsula, mostrando que os PL em contato direto com a esfera apresentavam-se mais contrastados (*) e à medida que se distanciavam da esfera seus citoplasmas tornavam-se menos densos (**). Núcleo do PL (N); esfera de Sephadex (SE).

B) Detalhe mostrando PL da camada mais interna da cápsula, com citoplasma mais denso e com vacúolos de conteúdo heterogêneo (V). Núcleo (N); esfera de Sephadex (SE).

Barra (Fig. A e B) = 2 μ m.

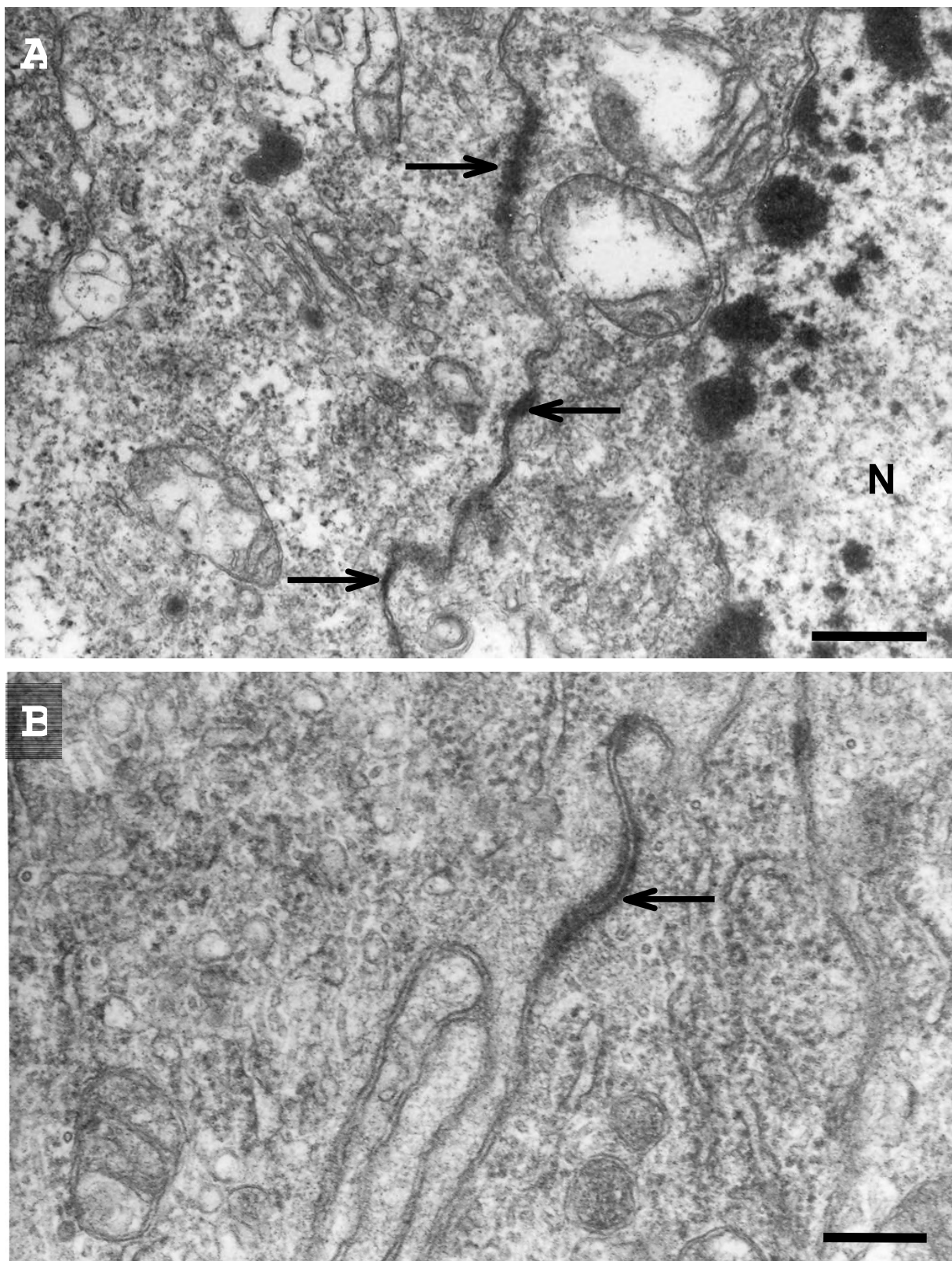


FIGURA 6 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação

A) Detalhe mostrando desmossomos (setas) entre plasmatócitos adjacentes. Núcleo (N).

Barra = 0,5 μ m.

B) Detalhe mostrando desmossomos (seta). Barra = 0,25 μ m.

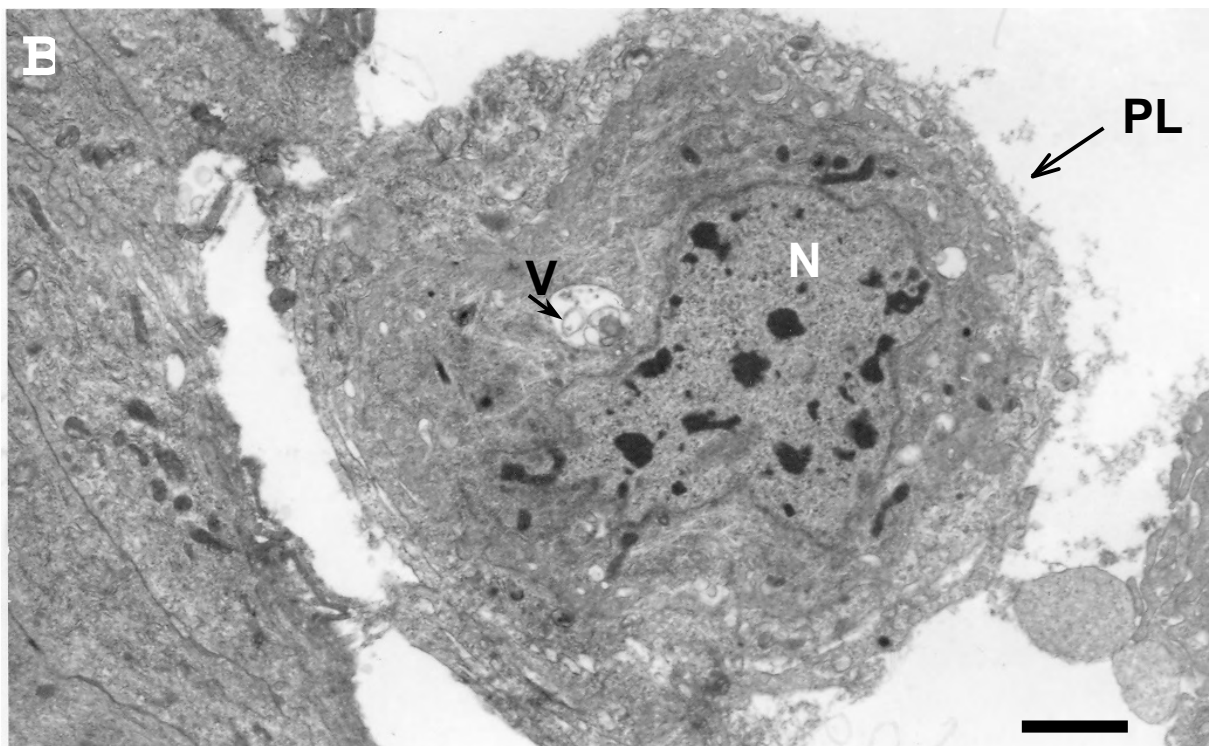
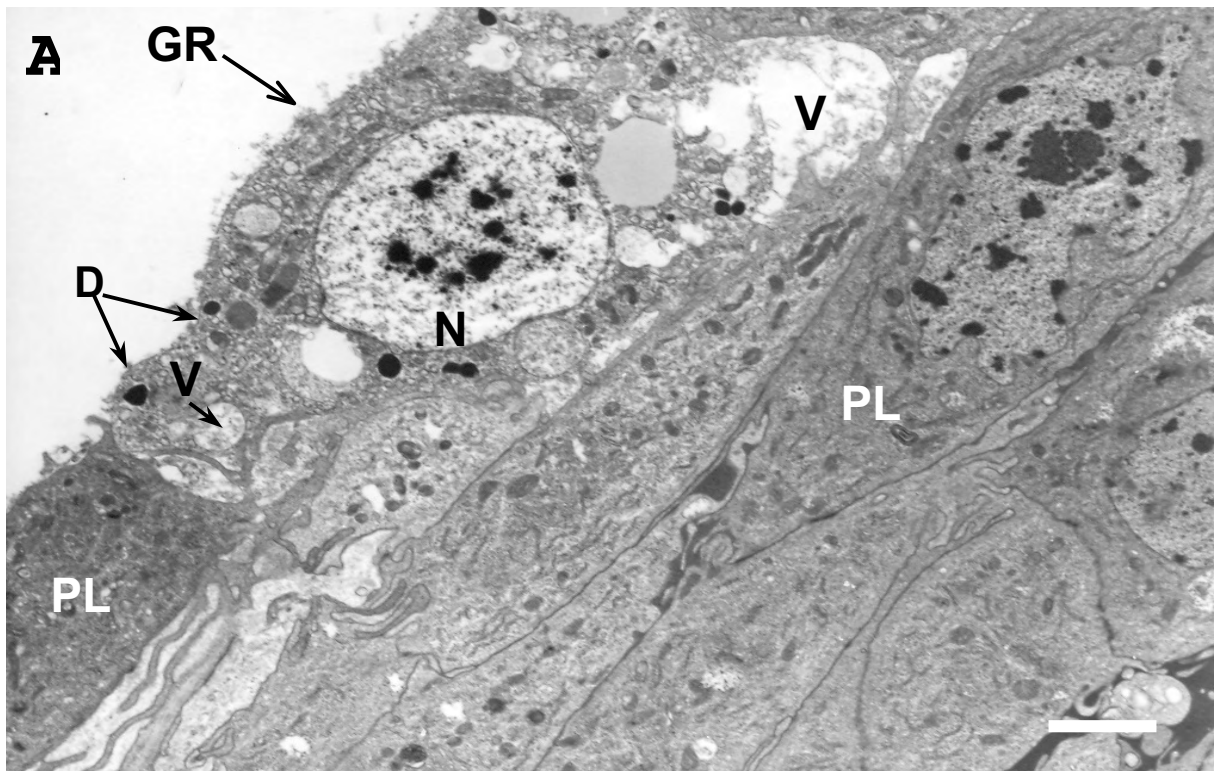


FIGURA 7 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação

A) Granulócito (GR) na camada externa da cápsula, exibindo vacúolos de conteúdo heterogêneo (V) e grânulos densos (D). Observar também plasmatócito (PL) menos achatado. Núcleo (N). Barra = 2 μ m.

B) Plasmatócito (PL) mais arredondado na camada externa da cápsula, notar vacúolo de conteúdo heterogêneo (V). Núcleo (N). Barra = 2 μ m.

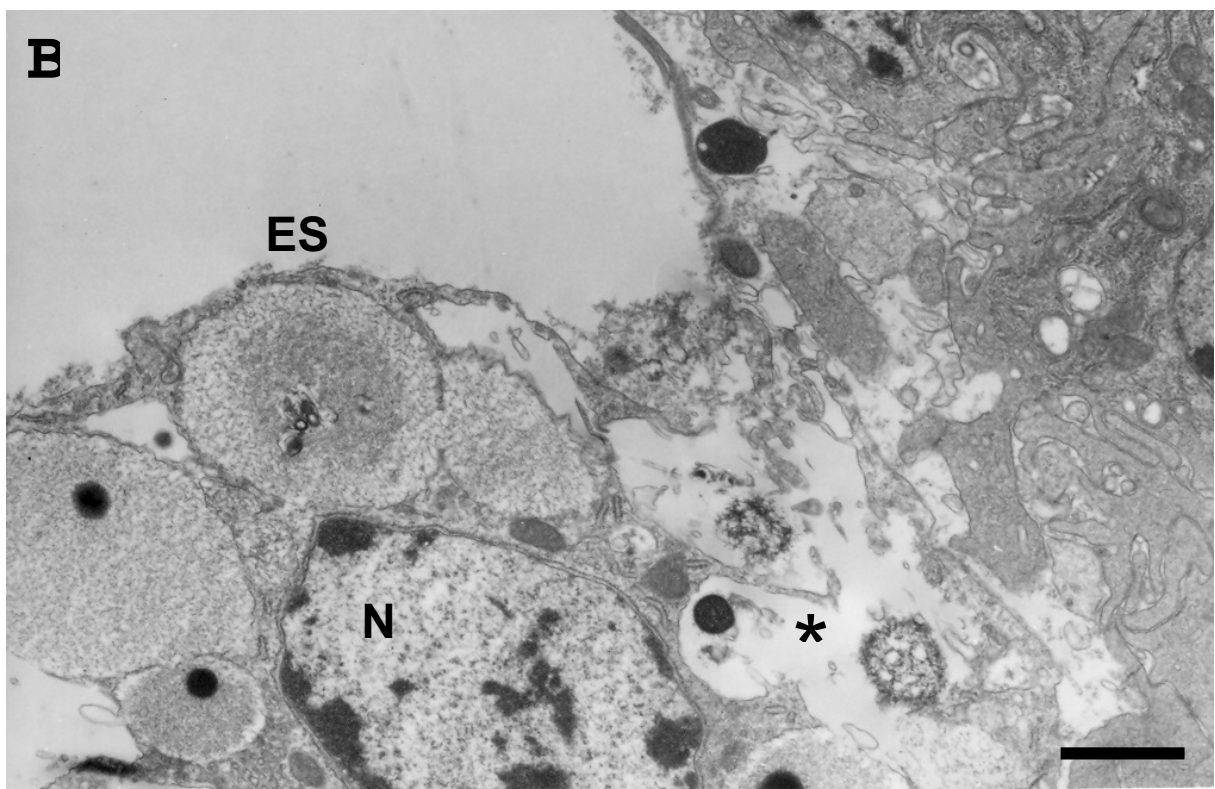
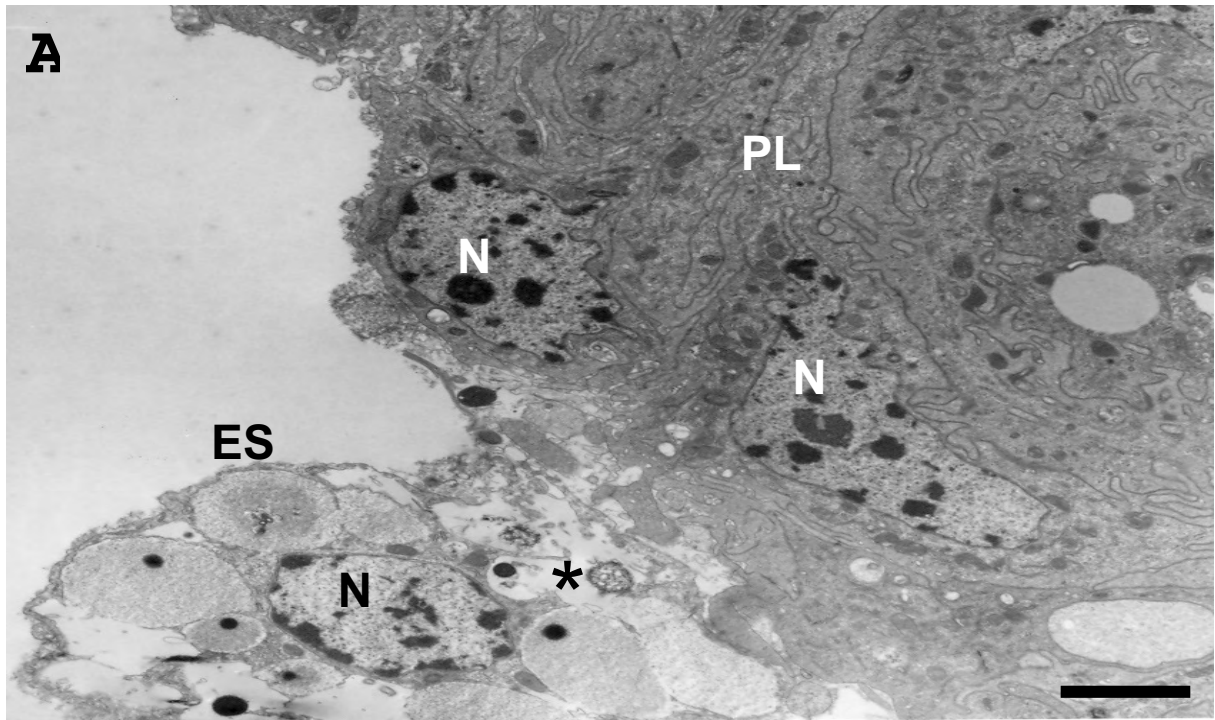
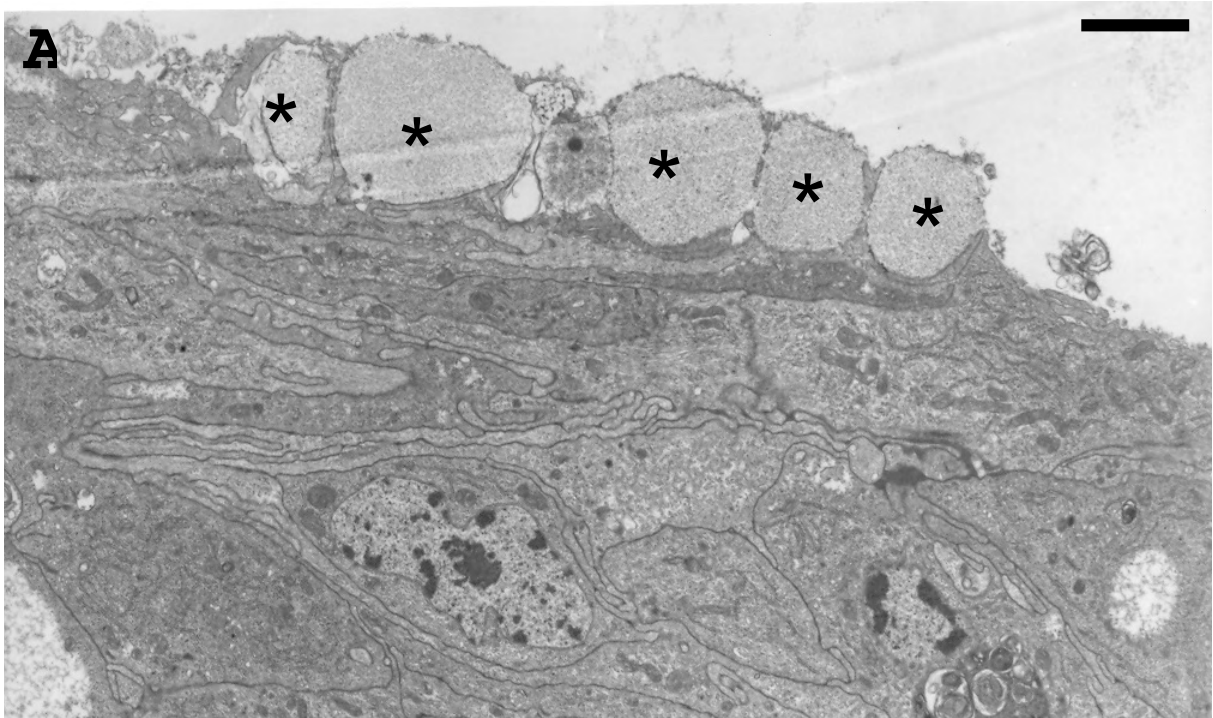


FIGURA 8 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação

A) Esferulócito (ES) na porção externa da cápsula, onde se observa rarefação e fusão das esférulas (*). Notar que os núcleos (N) dos plasmatócitos (PL) mais superficiais são pouco achatados. Barra = 2 μ m.

B) Detalhe mostrando esferulócito (ES) na camada externa da cápsula. Notar a degranulação celular (*). Núcleo (N). Barra = 1 μ m.



B

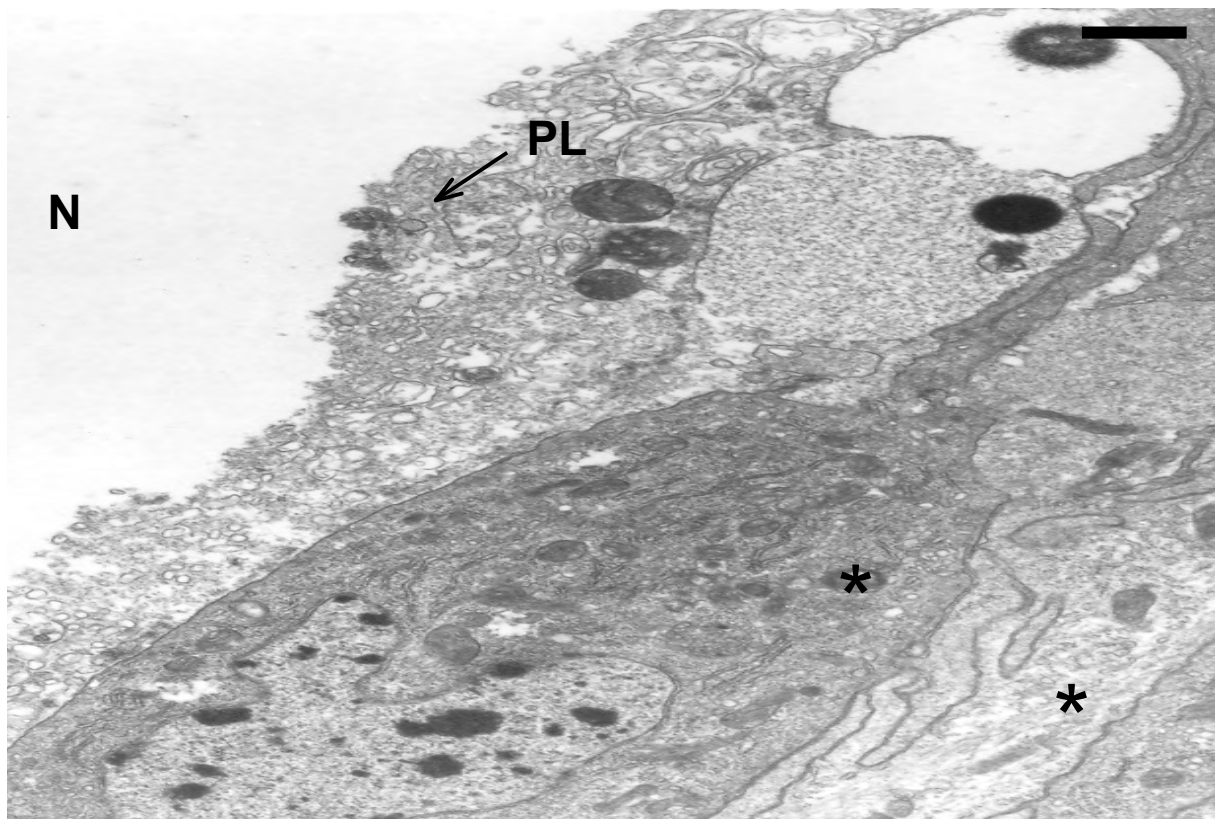


FIGURA 9 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação

A) Vista geral da camada externa da cápsula mostrando esférulas (*) soltas de esferulócitos. Barra = 2 μm .

B) Detalhe da porção final da cápsula mostrando esférulas (*) de restos de esferulócitos. Plasmatócito (PL) superficial com seu núcleo (N) de formato irregular. Barra = 1 μm .

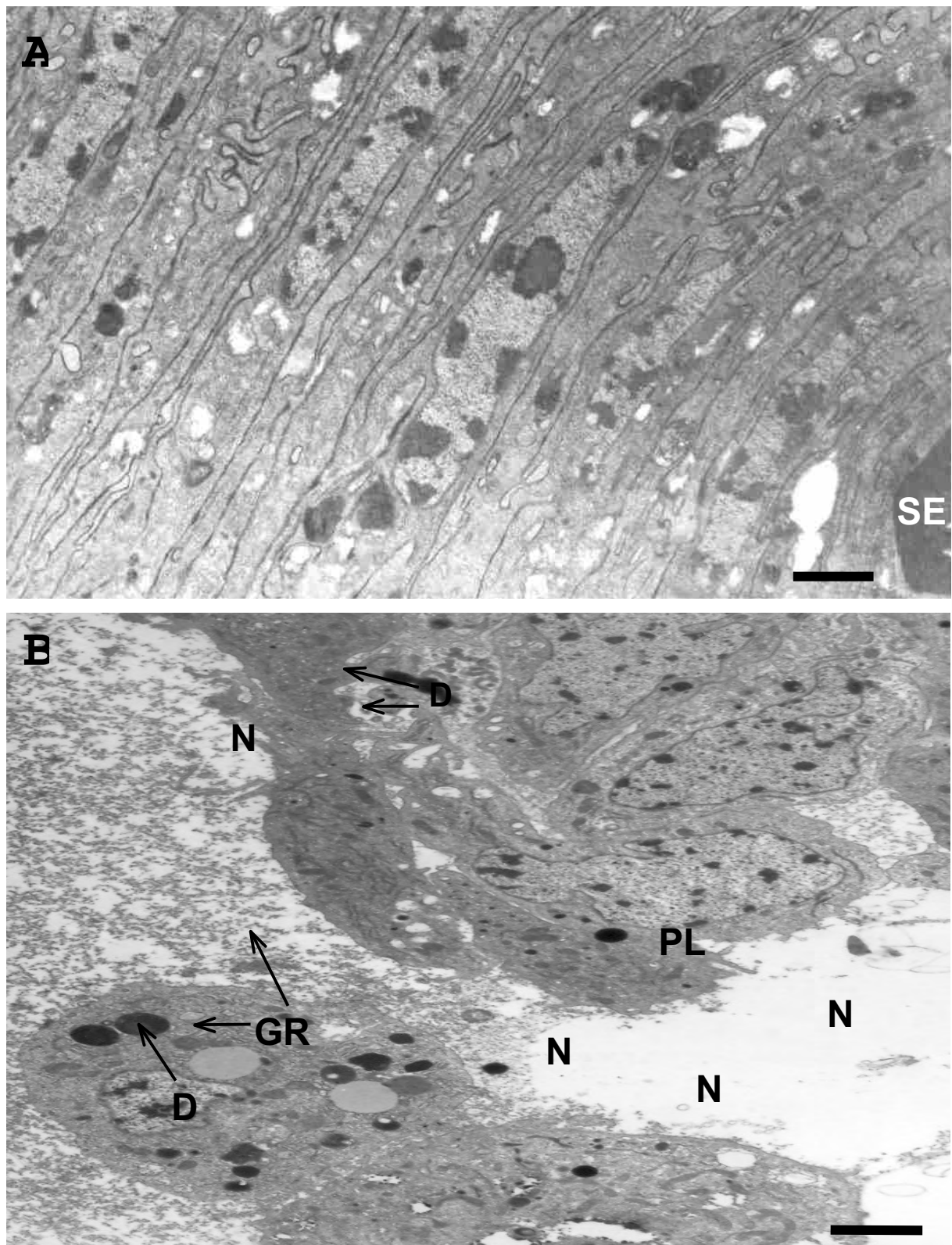


FIGURA 10 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Aspecto geral da cápsula em torno da esfera de Sephadex (SE). Barra = 2 µm.

B) Granulócito (GR) presente na porção final da cápsula. Núcleo (N), plasmatócitos (PL), grânulos densos (D). Barra = 2,5 µm.

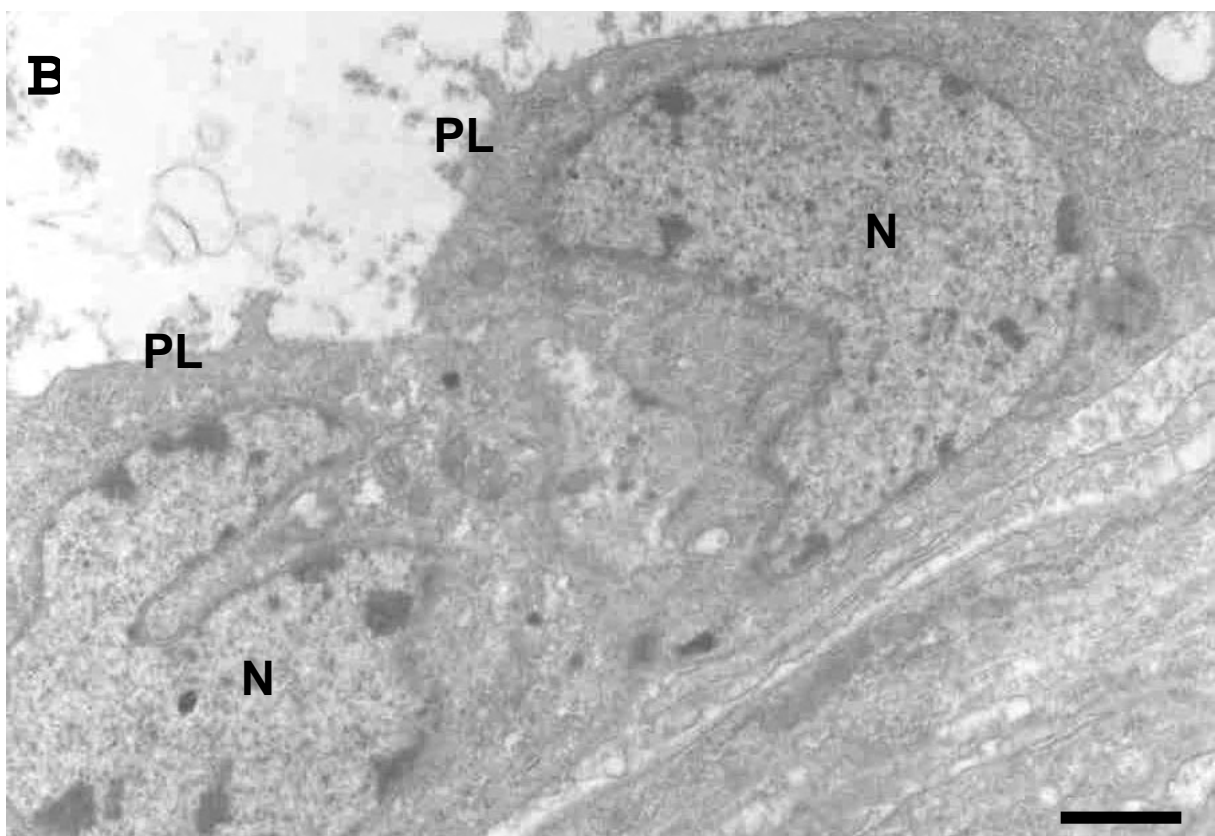
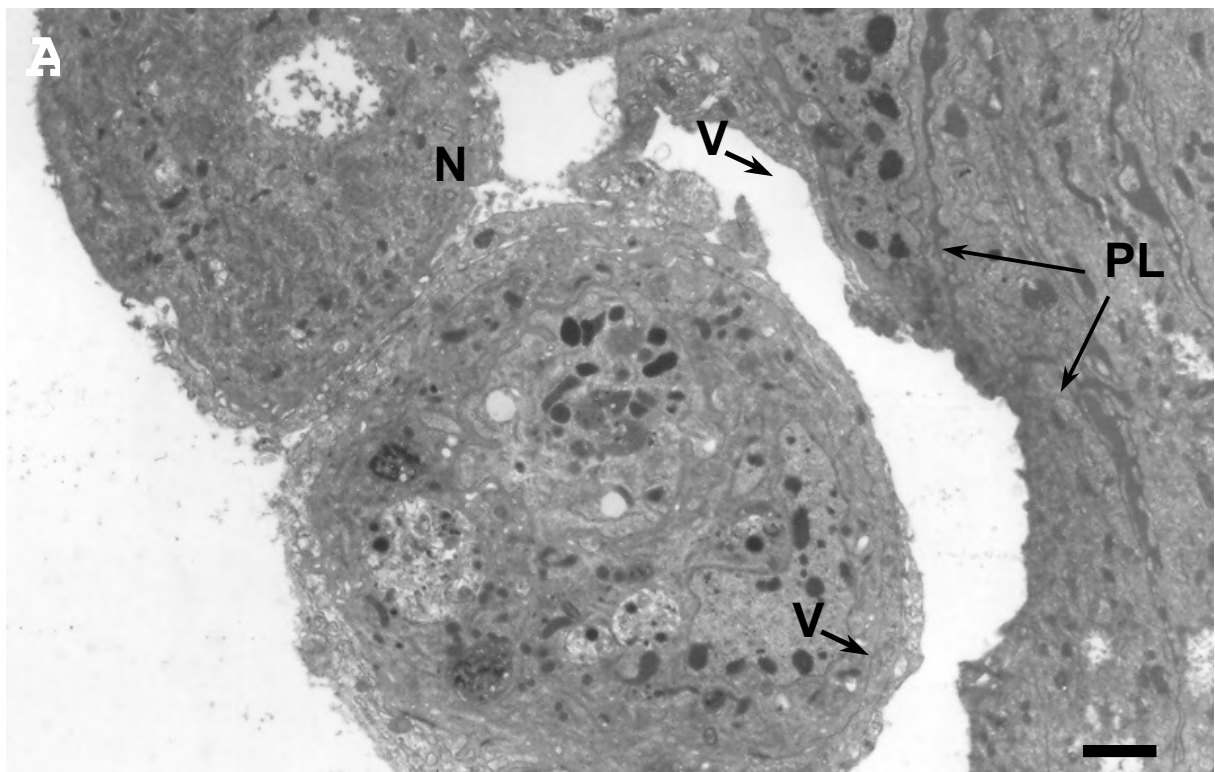


FIGURA 11 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 2 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Plasmatócitos (PL) na porção final da cápsula, exibindo grandes vacúolos (V). Núcleo (N). Barra = 2 μm .

B) Plasmatócitos (PL) arredondados na porção final da cápsula. Núcleo (N). Barra = 1 μm .

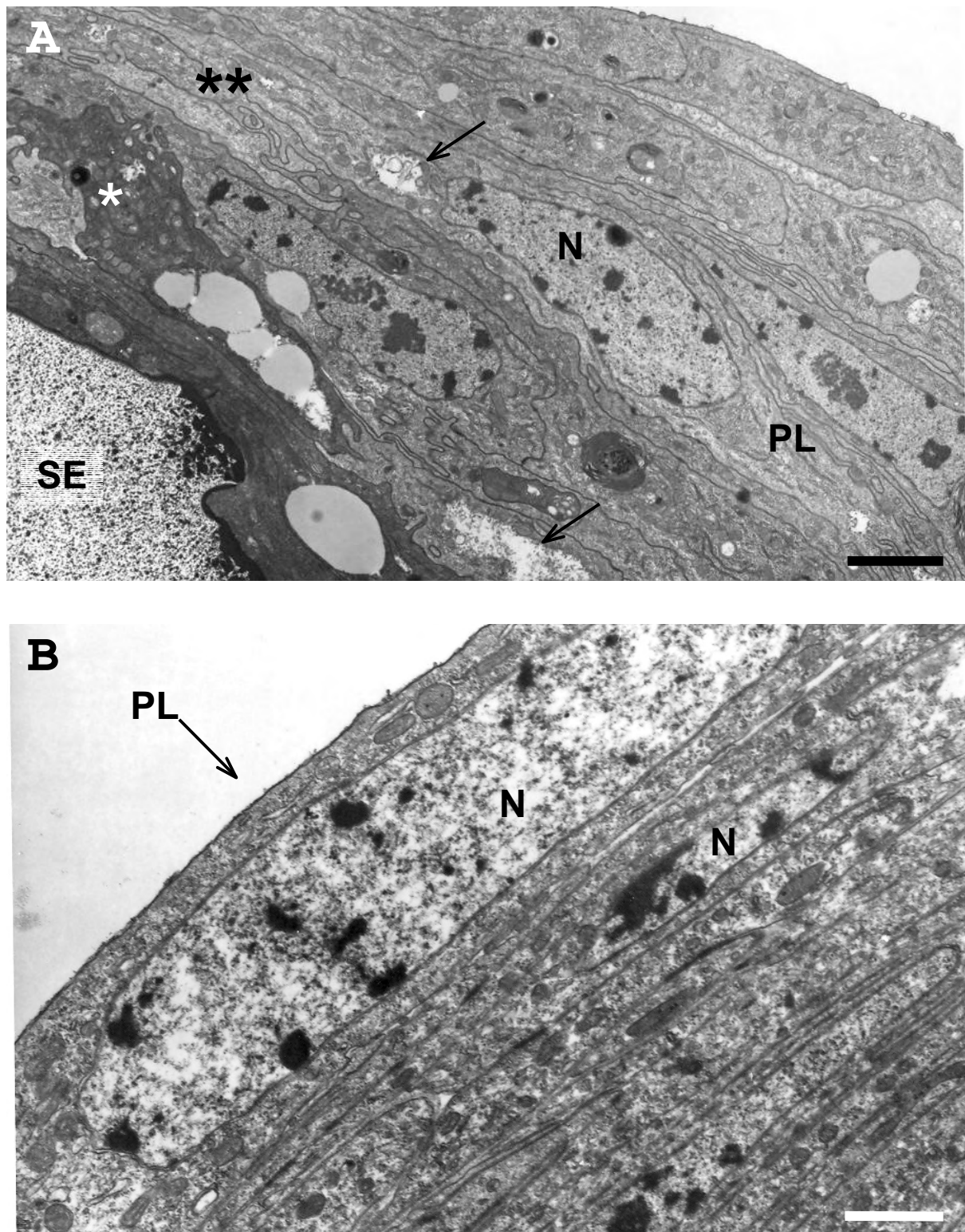


FIGURA 12 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sphadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação

A) Aspecto geral da cápsula. Observar região interna mais contrastada (*) e porção posterior menos contrastada (**). Esfera de Sphadex (SE); plasmatócito (PL); núcleo (N); vacúolo (seta). Barra = 2 μ m.

B) Detalhe mostrando porção final da cápsula. Plasmatócito (PL); núcleo (N). Barra = 1 μm .

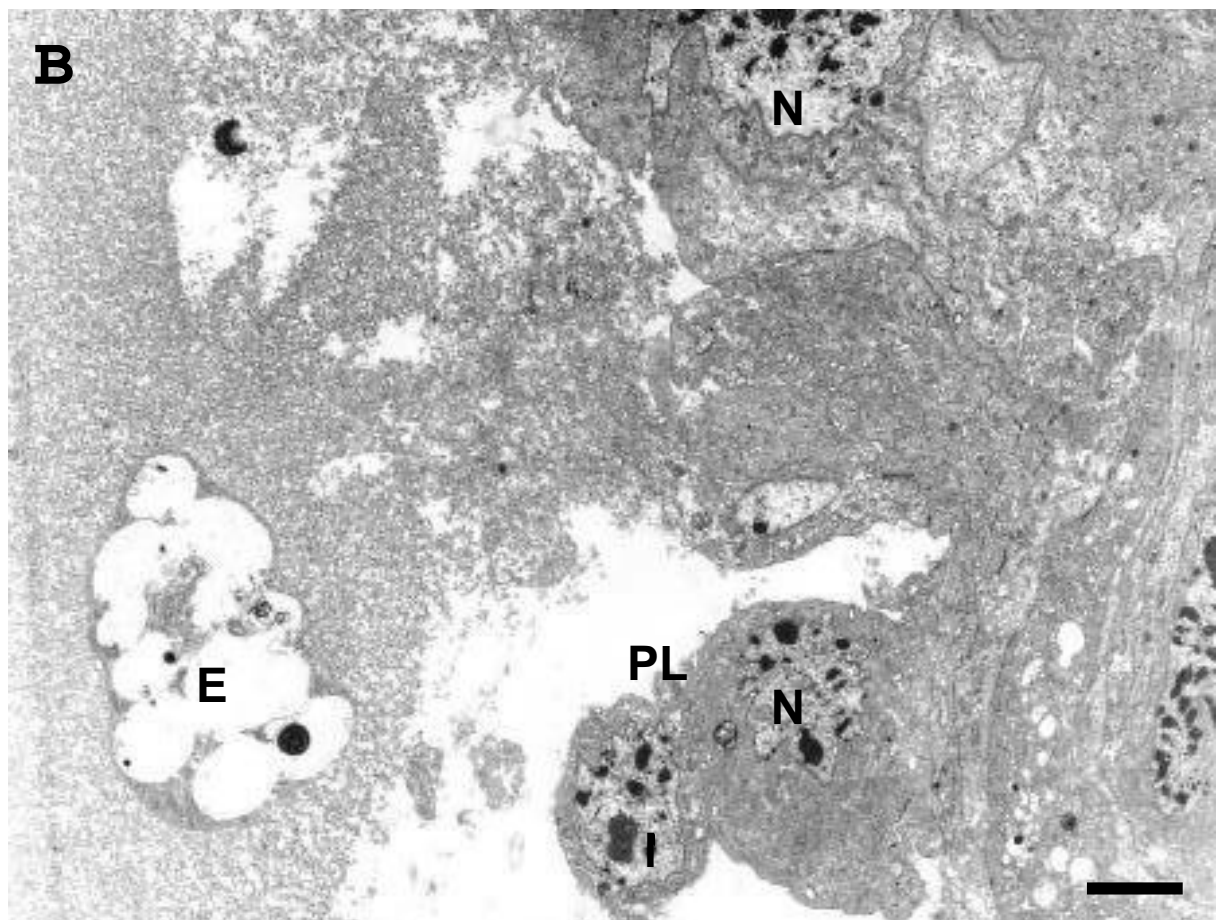
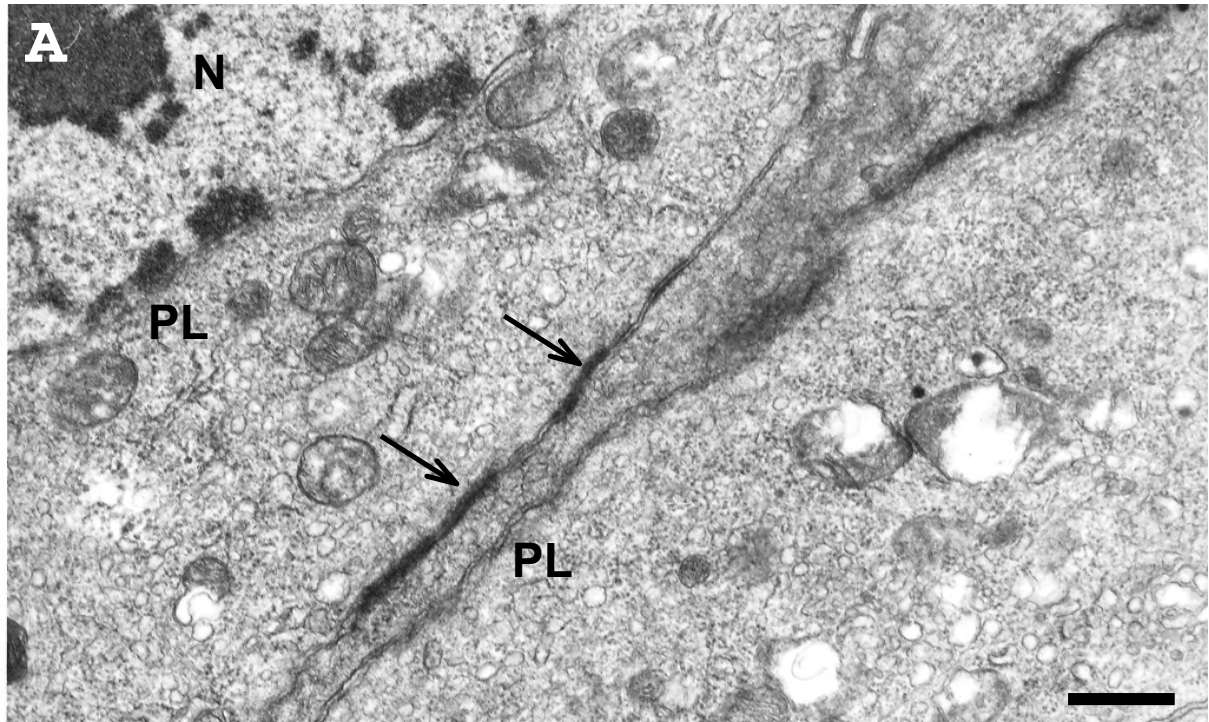


FIGURA 13 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação

A) Desmosomas (setas) entre plasmatócitos (PL) adjacentes. Núcleo (N). Barra = 0,5 μm .

B) Esferulócito (ES) na porção final da cápsula. Plasmatócito (PL); núcleo (N). Barra = 2 μm .

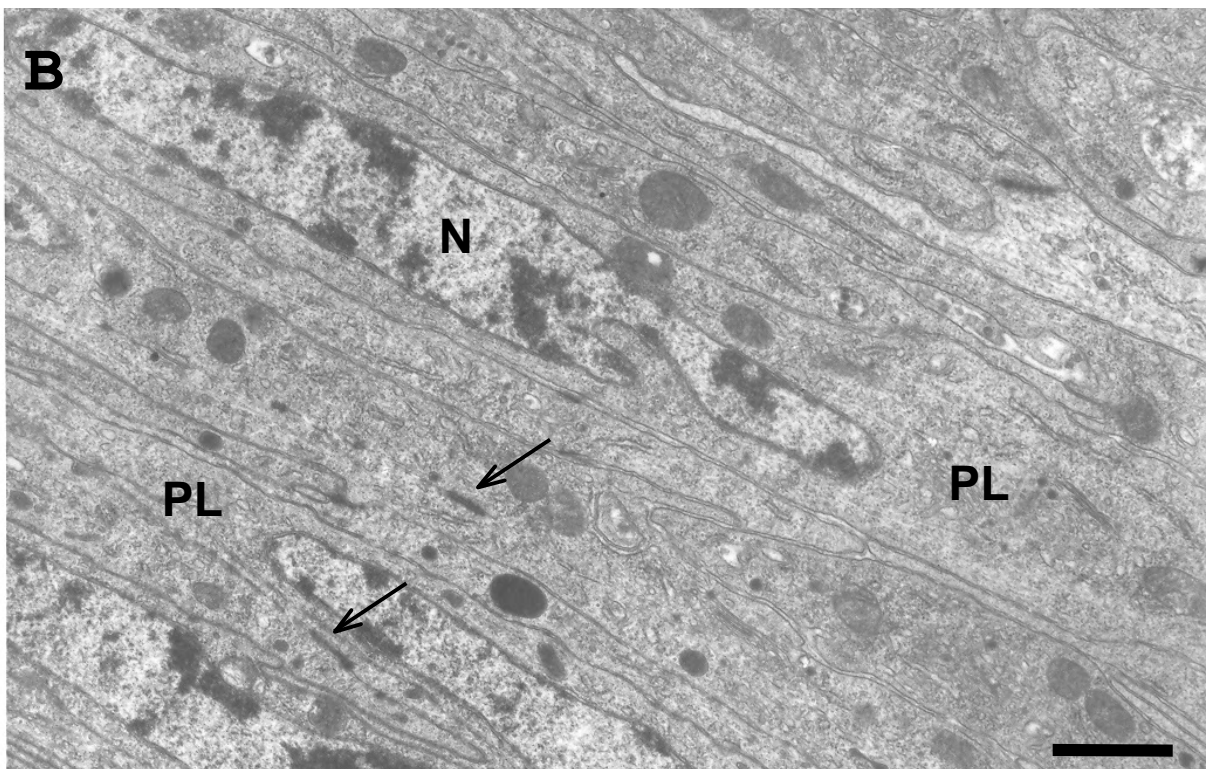
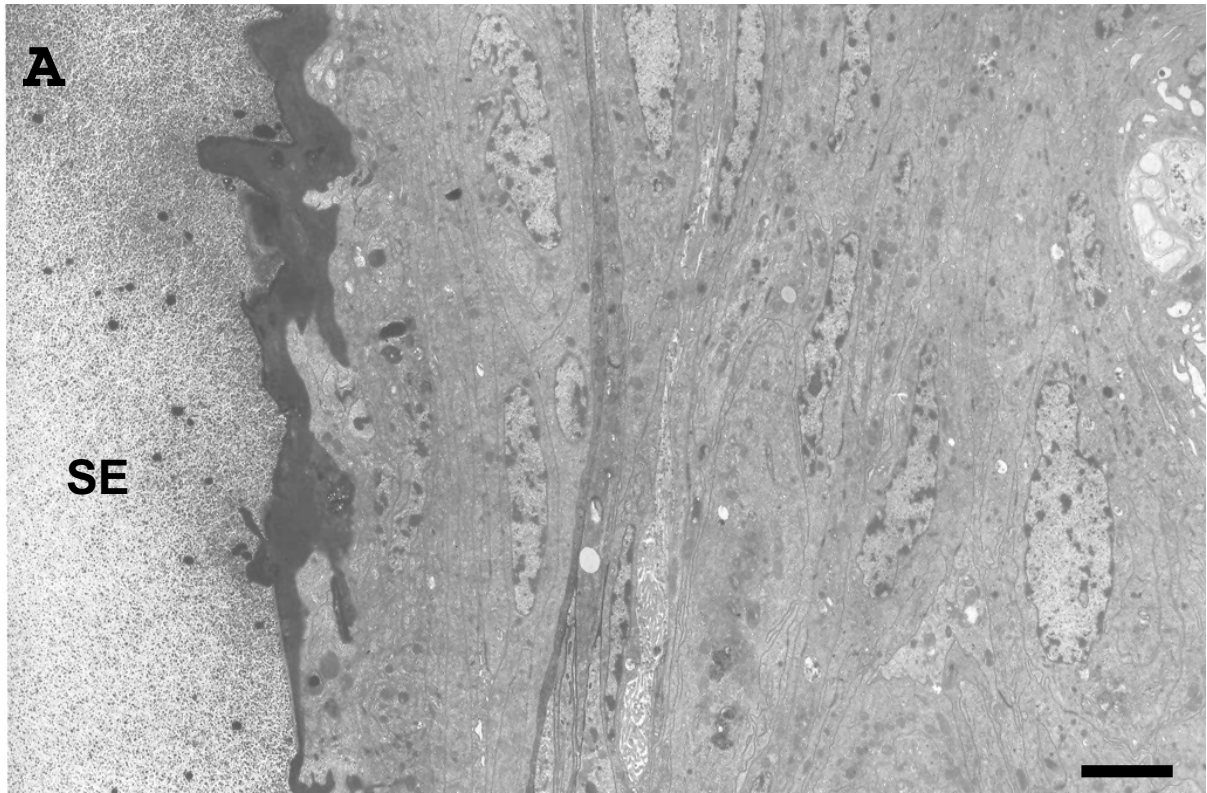


FIGURA 14 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Aspecto geral da cápsula constituída por plasmatócitos achatados em múltiplas camadas. Esfera de Sephadex (SE). Barra = 1 μm .

B) Detalhe mostrando constituição da cápsula. Observar desmossomos (setas) entre plasmatócitos (PL) justapostos. Núcleo (N). Barra = 1 μ m.

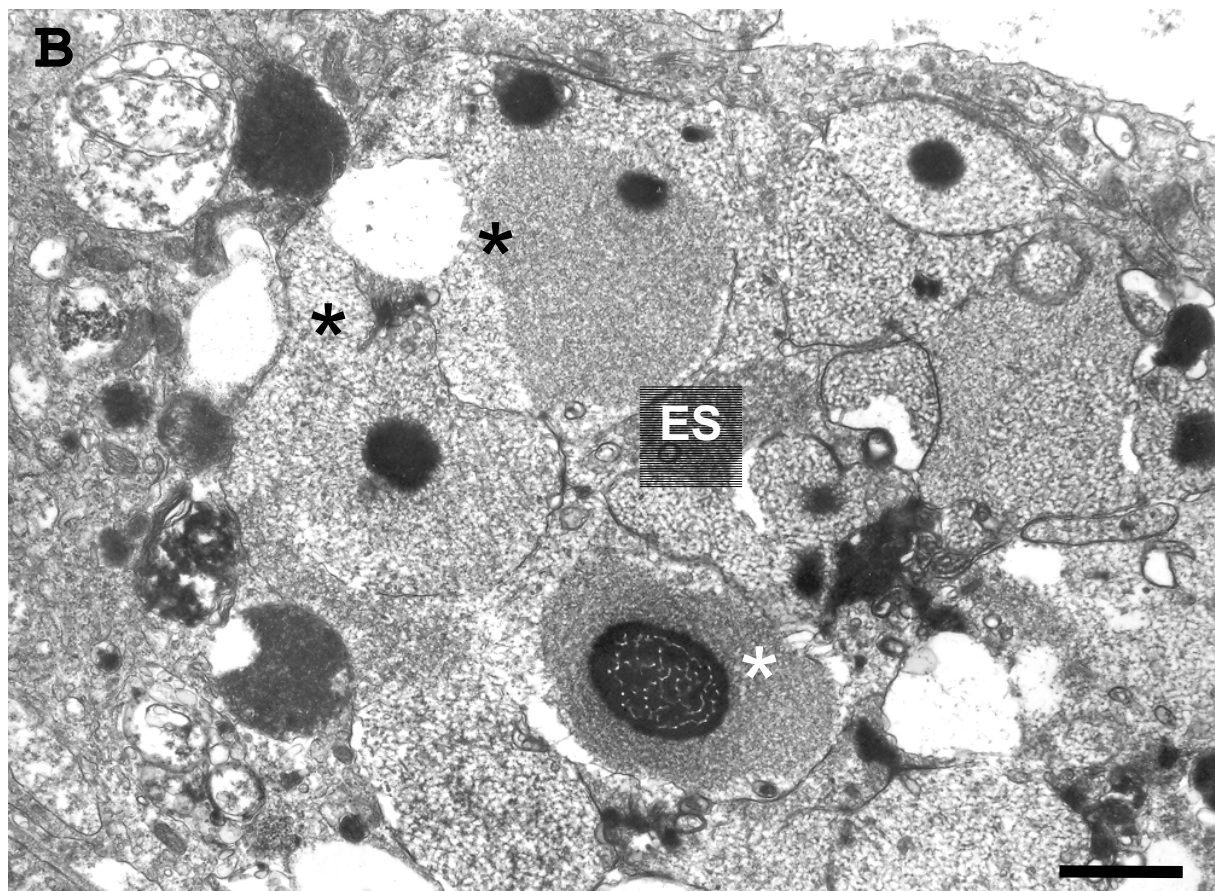


FIGURA 15 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Porção final da cápsula mostrando plasmatócitos (PL) mais arredondados. Núcleo (N); esfera de Sephadex (SE). Barra = 3 μ m.

B) Esferulócito (ES) na porção externa da cápsula. Esférulas (*). Barra = 1 μ m.

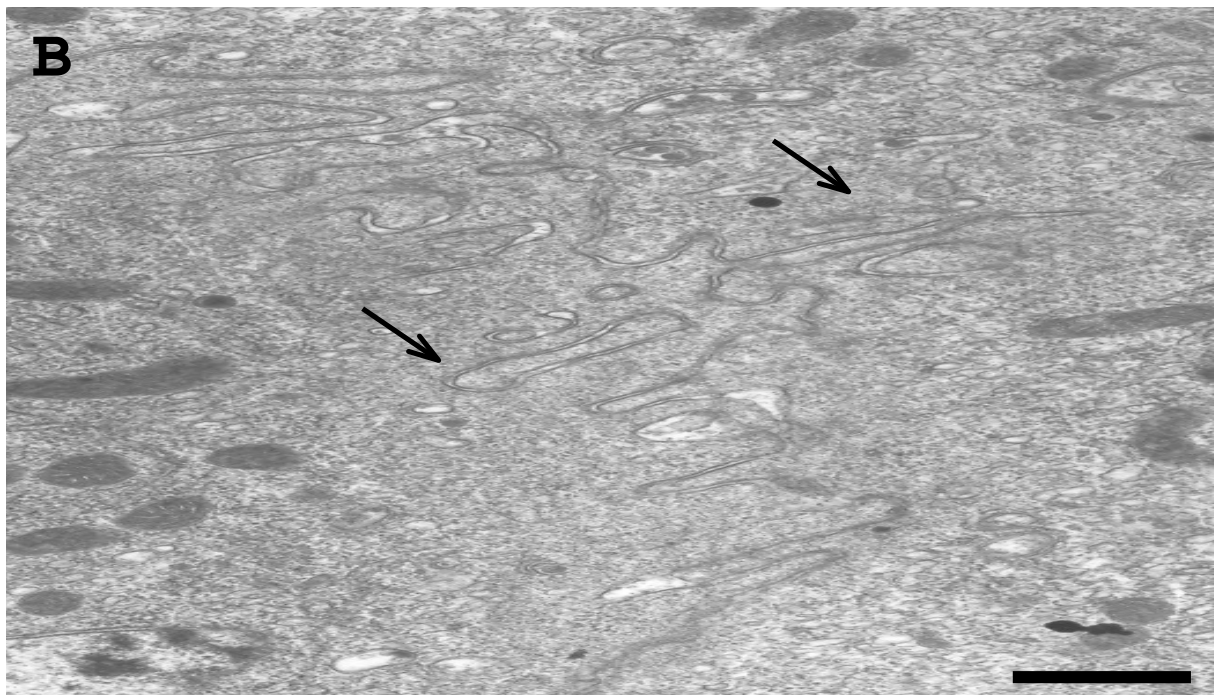
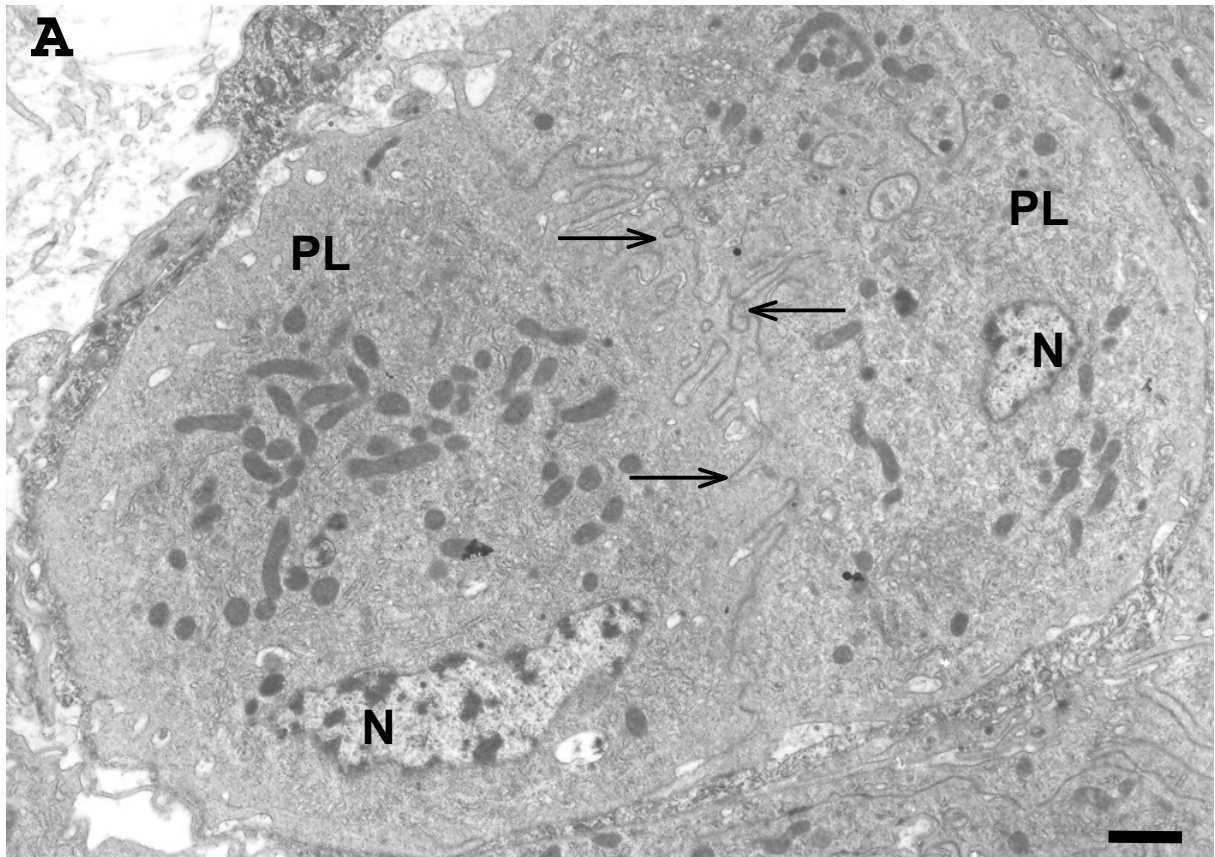


FIGURA 16 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Plasmatócitos (PL) na superfície da cápsula, arredondados e em íntima associação por interdigitações (setas). Núcleo (N). Barra = 1 μ m.

B) Detalhe mostrando interdigitações entre as membranas plasmáticas de plasmatócitos (setas) na superfície da cápsula. Barra = 1 μ m.

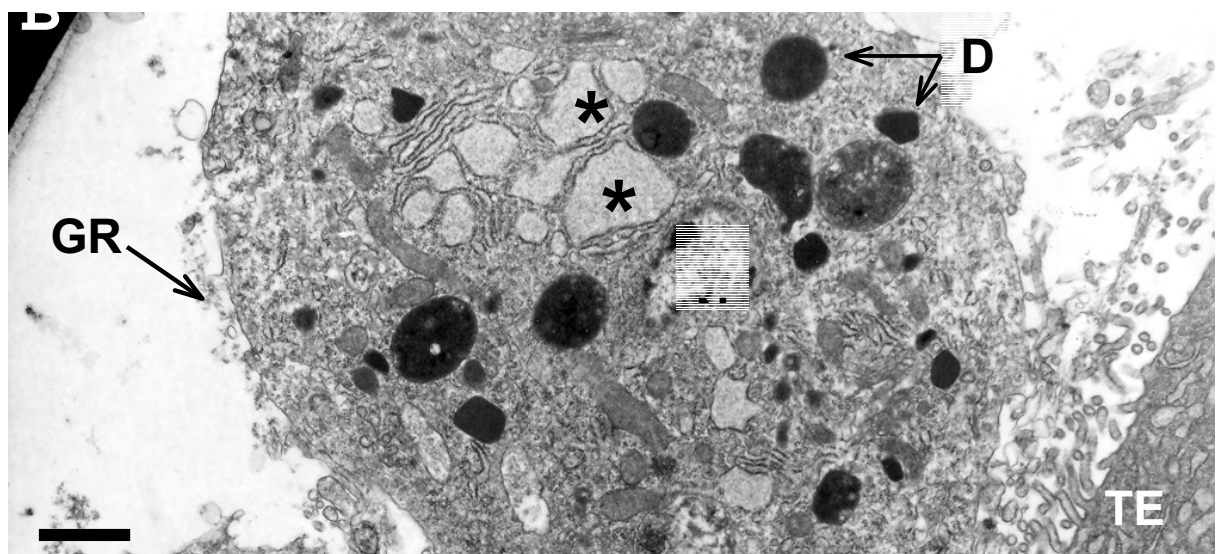
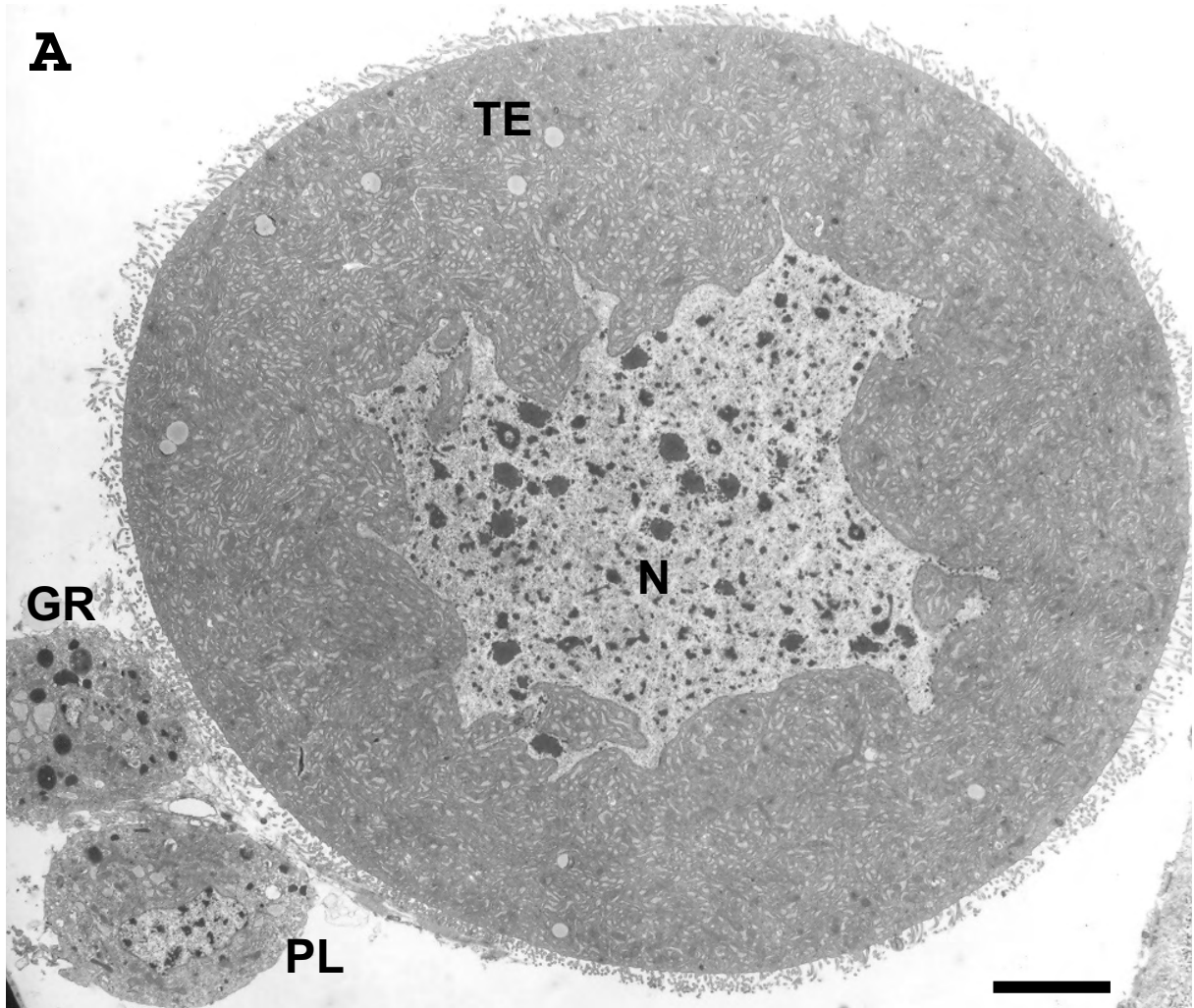
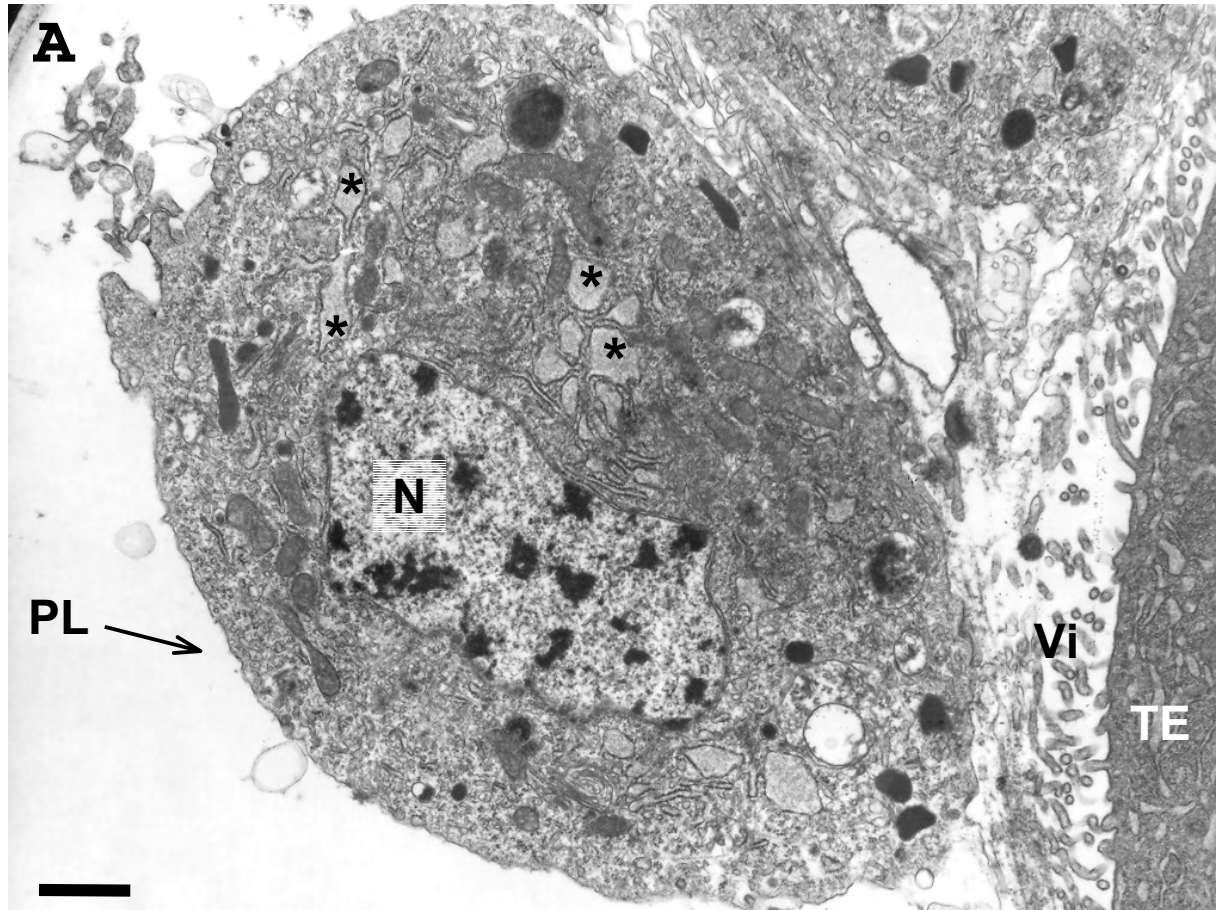


FIGURA 17 - Eletromicrografia (MET) de hemócitos e TE recuperados de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação das esferas e concomitante ao parasitismo

A) Vista geral de teratócito (TE) próximo à cápsula. Plasmatócitos (PL); granulócito (GR); núcleo (N). Barra = 5 μ m.

B) Granulócito (GR) com RER dilatados (*). Teratócito (TE); grânulo denso (D); núcleo (N). Barra = 1 μ m.



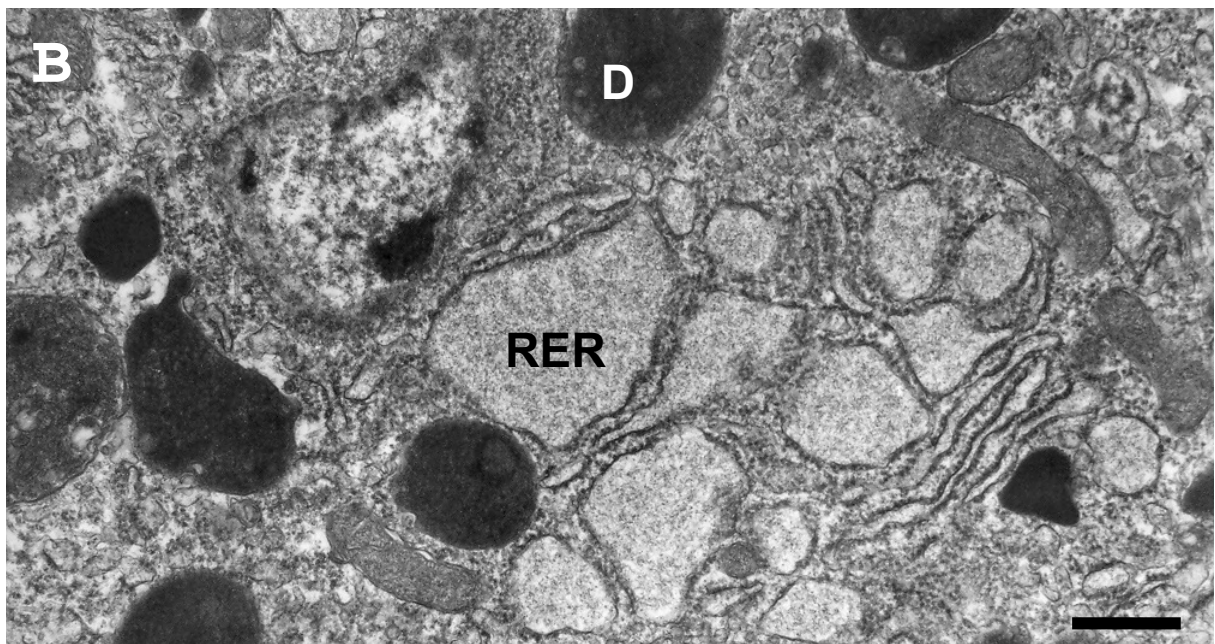
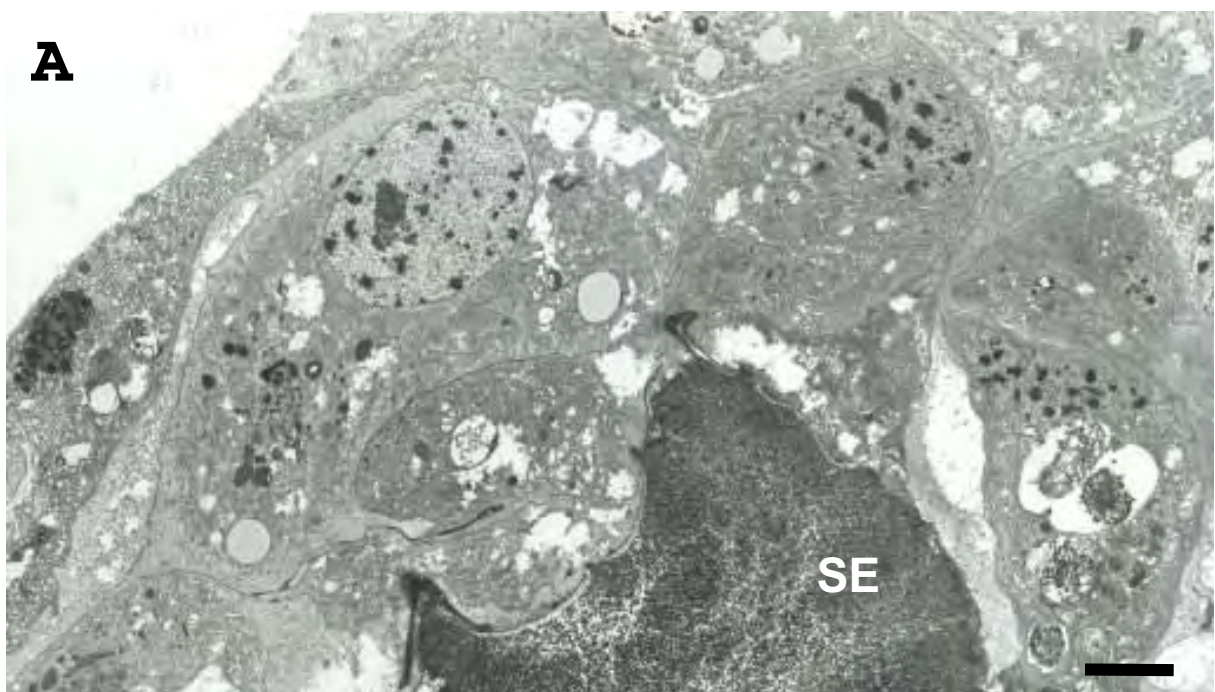


FIGURA 18 - Eletromicrografia (MET) de hemócitos e TE recuperados de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação das esferas e concomitante ao parasitismo

A) Detalhe da figura 17A, de plasmatócito (PL) próximo de teratócito (TE) com retículo endoplasmático rugoso dilatado (*). Vilosidades (Vi); núcleo (N). Barra = 1 μm .

B) Granulócito com retículo endoplasmático rugoso (RER) dilatados. Grânulo denso (D). Barra = 0,5 μm .



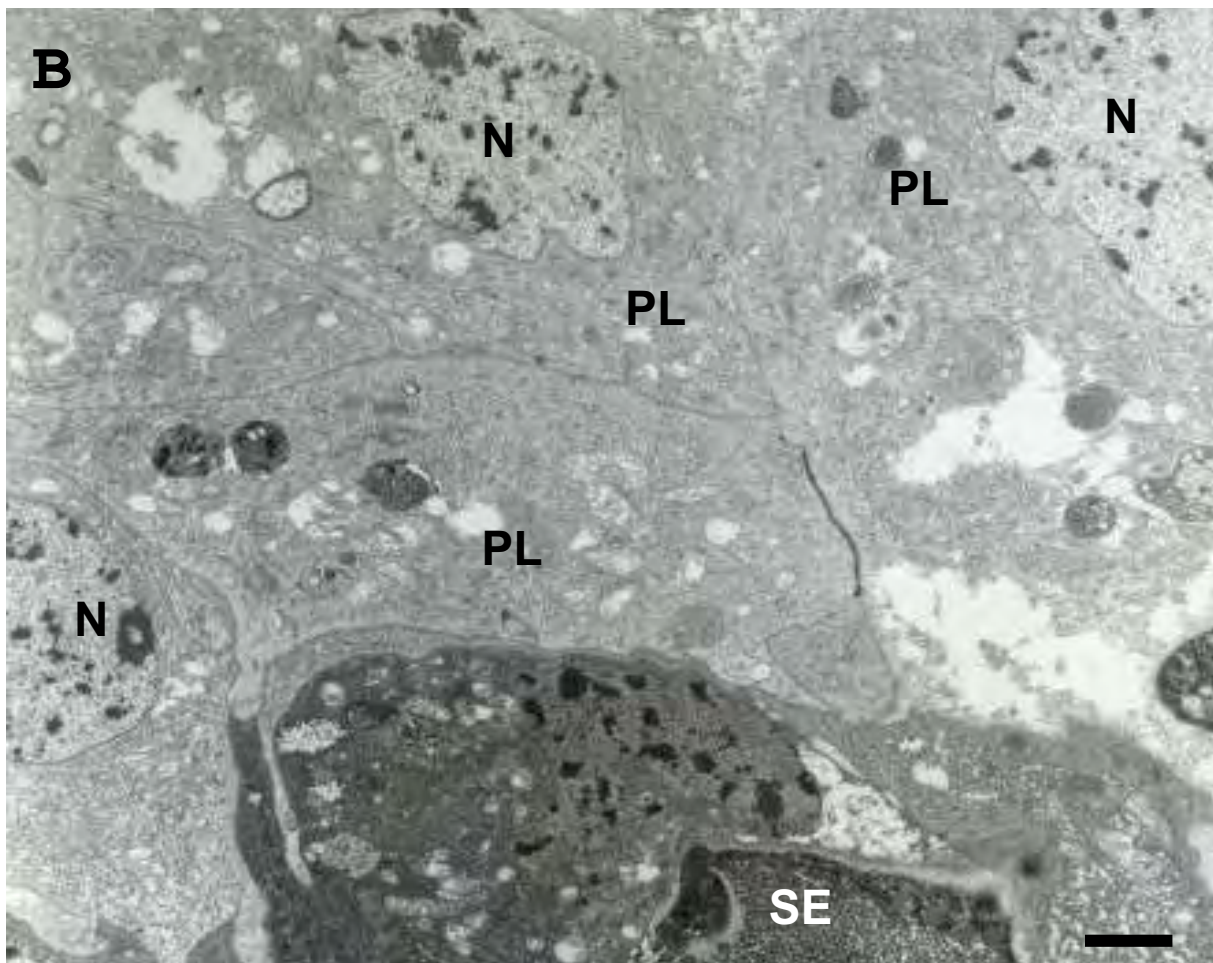
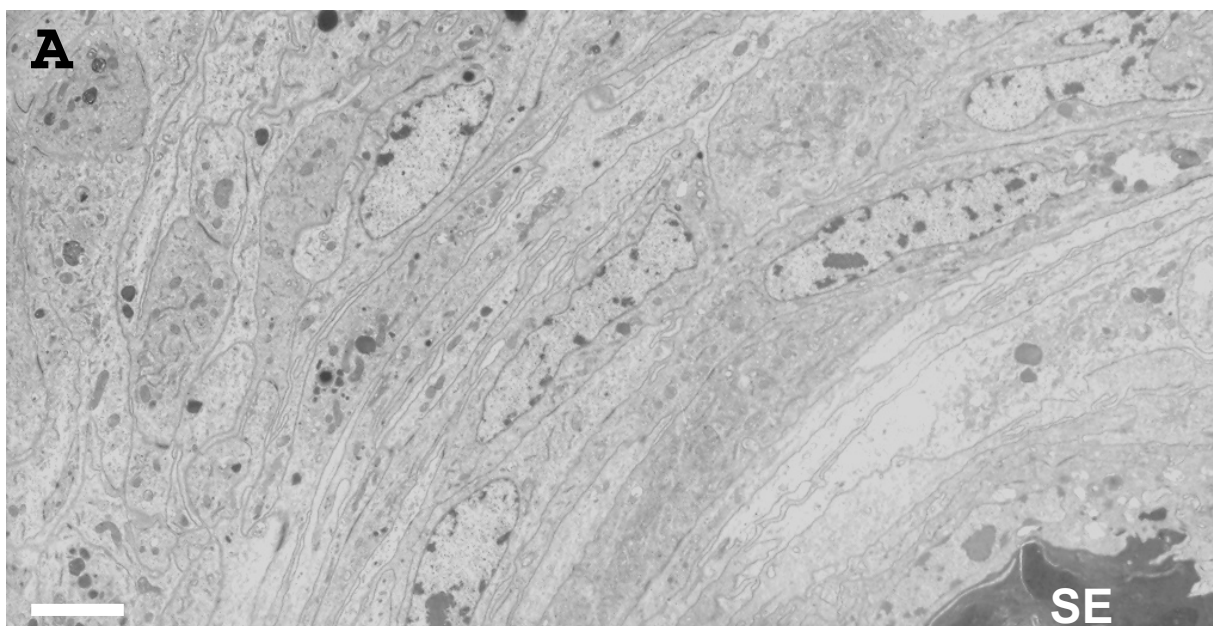


FIGURA 19 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sphadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 3 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Observar esfera de Sphadex (SE) no início da formação da cápsula. Barra = 3 μm .

B) Notar plasmatócitos (PL) que se dispunham mais frouxamente. Núcleo (N). Barra = 2 μm .



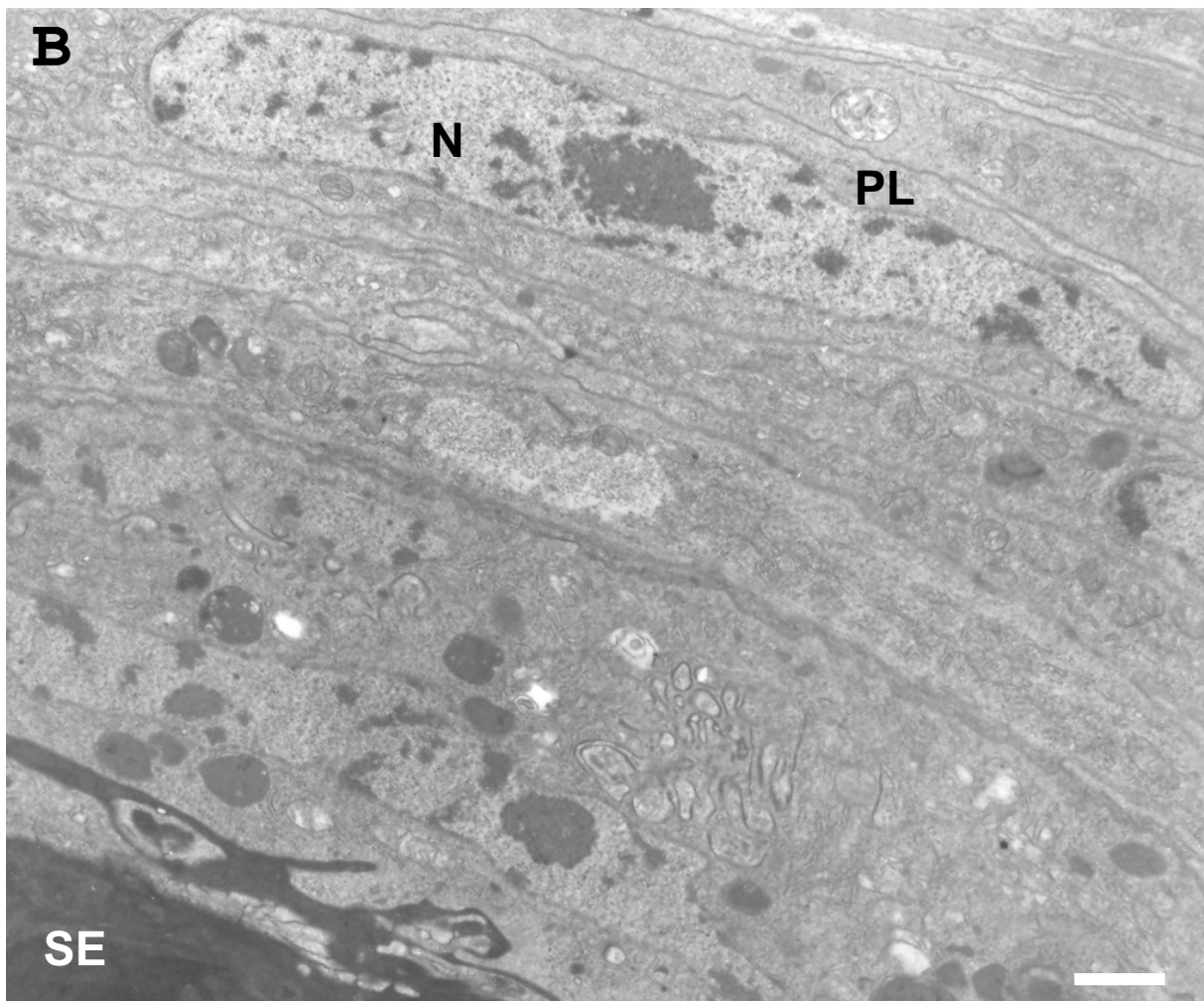


FIGURA 20 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação

A) Vista geral da cápsula. Esfera de Sephadex (SE). Barra = 3 μm .

B) Detalhe mostrando células interpretadas como plasmatócitos (PL) constituindo cápsula. Núcleo (N); esfera de Sephadex (SE). Barra = 1 μm .

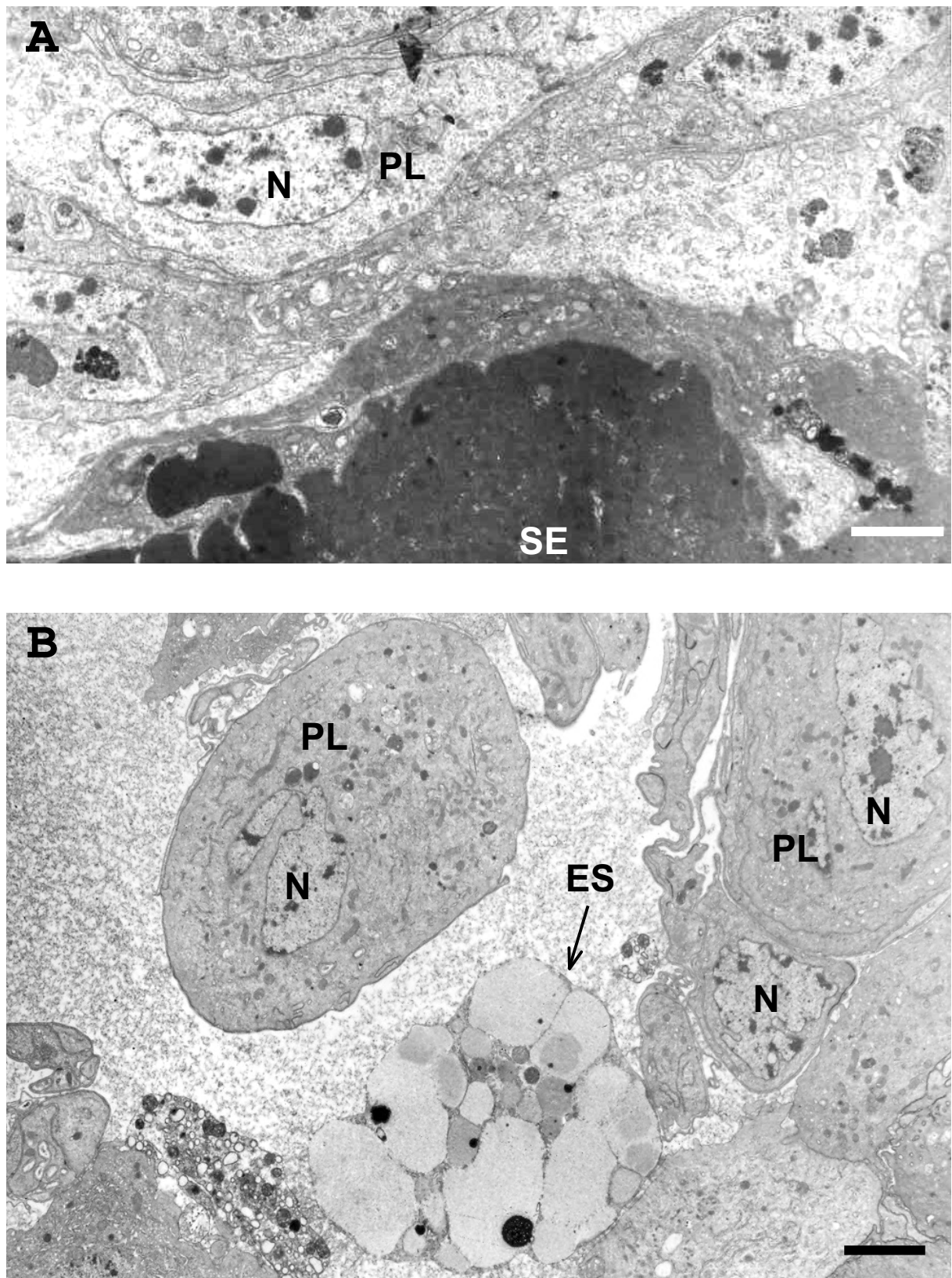


FIGURA 21 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sphadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação

A) Detalhe mostrando constituição da cápsula em torno da esfera de Sphadex (SE). Núcleo (N); plasmatócitos (PL). Barra = 2 μ m.

B) Plasmatócitos (PL) arredondados e esferulócitos (ES) na porção final da cápsula. Núcleo (N). Barra = 2,5 μm .

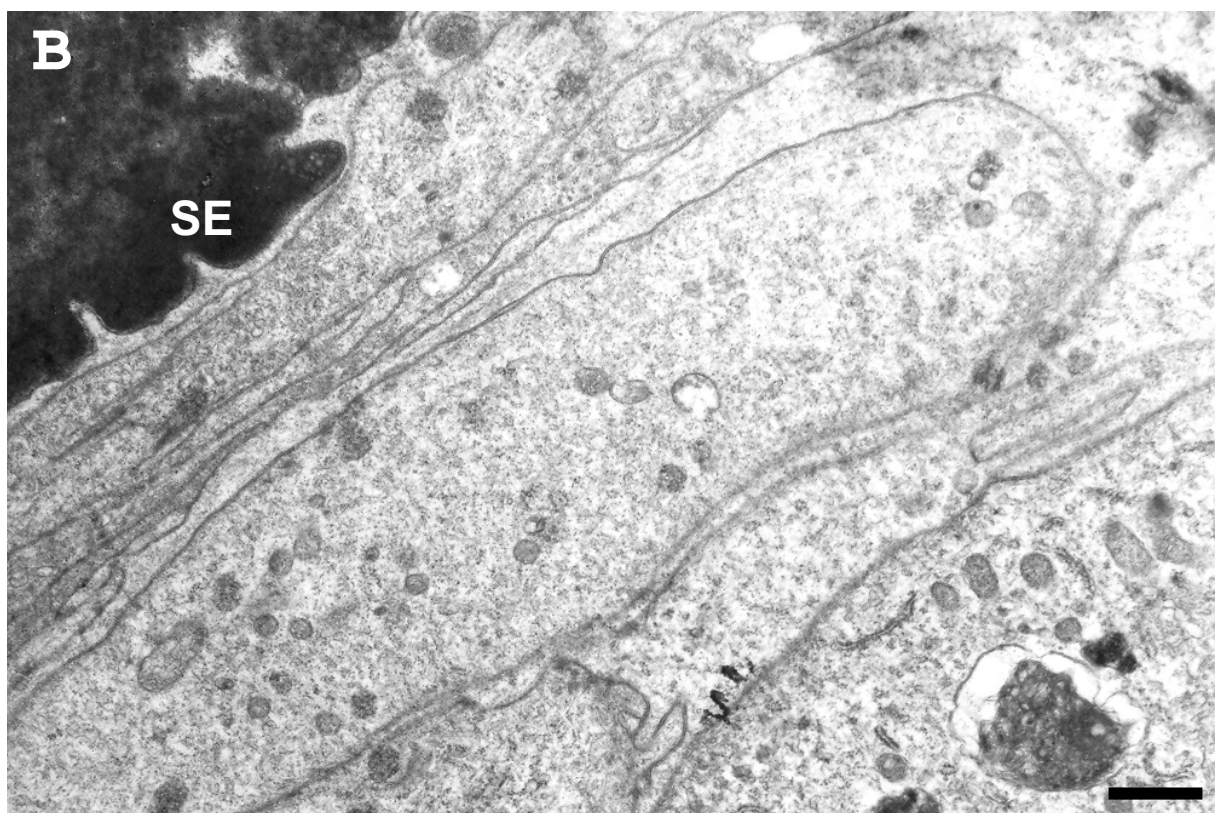
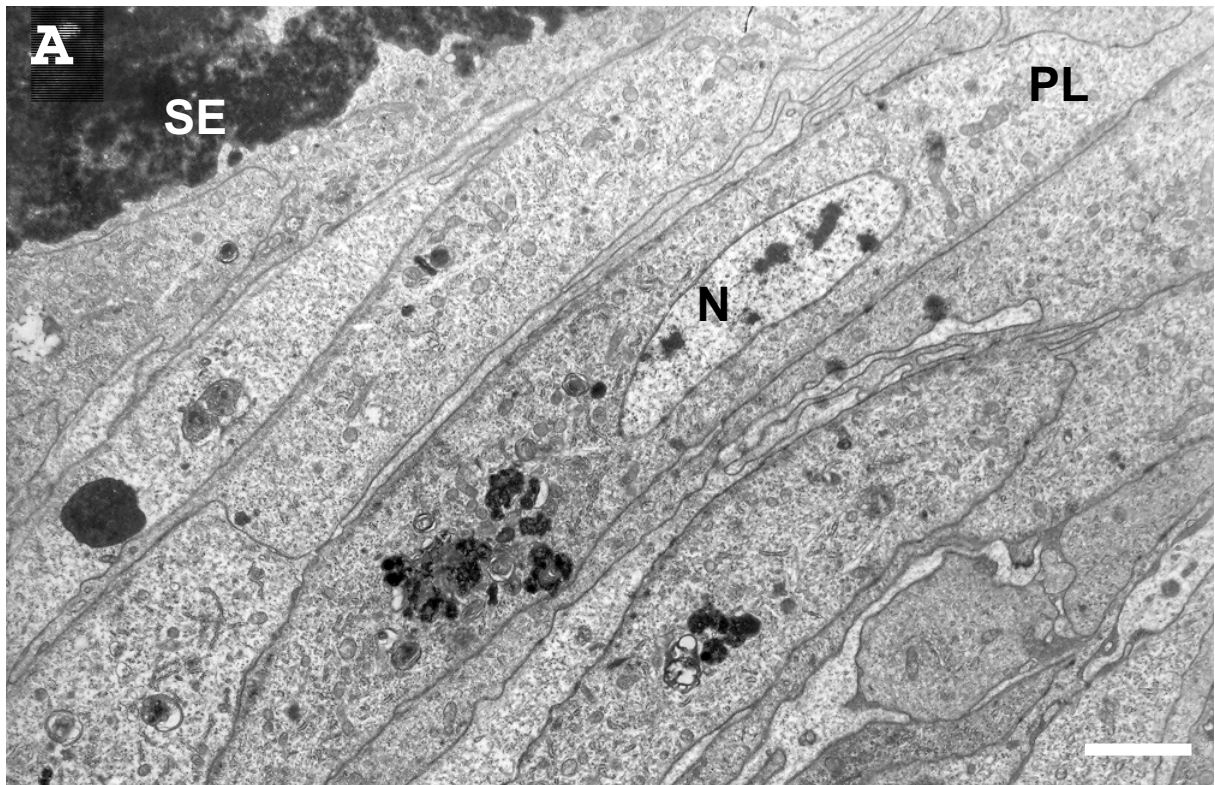


FIGURA 22 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Cápsula em torno de esfera de Sephadex (SE). Plasmatócito (PL); núcleo (N).

Barra = 2 μm .

B) Detalhe da esfera de Sephadex (SE) mostrando células justapostas. Barra = 1 μm .

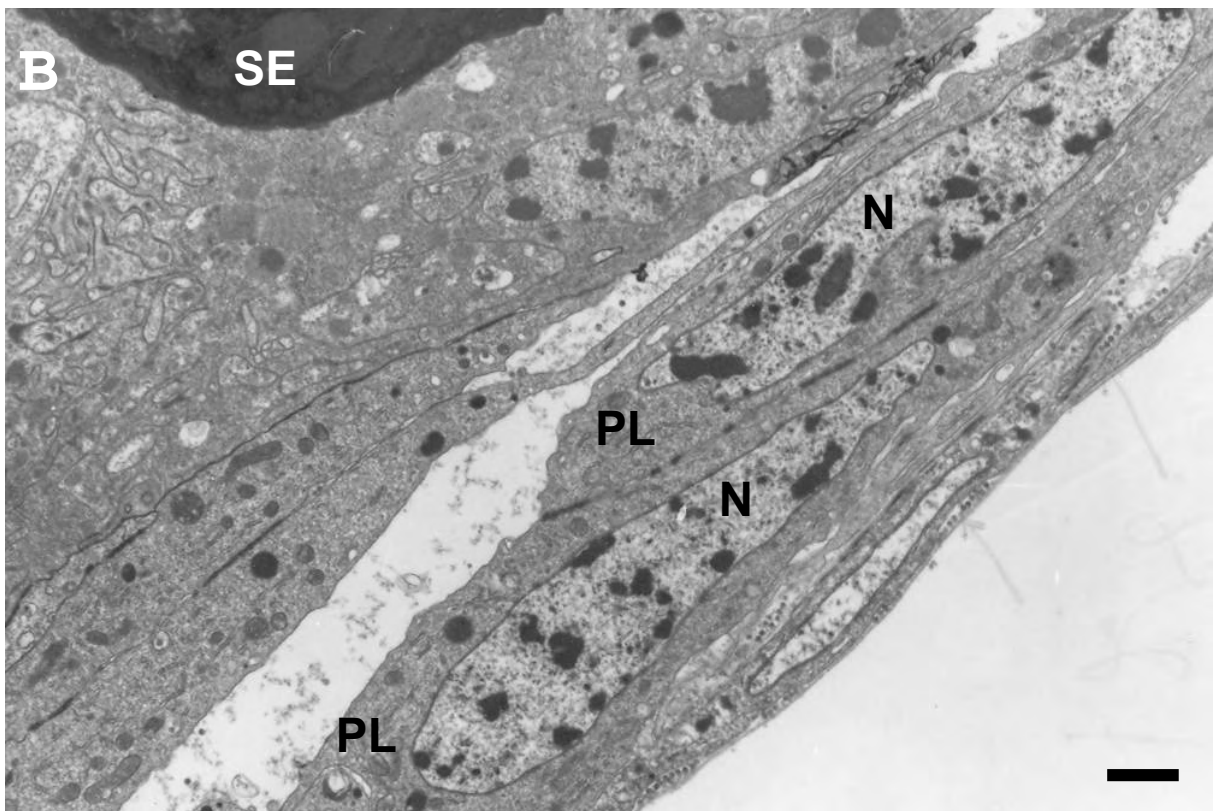
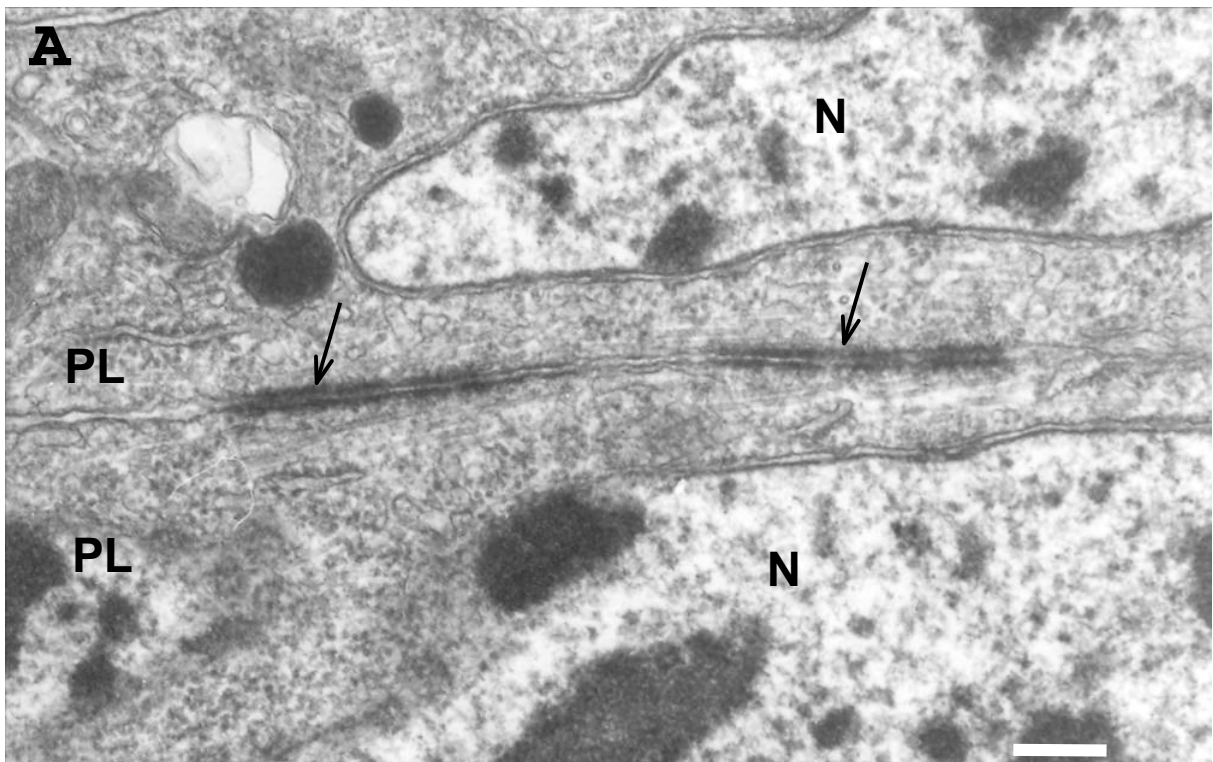


FIGURA 23 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação e concomitante ao parasitismo

A) Presença de desmossomos (setas) entre plasmatócitos (PL) adjacentes. Núcleo (N).

Barra = 0,25 μm .

B) Plasmatócitos (PL) menos achatados na porção final da cápsula. Notar cápsula constituída por poucas camadas de células. Esfera de Sephadex (SE); núcleo (N). Barra = 1 μm .

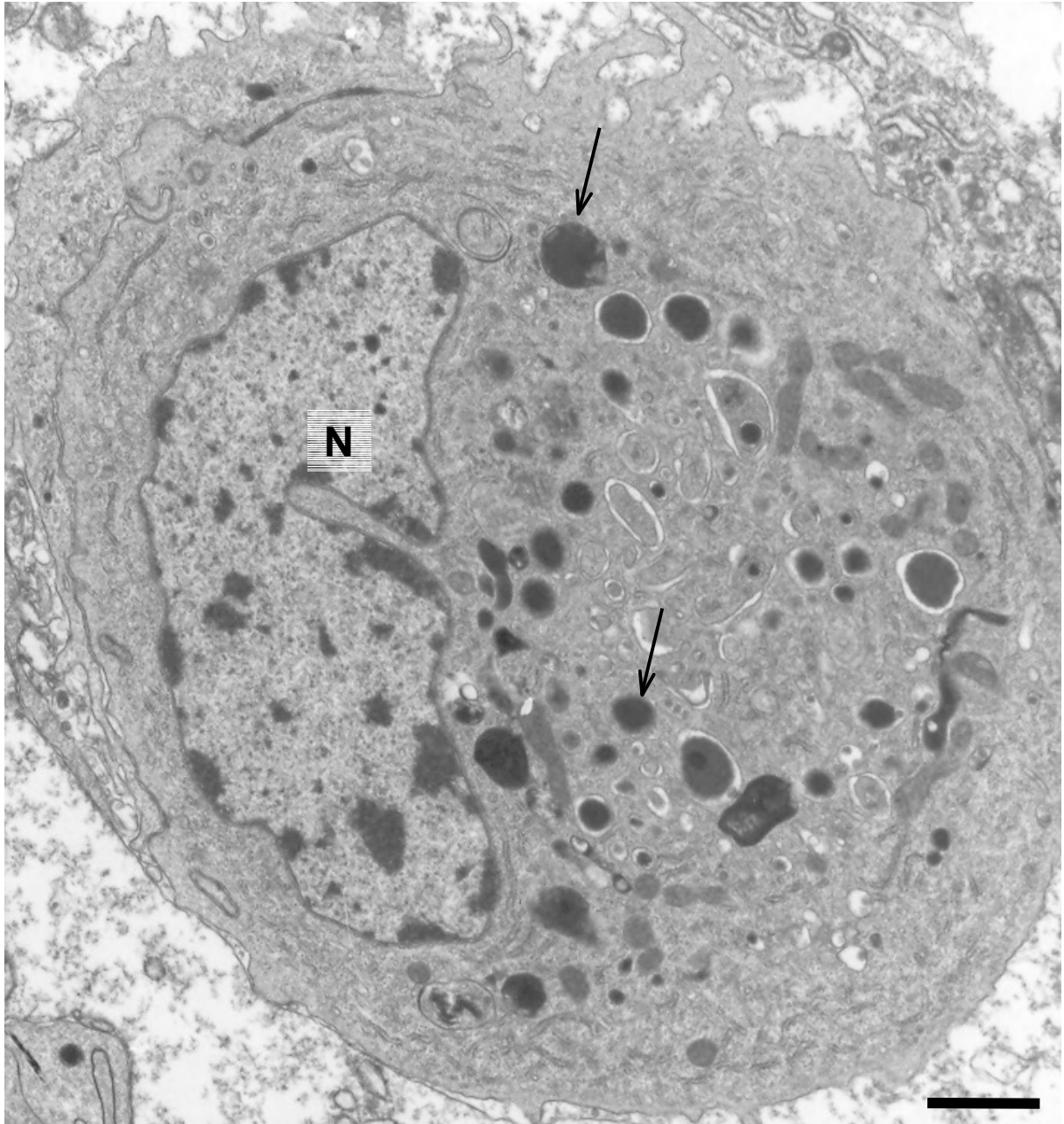


FIGURA 24 - Eletromicrografia (MET) de hemócito recuperado de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação de esferas de Sephadex e concomitante ao parasitismo

Granulócito com vacúolos de conteúdo heterogêneo (setas) na superfície externa da cápsula.
Núcleo (N). Barra = 1 μm .

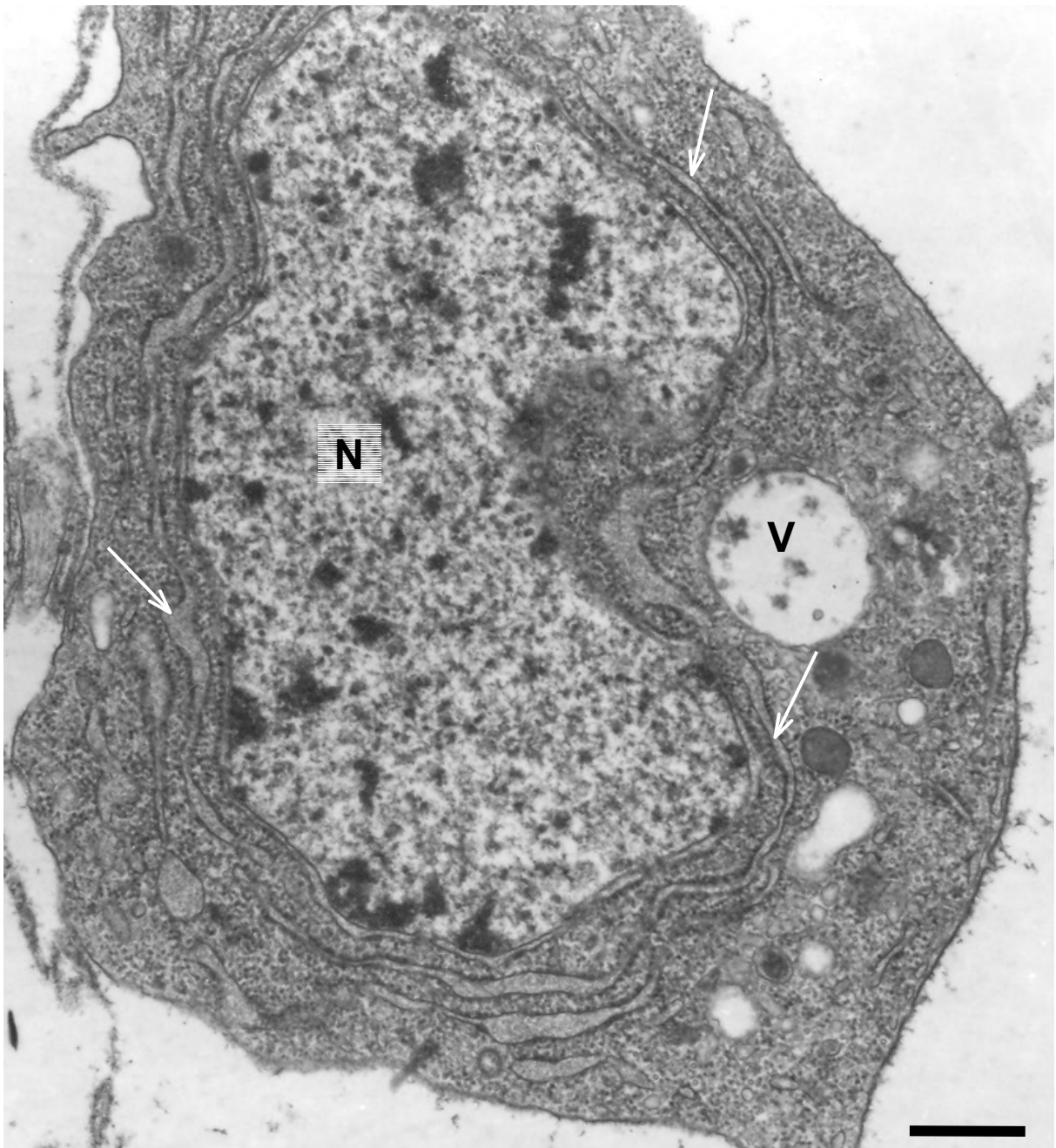


FIGURA 25 - Eletromicrografia (MET) de hemócito recuperado de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação de esferas de Sephadex e concomitante ao parasitismo

Plasmatócito com aumento do RER (setas) e vacúolo de conteúdo heterogêneo (V). Núcleo (N). Barra = 0,5 μm .

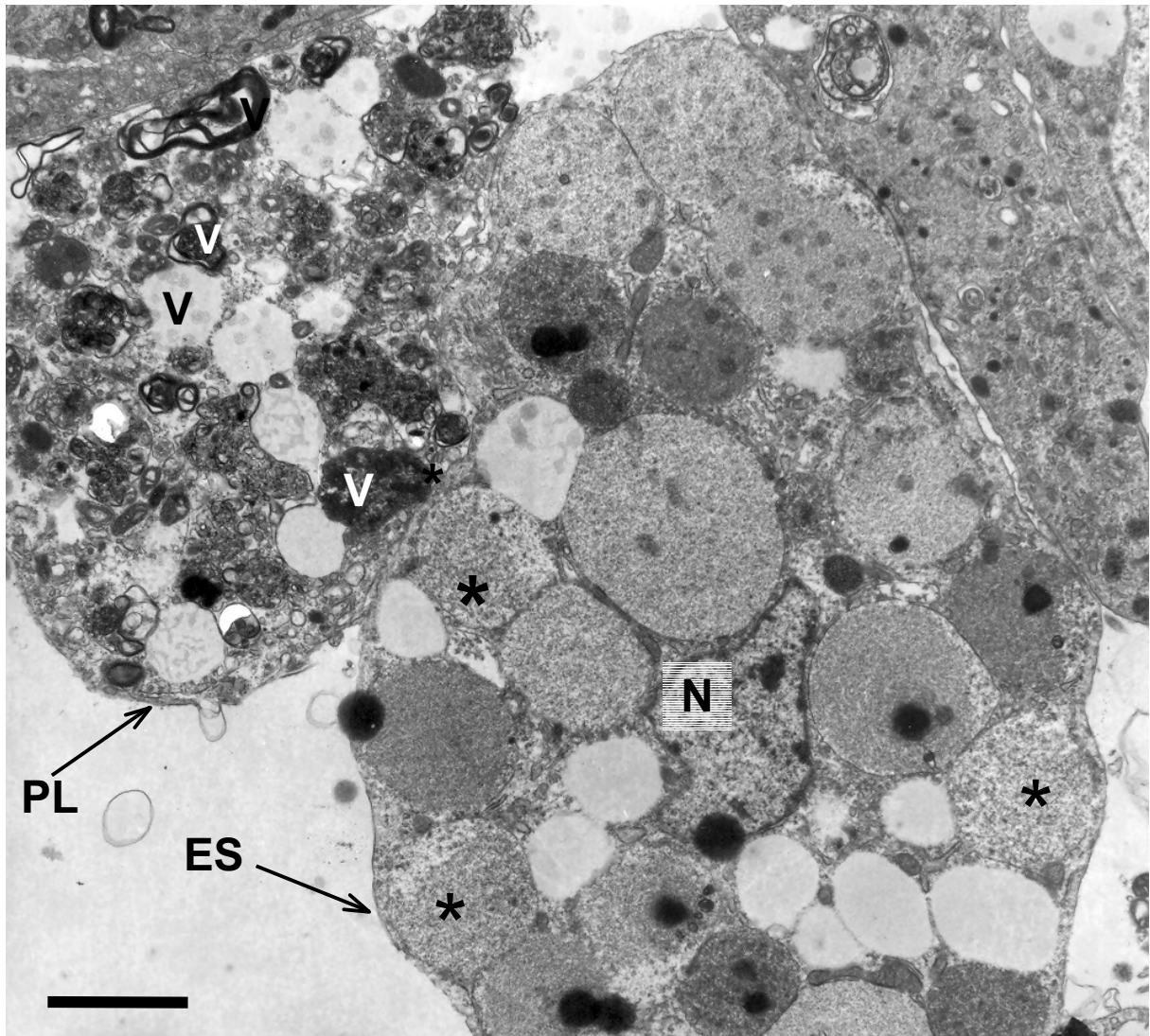


FIGURA 26 - Eletromicrografia (MET) de hemócitos recuperados de larvas de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação de esferas de Sephadex e concomitante ao parasitismo

Plasmatócito (PL) exibindo vacúolos com conteúdo heterogêneo (V) e esferulócitos (ES) mostrando degranulação das esférulas (*), ambos na porção externa da cápsula. Núcleo (N). Barra = 2 μm .

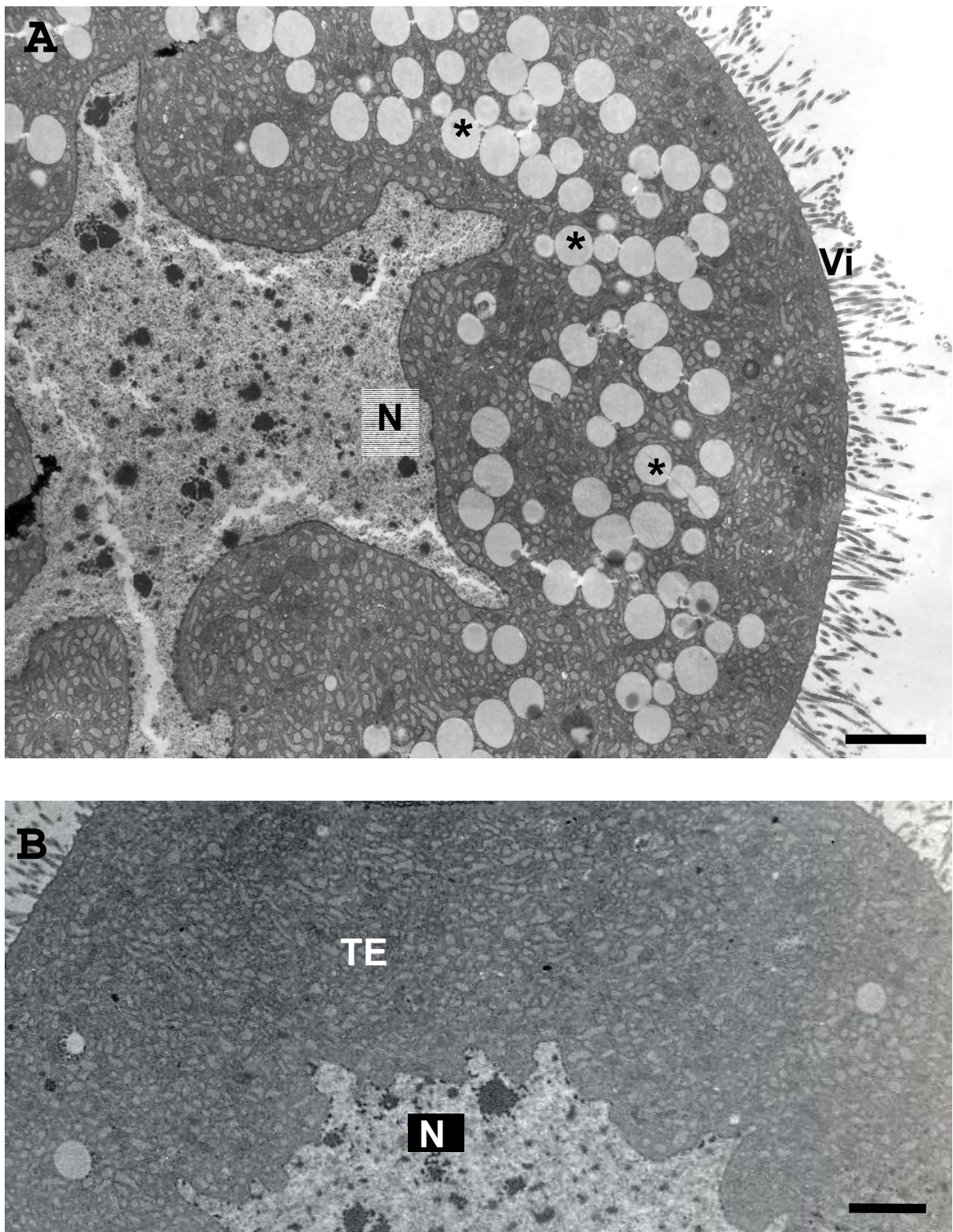


FIGURA 27

A) Eletromicrografia (MET) de teratócito da hemolinfa de larva de *D. saccharalis* 6 dias após a inoculação de esferas de Sephadex e concomitante ao parasitismo. Teratócito com grandes gotas lipídicas (*) em seu citoplasma. Vilosidades (Vi); núcleo (N). Barra = 2,5 μm .

B) Eletromicrografia (MET) de teratócito (TE) recuperado da hemolinfa de *D. saccharalis* 6 dias após parasitismo com *C. flavipes*. Núcleo (N). Barra = 4,0 μm .

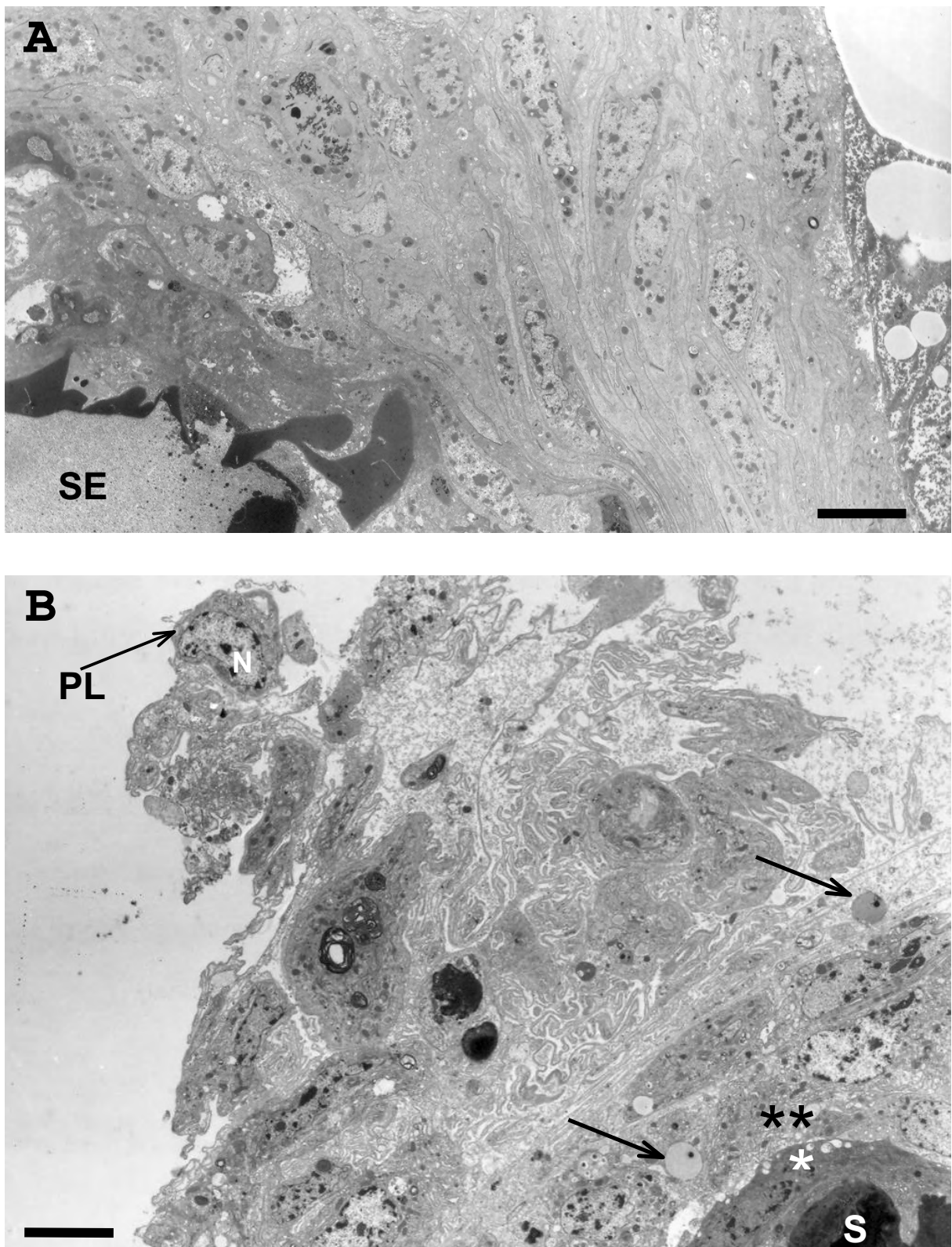


FIGURA 28 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 10 dias após a inoculação

A) Aspecto geral da cápsula. Esfera de Sephadex (SE). Barra = 5 μ m.

B) Vista geral, notar camadas de plasmatócitos com citoplasma mais denso (*) e menos denso (**), esférulas de esferulócitos compondo a cápsula (setas) e ainda plasmatócitos (PL) arredondados na porção final da cápsula. Esfera de Sephadex (SE), núcleo (N). Barra = 5 μ m.

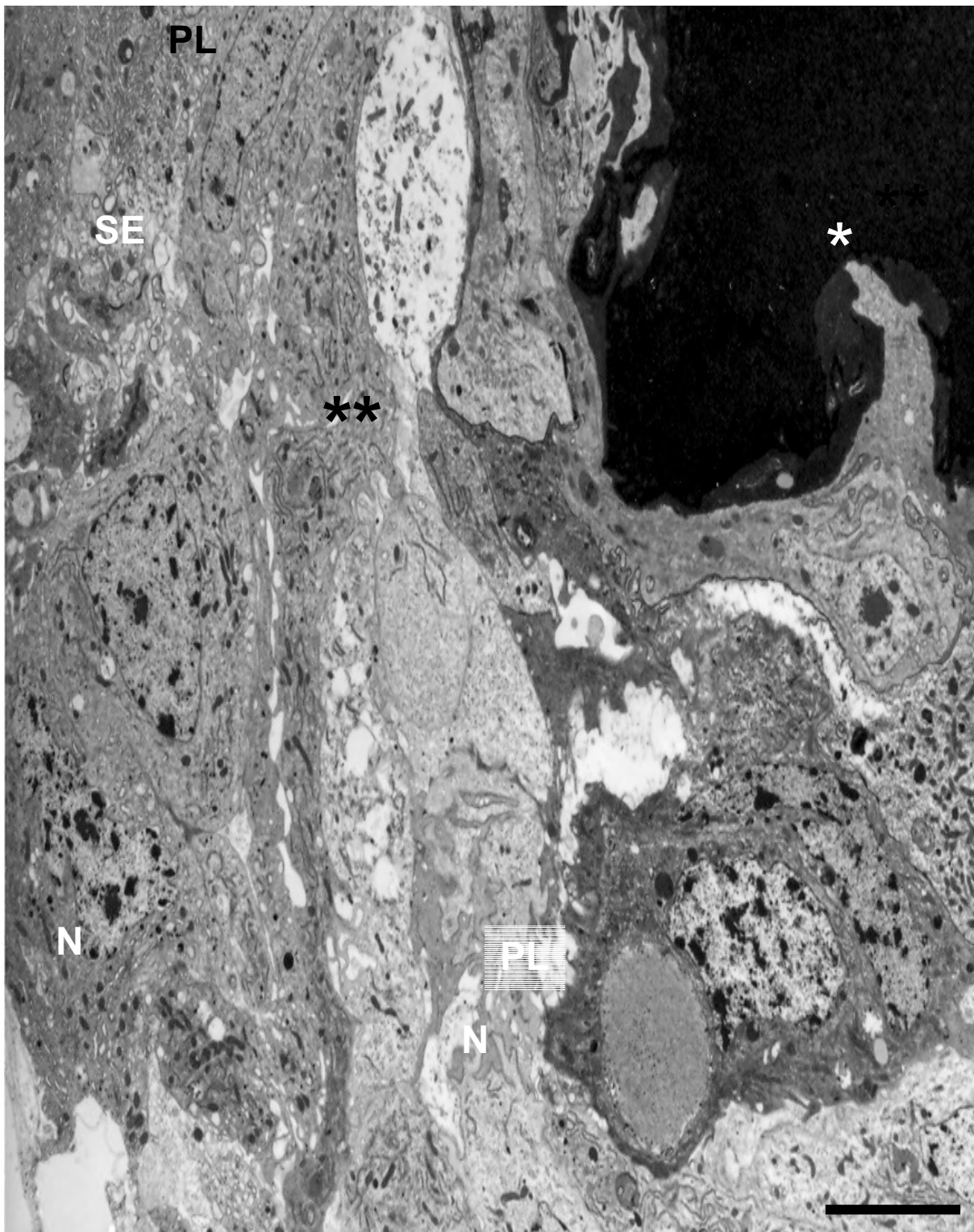


FIGURA 29 - Eletromicrografia (MET) de esfera de Sephadex recuperada de larva de *D. saccharalis* 10 dias após a inoculação

Aspecto geral da cápsula menos espessa. Observar a região interna mais contrastada (*), a porção posterior menos contrastada (**) e também células arredondadas e mais frouxamente dispostas. Esfera de Sephadex (SE); plasmatócito (PL); núcleo (N).

Barra = 5 μ m.

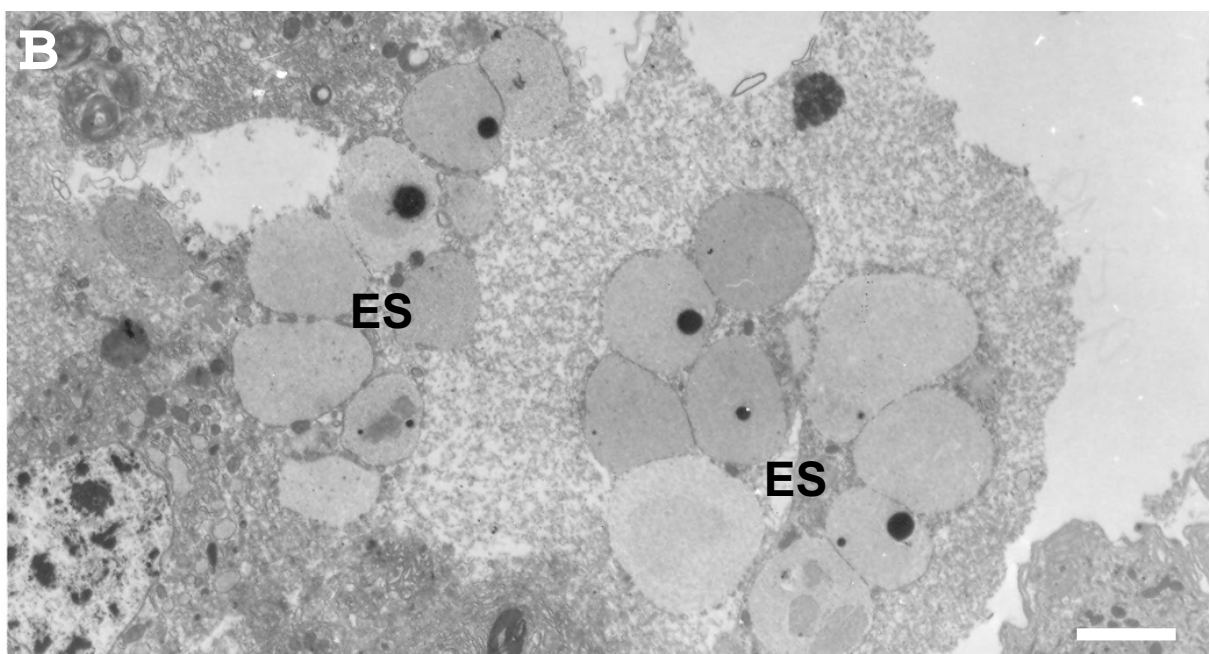
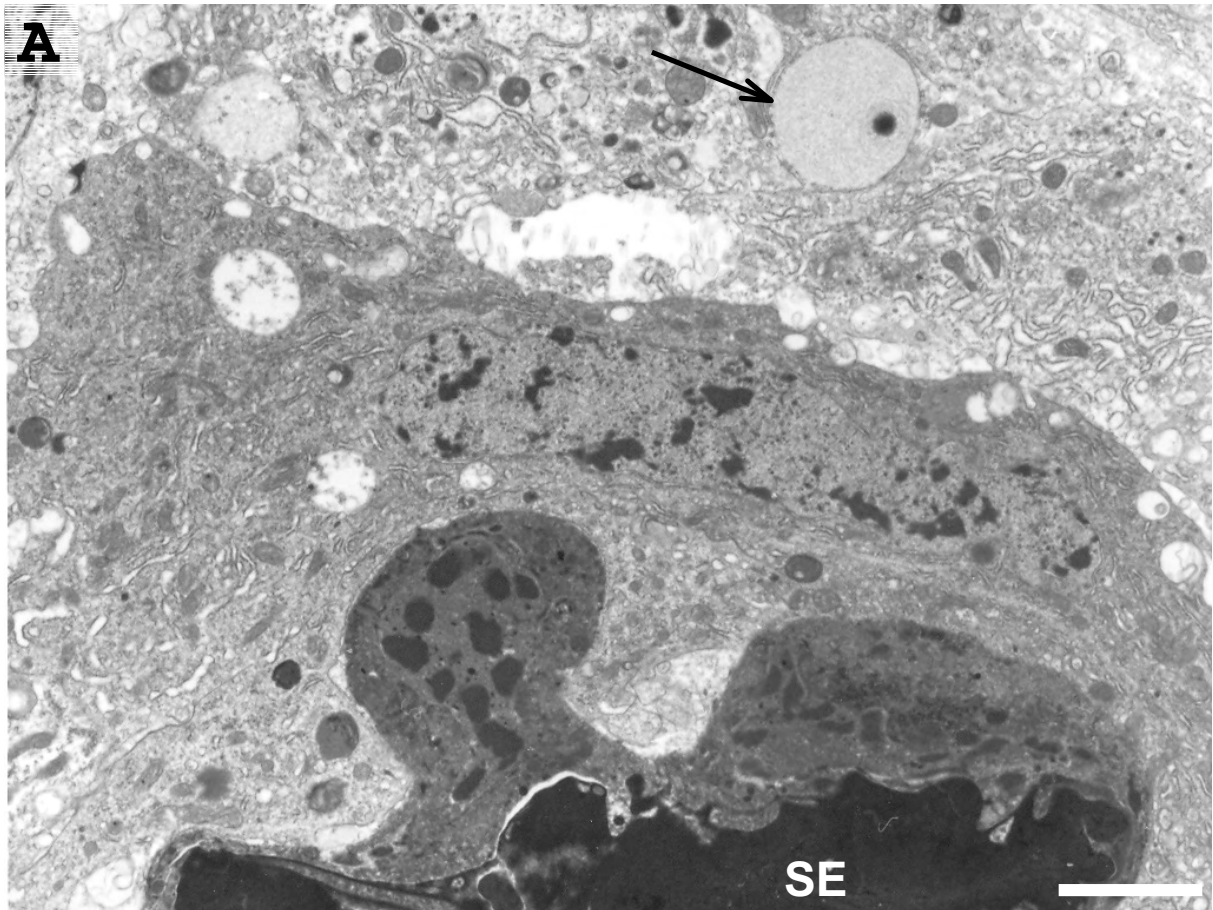


FIGURA 30 - Eletromicrografia (MET) de esferas de Sephadex recuperadas de larvas de *D. saccharalis* 10 dias após a inoculação

A) Detalhe mostrando esférulas de esferulócito (seta) compondo a cápsula. Esfera de Sephadex (SE). Barra = 2 μm .

B) Esferulócitos (ES) na porção final da cápsula. Barra = 2,5 μm .

1. EFEITO DO PARASITISMO E/OU INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA ATIVAÇÃO *in vitro* DO SISTEMA DE proPO

O presente trabalho mostrou que a hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* apresenta um sistema de proPO bastante ativo, quantificado através de experimentos *in vitro* com preparações de hemolinfa total (plasma + hemócito).

A metodologia desenvolvida neste trabalho foi a descrita por GREGÓRIO & RATCLIFFE (1991b) com hemolinfa de *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, bastante apropriada para o estudo do sistema de proPO, especialmente em insetos com pouca quantidade de hemolinfa, e também útil na análise simultânea do efeito de microorganismos na ativação do sistema de proPO, ao longo do tempo. Os autores estudaram o sistema de proPO na hemolinfa utilizando o plasma separado dos hemócitos, o que permitiu determinar que a enzima proPO estava presente principalmente na fração celular da hemolinfa destes triatomíneos, à semelhança de outros trabalhos com crustáceos (SMITH & SODERHALL 1983a,b; SODERHALL & SMITH, 1983; JOHANSSON & SODERHALL, 1985; SODERHALL *et al.*, 1996) e insetos como *Galleria mellonella* (RATCLIFFE *et al.*, 1984; LEONARD *et al.*, 1985a; BROOKMAN *et al.* 1988; BRÍVIO *et al.*, 2002), *Blaberus craniifer* (LEONARD *et al.*, 1985b), *Clitumnus extradentatus* e *Locusta migratoria* (BROOKMAN *et al.*, 1989b), *Schistocerca gregaria* (DULARAY & LACKIE, 1985), *Periplaneta americana* (FISHER & BRADY, 1983), *Acheta domesticus* (SILVA, 2002), *Rhodnius prolixus* (FEDER *et al.*, 1998; WHITTEN, *et al.*, 2001; AZAMBUJA & GARCIA, 2005; AZAMBUJA *et al.*, 2005), *Manduca sexta* (LING & YU, 2005), entre outros.

Durante o processo de formação dos nódulos ou encapsulação, o invasor torna-se melanizado (SCHMIT & RATCLIFFE, 1977; RATCLIFFE *et al.*, 1984, 1985, 1991; FORTON *et al.*, 1985; LACKIE *et al.*, 1985; NAPPI & CHRISTENSEN, 2005). A melanização é o resultado final da ativação do sistema de proPO, um complexo sistema enzimático em cascata. A fenoloxidase (PO) representa o componente terminal do sistema proPO. A PO, muitas vezes, pode ser encontrada sob a forma de proPO, o que dificulta sua identificação na hemolinfa de insetos (SCHMIT & RATCLIFFE, 1977; FISHER & BRADY, 1983; RATCLIFFE *et al.*, 1984, 1991; BROOKMAN *et al.*, 1988; NAPPI & CHRISTENSEN, 2005). Em insetos, a proPO pode estar localizada na porção celular da hemolinfa (FISHER & BRADY, 1983; RATCLIFFE *et al.*, 1984; LEONARD *et al.*, 1985a; HUXHAM & LACKIE, 1986) e/ou no plasma (ASHIDA, 1981; SUGUMARAN *et al.*, 1985; SAUL & SUGUMARAN, 1987).

O sistema de proPO serve como fonte de opsoninas para os hemócitos, participa da coagulação, da encapsulação e da formação de nódulos. As reações de defesa, celular e humoral, mostram-se cada vez mais complexamente relacionadas, segundo muitos trabalhos publicados. Como exemplo, temos a constatação de que aglutininas isoladas de larvas de *Spodoptera exigua* aumentaram em 80% a fagocitose de blastósporos de *Paecilomyces farinasus* por GR, em preparações *in vitro* (PENDLAND *et al.*, 1988). Também a ativação da proPO, em preparações de hemócitos *in vitro*, induziu um aumento na capacidade de fagocitose destas células (RATCLIFFE *et al.*, 1984; LEONARD *et al.*, 1985b, BROOKMAN, *et al.*, 1988), o que posteriormente confirmou-se em outros trabalhos (BROOKMAN *et al.*, 1989a; RICHARDS & PARKINSON, 2000). Toxinas de algumas espécies de fungos inibem a resposta de encapsulação, ao mesmo tempo em que diminuem a ativação do sistema proPO, sugerindo uma estreita relação entre esses dois mecanismos de defesa, em insetos (VEY & QUIOT, 1975; HUXMAN & LACKIE, 1986; VEY & GÖTZ, 1986).

As reações humorais mais frequentemente investigadas na interação hospedeiro-parasito são: produção de lisozimas e lectinas (GREGÓRIO & RATCLIFFE, 1991a; MELLO *et al.*, 1995), aglutinação da hemolinfa (GREGÓRIO & RATCLIFFE, 1991a; MELLO *et al.*, 1996), produção de eicosanóides (GARCIA *et al.*, 2004a,b), produção de superóxido e NO (WHITTEN *et al.*, 2001) e ativação do sistema de proPO (GREGÓRIO & RATCLIFFE, 1991b; MELLO *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004a,b).

O sistema de proPO em insetos pode ser ativado por fatores microbianos (ASHIDA, 1971; RATCLIFFE, *et al.*, 1984; YOSHIDA & ASHIDA, 1986; RATCLIFFE & ROWLEY, 1987; ROWLEY *et al.*, 1987; BROOKMAN *et al.*, 1989b; ROWLEY *et al.*, 1990). A tripsina é um potente ativador da proPO em caranguejos e alguns insetos (DULARAY & LACKIE, 1985; LEONARD *et al.*, 1985b; BROOKMAN *et al.*, 1988; GREGÓRIO & RATCLIFFE 1991b). Os produtos do tipo B-1,3-glicana, como a laminarina e o zimosana, também são ativadores potentes (ASHIDA, 1981; RATCLIFFE *et al.*, 1984; DULARAY & LACKIE, 1985; LEONARD *et al.*, 1985a,b; GREGÓRIO & RATCLIFFE 1991b), enquanto que outros polímeros de glicose, tais como os de ligação α -1,6- não conseguem ativar a proPO (RATCLIFFE *et al.*, 1984).

Em nosso trabalho, testamos tripsina e laminarina como possíveis ativadores. A presença de laminarina nas misturas reativas não afetou a ativação do sistema de proPO em *Diatraea saccharalis*, uma vez que seus resultados foram semelhantes aos do tampão. Assim, a laminarina não se mostrou um bom ativador para a hemolinfa de *Diatraea saccharalis* (Gráfico 8). Esse motivo fez com que nos experimentos posteriores utilizássemos apenas tampão como controle, e tripsina como ativador.

Existe variabilidade no tipo de ativador capaz de desencadear a cascata de proPO, dependendo do inseto. LEE & ANSTEE (1995), trabalhando com *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), verificaram que o sistema de proPO foi ativado por metanol, mas não foi ativado por laminarina, LPS (lipopolissacarídeos), tripsina bovina e quimiotripsina. Já GREGÓRIO & RATCLIFFE (1991b), trabalhando com insetos vetores do *Trypanosoma cruzi*, utilizaram dois produtos derivados de micro-organismos, o LPS e a laminarina. Ambos funcionaram como ativadores do sistema de proPO para *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. Entretanto, a laminarina ativou a proPO na hemolinfa de *Triatoma infestans* em todos os intervalos de tempo estudados, mas nas preparações de *Rhodnius prolixus* o nível de ativação foi maior que a espontânea somente após 2 h de incubação. LEONARD *et al.* (1985a,b), utilizando-se de monocamadas de hemócitos de *Blaberus craniifer*, *Galleria mellonella* e *Leucophaea maderae*, demonstraram que a laminarina extraída de parede celular de fungo ativou o sistema de proPO e aumentou a fagocitose de bactérias. SAUL & SUGUMARAM (1987) demonstraram que a laminarina ativou o sistema de proPO no plasma de *Manduca sexta*. HUXHAM & LACKIE (1988) em preparações de hemócitos que foram ativados por laminarina, demonstraram ainda um aumento na quimiotaxia das células de *Schistocerca gregaria* que contém a enzima proPO. BREHÉLIN *et al.* (1989), trabalhando com *Locusta migratoria*, observaram que laminarina e LPS ativam o sistema de proPO em lisado de hemócitos e também em soro, mas não induzem atividade de PO no plasma.

A falta de resposta à laminarina em nossas preparações de hemolinfa de *Diatraea saccharalis* pode ser resultado da ausência de afinidade de ligação desta substância aos receptores da cascata de proPO, ou ainda aos OE que contém a proPO; neste último caso, os hemócitos não liberariam de maneira significativa a pró-enzima, o que explicaria os nossos resultados. Já a tripsina mostrou-se um potente ativador do sistema de proPO para a hemolinfa de *Diatraea saccharalis* em todos os grupos experimentais, quando comparada com o tampão.

O sistema de proPO também é sensível a fatores não específicos como calor, detergentes e variações do nível de Ca^{++} (LEONARD *et al.*, 1985b). O calor e os detergentes

atuam em insetos e crustáceos, sendo que a ativação por estes agentes não é afetada por inibidores de proteases, sugerindo uma ação direta dos mesmos sobre a proPO (ASHIDA & SÖDERHALL, 1984; LEONARD *et al.*, 1985b; BREHÉLIN *et al.*, 1989). Níveis baixos de íon cálcio provocam a ativação espontânea do sistema de proPO (SÖDERHALL & HALL, 1984; LEONARD *et al.*, 1985b). Em caranguejo esta ativação envolve a atividade de uma serina-protease, chamada protease-S, que age diretamente na proPO por uma via diferente que a ativação pela laminarina ou LPS (SÖDERHALL & HALL, 1984). A necessidade da presença de cálcio para a ativação da proPO depende do inseto e do tipo de ativador utilizado. Em *Bombyx mori* a conversão de proPO em PO, através de um ativador purificado, se realiza sem os íons cálcio (ASHIDA *et al.*, 1983). O ácido etileno-diaminotetra-acético (EDTA), um quelante de cátions bivalentes, inibe a ativação espontânea do sistema de proPO em *Musca domestica*; no mesmo inseto, entretanto, o EDTA não inibe a ativação desse sistema em pupas mais velhas, as quais possuem um ativador natural (TSUKAMOTO *et al.*, 1986).

Nossa metodologia permitiu variar o tempo de leitura da ativação do sistema de proPO, isto é, analisar esta ativação ao longo do tempo. Entretanto, optamos por fixar um único momento para esta aferição. Definimos o tempo de leitura em 2 h após a incubação para todos os experimentos, pois a hemolinfa de larvas de Diatraea saccharalis inoculadas com agente abiótico (Sephadex) em tempo tardio (6 dias), mostrou uma ativação tão intensa do sistema de proPO, que uma leitura acima de 2 h excedia a capacidade do equipamento (Gráfico 3).

A idade da larva de *Diatraea saccharalis* foi, por si só, um fator muito importante no processo de ativação do sistema de proPO, demonstrando que a ativação do sistema de proPO é variável, dependendo da idade do inseto. Foi observada uma redução significativa dos níveis de ativação espontânea (tampão) e induzida (tripsina) de proPO nas larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas/inoculadas (Grupo C), ao longo do desenvolvimento das larvas, nos tempos observados de 20 a 26 dias. É interessante notar que esta variação também ocorreu nos níveis de produção de NO. Nos dois casos, a explicação pode estar relacionada com a proximidade da pupação da larva, que ocorre em torno do 35º dia e leva os insetos a grandes transformações, incluindo talvez a diminuição de substâncias importantes para a reação de defesa na hemolinfa, como a proPO e o NO.

Raros são os trabalhos relacionando a ativação do sistema de proPO com a idade do inseto. CHUN *et al.* (1995), trabalhando com duas linhagens de *Anopheles gambiae*, uma

refratária e outra susceptível ao *Plasmodium sp*, observaram que a idade da fêmea do mosquito e também o seu estado reprodutivo afetou fortemente a habilidade de melanizar agente abiótico, no caso, esferas de Sphadex. A melanização é o produto final da ativação do sistema de proPO. Todas as esferas foram completamente melanizadas em linhagem refratária, 1 dia após a eclosão da larva do mosquito (dia 0). Depois disso o número de esferas melanizadas decresceu continuamente até o último dia observado (dia 7), quando somente 23% das esferas foram melanizadas nesta linhagem. Na linhagem susceptível, 53% das esferas foram melanizadas no dia 0 e cerca de 10% das esferas foram melanizadas nos outros períodos. Com relação ao estado reprodutivo, no dia 1 e 2 após a alimentação de sangue, 85% e 88% das esferas, respectivamente, estavam melanizadas em fêmeas da linhagem refratária em comparação com mosquitos controle da mesma idade, os quais melanizaram 23% e 58% das esferas. A alimentação sanguínea teve pouco efeito sobre a habilidade em melanizar esferas de Sphadex na linhagem susceptível. Fica claro que no caso da *Diatraea saccharalis* e do *Anopheles gambiae* houve uma diminuição da ativação do sistema de proPO no decorrer da idade larval dos insetos; e particularmente no mosquito, uma conseqüente diminuição da melanização das esferas de Sphadex.

Um trabalho semelhante foi realizado por MULLEN & GOLDSWORTHY (2006), porém o estudo se baseou em duas fases de desenvolvimento de *Locusta migratoria*. Os autores compararam os efeitos da inoculação de duas variedades de fungos com a inoculação de laminarina. Após a inoculação da variedade *Met 189*, foi detectado um aumento na ativação do sistema de proPO na hemolinfa de insetos adultos e também em ninfas de 5º instar, quando comparados com insetos inoculados com a variedade *Met 728* ou com laminarina. O aumento da ativação do sistema de proPO, contudo, não impediu a mortalidade causada pelos fungos. Os autores sugerem, entretanto, que outros fatores refletem diferenças na sensibilidade do sistema imune entre insetos adultos e ninfas, mais do que as diferenças quantitativas mostradas. Isto foi confirmado quando doses mais altas de laminarina (>100 µg) ativaram o sistema de proPO somente em ninfas de 5º instar. Uma outra evidência de que diferenças não quantitativas ocorrem entre insetos da mesma espécie foi demonstrada pelos autores, porém, em fases de desenvolvimento diferentes. Ainda em *Locusta migratoria*, em todas as idades formaram-se nódulos em resposta a infecção com fungos ou injeção de laminarina, embora houvesse uma ampla variação do número, tamanho e distribuição desses nódulos. Durante o exame de formação de nódulos em ninfas de 5º instar, porém, foi observado um fenômeno desconhecido anteriormente, onde glândulas salivares de ninfas melanizaram em resposta a injeção com fungos ou com altas doses de laminarina. Em 85%

das ninfas esta reação foi tão forte que a glândula salivar ficou inteiramente enegrecida. Tal resposta não foi observada nas glândulas salivares dos adultos da mesma espécie.

Houve uma diminuição da ativação do sistema de proPO a medida que houve avanço da idade/estágio de desenvolvimento nos diferentes insetos, observada tanto em nosso trabalho quanto nos acima citados. Fica evidente, que a idade larval do inseto ou seu estágio de desenvolvimento são fatores relevantes, e que devem ser levados em consideração na análise da ativação do sistema de proPO.

Em nosso trabalho, observamos que o parasitismo afetou a ativação do sistema de proPO na hemolinfa do inseto hospedeiro, causando uma diminuição tanto na ativação espontânea como na presença de tripsina, em todos os tempos analisados. Já os níveis de produção de NO também tiveram uma redução significativa no parasitismo inicial e recente (2 h e 6 h), mas no parasitismo intermediário e tardio (3 e 6 dias) não houve diferença significativa dos níveis de produção. Isso demonstra que estas substâncias de reação de defesa atuam em períodos distintos.

O parasitóide não é encapsulado na hemocele do hospedeiro (NUNES, 2001). O sistema de proPO ficou inibido em todo o período de parasitismo, sugerindo que este fato seja importante para o estabelecimento do parasitismo; entretanto, a inibição dos níveis de NO só ocorre nas primeiras horas de parasitismo, sugerindo que, a escassez inicial desta molécula exerça um papel importante no estabelecimento do parasitóide no inseto hospedeiro e que decorrido algum tempo, esta molécula torne-se menos decisiva na eliminação deste parasitóide. Estudos demonstram, à semelhança do nosso, que a ativação do sistema de proPO e a produção de NO são inibidas quando há sucesso no parasitismo. WHITTEN *et al* (2001) também realizaram um estudo comparando aspectos da produção de NO e proPO em hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, medidos em paralelo, em resposta à inoculação de duas cepas de *Trypanosoma rangeli*, aparentemente inofensivas para os humanos, mas que podem ser patogênicas para o inseto vetor (WATKINS, 1971; HECKER *et al.*, 1990). Os resultados obtidos foram correlacionados com a habilidade do parasito em sobreviver, se multiplicar e completar o seu ciclo de vida na hemolinfa do hospedeiro. O *Trypanosoma rangeli* H 14 não conseguiu completar o seu ciclo de vida no *Rhodnius*, produzindo altos níveis de produção de NO e de proPO na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, que alcançaram pico de atividade após 24 h de inoculação. O *Trypanosoma rangeli* Choachi também estimulou a produção de NO e proPO, as quais, embora significativamente mais baixas que na cepa H14, também atingiram o pico de atividade após 24 horas. Os níveis de produção de NO e proPO da cepa Choachi continuaram mais baixos que da cepa H14; a cepa de parasito Choachi se multiplicou

rapidamente e eventualmente invadiu a glândula salivar do inseto para a transmissão ao hospedeiro vertebrado. Esse estudo demonstrou que a cepa do protozoário que induziu uma produção menor de NO e proPO teve melhores condições de sobreviver, se multiplicar e completar o seu ciclo de vida no inseto vetor.

Estudos semelhantes foram realizados por MELLO *et al.* (1995) e AZAMBUJA *et al.* (2005), que também trabalharam com *Rhodnius prolixus* parasitado pelo *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. O *Trypanosoma rangeli* invade a hemocele e pode ser reconhecido, ativando o sistema de defesa do inseto vetor, ou seja, o sistema de proPO, a atividade de NO, além da fagocitose, micro-agregação hemocitária e a via de biossíntese de eicosanóides, como observado por outros autores para o mesmo inseto (GOMES *et al.*, 1999, 2003 e GARCIA *et al.*, 2004a). Porém, o inseto vetor é susceptível ao *Trypanosoma cruzi*, o qual se desenvolve com sucesso no tubo digestivo; neste caso, a ativação do sistema de proPO e a produção de NO estão inibidas.

GREGÓRIO & RATCLIFFE (1991b) demonstraram que o *Trypanosoma rangeli*, na forma de epimastigota obtida através de cultura, não foi capaz de ativar *in vitro* o sistema de proPO em *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, embora este protozoário desapareça rapidamente da hemolinfa em infecção natural ou experimental em *Triatoma infestans*, porém não em *Rhodnius prolixus* (ZELEDON & DEMONGE, 1966). Uma vez que o *Triatoma infestans* é refratário à infecção por *Trypanosoma rangeli*, era de se esperar que este protozoário fosse reconhecido como “não próprio” e ativasse a cascata de proPO na hemolinfa deste inseto. A justificativa dos autores refere-se à característica da superfície do *Trypanosoma* em cultura, que poderia ser bastante diferente daquela encontrada em condições naturais. Os mesmos autores, adicionando o *Trypanosoma rangeli* em preparações de hemolinfa de *Triatoma infestans* ativada pela tripsina ou laminarina, observaram que não ocorreu ativação da proPO deste inseto na presença destes ativadores. Entretanto, quando o protozoário foi adicionado em preparações de hemolinfa de *Rhodnius prolixus* + laminarina, o parasito inibiu a ação deste ativador sobre a cascata enzimática. Assim, a susceptibilidade que o *Rhodnius prolixus* possui à infecção por *Trypanosoma rangeli* pôde ser explicada pelo menos em parte, por uma supressão na resposta imune deste inseto na presença do protozoário, semelhantemente ao que ocorre com a *Diatraea saccharalis* parasitada pela *Cotesia flavipes* em que há também uma diminuição da ativação do sistema de proPO.

A imunossupressão de insetos por parasitas já foi descrita em vários trabalhos (STOLTZ & COOK, 1983; DAVIES & VINSON, 1986; GÖTZ, 1986a, 1986b; DAVIES *et al.*, 1987; RICHARDS & EDWARDS 1999; SILVA *et al.* 2000b; BRÍVIO *et al.*, 2002). STOLTZ & COOK (1983) mostraram que o parasitismo de *Heliothis virescens* por

Hymenoptera deprimiu a ativação da proPO na hemolinfa do hospedeiro, embora a pró-enzima continuasse presente e passível de ser ativada. Em triatomíneos, BITKOWSKA *et al.* (1982) mostraram através de experimentos *in vivo* que a infecção intestinal por *Tripanosoma cruzi* deprimiu a reação do *Triatoma infestans*, uma vez que insetos infectados não encapsularam implantes, o que ocorreu nos insetos livres de infecção. A inibição da atividade de PO reduziu a capacidade de encapsulação de hemócitos de *Heliothis virescens* (BREWER & VINSON, 1971). Essa redução mostrou-se variável, dependendo do inseto e do parasito, sendo provavelmente causada pela inibição de um dos componentes da cascata de ativação da proPO e não por supressão da atividade da PO ou inativação da proPO (STOLTZ & COOK, 1983).

Larvas do lepidóptero *Heliothis virescens*, quando parasitadas por uma vespa Ichneumoide, a *Campoletis sonorensis*, foram incapazes de realizar resposta imune contra os ovos do parasitóide. O estudo demonstrou que em larvas parasitadas, a inibição da melanização está associada à redução da atividade de proPO (SHELBY *et al.*, 2000). Do mesmo modo, o parasitismo de *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) pela vespa parasitóide *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera) suprimiu a atividade de PO na hemolinfa do hospedeiro (RICHARDS & EDWARDS, 2000).

BRÍVIO *et al.* (2002), trabalhando com *Galleria mellonella* recém-infectada com *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida), observaram que a ativação do sistema de proPO foi inibida na presença de parasitos vivos e mortos (injeção de fragmentos isolados de cutícula). Os autores sugeriram que a superfície do corpo do parasito desempenhou um papel importante na fase de parasitismo inicial, diminuindo drasticamente a ativação do sistema de proPO. Esta diminuição da ativação do sistema de proPO foi semelhante ao ocorrido em *Diatraea saccharalis* parasitada pela *Cotesia flavipes*, embora os referidos autores tenham feito a medição somente no período inicial de parasitismo (2 h).

Frente à inoculação de bactérias na hemocele de insetos, o sistema de proPO pode ter outro comportamento. SILVA (2002) trabalhando com ninfas de *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae), injetou *Bacillus subtilis* em sua hemocele o que causou aumento dos níveis de proPO. O aumento foi semelhante ao observado nos insetos injetados com laminarina. A incubação de células de *Bacillus subtilis* em soro com PO ativada *in vitro*, e posterior injeção nos insetos, aceleraram a remoção das bactérias da hemolinfa. A concentração das bactérias foi menor que a observada nas ninfas injetadas apenas com bactérias em solução tampão. Por outro lado, ninfas injetadas com suspensão de bactéria incubada em soro com PO inativada *in vitro* apresentaram alta concentração de bactéria na hemolinfa. Portanto, a inoculação de bactérias em soro com PO ativada *in vitro* fez aumentar

a ativação de proPO, conseqüentemente levando à fagocitose das bactérias. Esses dados sugerem que *Bacillus subtilis* é sensível à cascata de proPO de *Acheta domesticus*. A autora ainda sugeriu que a PO ativada adere à superfície das bactérias e aumenta a fixação dos hemócitos em torno das bactérias. Isso contribui para acelerar sua remoção da hemolinfa através da formação de nódulos.

Com a finalidade de melhor analisarmos os efeitos da inoculação de Sephadex (Grupo Se) na ativação do sistema de proPO, analisamos inicialmente o efeito da inoculação do veículo SSI (Grupo S), comparados com o grupo controle (Grupo C). Isto porque a inoculação de Sephadex utilizou a SSI como veículo.

A inoculação de SSI produziu uma diminuição significativa da ativação espontânea do sistema de proPO na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis*, nos tempos inicial (2 h) e recente (6 h), em relação ao seu respectivo controle. Já na presença de ativador, não houve diferença significativa na ativação após 2 h de inoculação; porém, houve uma diminuição significativa em tempo recente (6 h). No tempo intermediário (3 dias) houve diminuição significativa da ativação da proPO somente na presença do ativador (tripsina), e em tempo tardio (6 dias) esta diminuição foi significativa tanto na ativação espontânea quanto na induzida. Interessante, é que a produção de NO também diminuiu na hemolinfa de larvas inoculadas com SSI.

A possível explicação, tanto para a ativação do sistema de proPO quanto para a produção de NO, estaria na perda de hemolinfa sofrida pelas larvas inoculadas com SSI (Grupo S) no processo de inoculação (pelo uso da agulha); também concorre o fato de que a hemolinfa de larvas inoculadas com SSI estaria diluída. Assim, os níveis de ativação do sistema de proPO estariam reduzidos. Esta explicação pode ser inferida para os insetos com inoculação inicial, recente, intermediária e tardia, períodos em que não teria ocorrido a reposição da hemolinfa.

Há variabilidade na ativação do sistema de proPO em presença de SSI. GUPTA *et al.* (2004), trabalhando com hemolinfa de *Manduca sexta*, também observaram que em presença de tampão houve uma diminuição da ativação do sistema de proPO. Já WHITTEN *et al.* (2001), trabalhando com *Rhodnius prolixus*, observaram em diferentes tempos pós inoculação com SSI (6 h, 12 h, 1, 2 e 3 dias) que não houve diferença significativa da ativação do sistema de proPO, quando comparados com os insetos não injetados do grupo controle. Este resultado não foi discutido pelos autores, uma vez que o grupo de insetos inoculados com SSI serviu tão somente como controle no estudo do parasitismo por *Trypanosoma rangeli*.

Nosso objetivo seguinte foi observar a ativação do sistema de proPO em hemolinfa de larvas inoculadas com Sephadex. Ao analisarmos os resultados obtidos a partir da comparação entre a hemolinfa de larvas inoculadas com SSI (Grupo S) e a hemolinfa de larvas inoculadas com Sephadex (Grupo Se), observamos que a presença do agente abiótico inibiu significativamente a ativação do sistema de proPO em hemolinfa de insetos com inoculação recente (2 h), seja em ativação espontânea (tampão) ou na presença de ativador (tripsina). Quando inoculamos esferas de Sephadex para observar a formação de cápsula em MET, não conseguimos recuperar o material após 2 h, pois este ainda não estava melanizado. A possível explicação pode estar na diminuição da ativação do sistema de proPO ora mencionada.

Já nos insetos do grupo com inoculação recente (6 h), houve um aumento significativo na ativação do sistema de proPO, espontaneamente ou induzido pela tripsina. Em inoculação recente (3 dias) apenas a ativação espontânea esteve significativamente inibida nos insetos inoculados com Sephadex. Por fim, em inoculação tardia (6 dias) ocorreu uma ativação muito significativa do sistema de proPO, espontânea e na presença de ativador.

De uma maneira geral, o que ocorreu foi um aumento da ativação do sistema de proPO, espontânea ou induzida, quando da inoculação do agente abiótico (Sephadex). O agente abiótico foi reconhecido como “não próprio” e houve formação de cápsula celular melanizada em torno do material estranho, como se pode verificar nas imagens à MET do presente trabalho. Portanto, era esperado que o Sephadex causasse um aumento do nível de ativação do sistema de proPO na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis*; ao contrário do que ocorreu na presença do parasitóide, quando não houve encapsulação.

LING & YU (2005), trabalhando com inoculação de Sephadex em *Manduca sexta*, observaram que o sistema de proPO também era ativado e que o número de hemócitos positivos para PO, no caso específico GR e ES, aumentava significativamente 12 h após a injeção da partícula estranha, comparados com o grupo controle (SSI). Os autores sugeriram que a ativação de proPO dá início à melanização e à posterior formação de cápsula em torno das esferas de Sephadex em *Manduca sexta*.

Tivemos dificuldade de encontrar na literatura trabalhos com outros insetos, que pudessem favorecer comparações com nosso estudo sobre o sistema de proPO. Encontramos trabalhos que relatam a melanização, mas que não mencionam a ativação do sistema de proPO. É consenso entre os pesquisadores que havendo melanização, houve também a ativação do sistema de proPO (SÖDERHÄLL, 1982; ASHIDA *et al.*, 1990; ASHIDA & BREY, 1997; SHELBY *et al.*, 2000). PASKEWITZ & RIEHLE (1998), trabalhando com duas linhagens do *Anopheles gambiae*, uma refratária e outra susceptível, retiraram hemolinfa não melanizada da linhagem de *Anopheles* susceptível, e inocularam juntamente com esferas

de Sephadex na linhagem de *Anopheles* refratário. Observaram então que houve uma diminuição na melanização das esferas de Sephadex. Vale ressaltar que na linhagem refratária de *Anopheles*, normalmente ocorre um aumento da melanização tanto das esferas de Sephadex quanto dos parasitos, se comparada com a linhagem susceptível. Além disso, quando esferas de Sephadex foram primeiramente inoculadas *in vivo* em mosquitos susceptíveis e essas esferas foram então retiradas, lavadas e inoculadas em mosquitos refratários, também foi observada uma forte redução na melanização. A incubação de esferas *in vitro* em hemolinfa de insetos refratários e susceptíveis, resultou na redução da melanização quando posteriormente essas esferas foram inoculadas em mosquitos refratários. Os autores sugeriram a existência de fatores que previnem a melanização das esferas de Sephadex em mosquitos da linhagem susceptível. Estes mesmos fatores presentes na hemolinfa, poderiam posteriormente prevenir a melanização em mosquitos refratários.

Em trabalho anterior, (PASKEWITZ & RIEHLE, 1994), utilizando ainda duas linhagens do mosquito *Anopheles gambiae*, observaram que a linhagem refratária forma uma cápsula melanótica em torno do parasito *Plasmodium sp*, no intestino médio, destruindo-o. Já na linhagem susceptível o parasito desenvolveu-se normalmente. Para examinar a base da diferença entre a resposta imune destas duas linhagens, utilizaram a comparação com a resposta à inoculação de Sephadex sem a ocorrência de parasitismo. Houve uma reação muito forte contra o Sephadex na linhagem refratária, na qual 49% das esferas de Sephadex ficaram totalmente melanizadas após 1 dia de inoculação, contra 5% na linhagem susceptível. Após 3 dias houve aumento da melanização em 91% das cápsulas em torno do Sephadex na linhagem refratária, contra 9% na linhagem susceptível. Os autores concluíram que a linhagem refratária de *Anopheles gambiae* possui maior aptidão que a linhagem susceptível, para reconhecer e encapsular tanto o agente abiótico, no caso o Sephadex, quanto os parasitos causadores da malária.

Também CHUN *et al.* (1995), trabalhando com as mesmas linhagens de *Anopheles gambiae*, refratária e susceptível, observaram em microscopia de luz e em eletrônica de varredura os estágios inicial e tardio da melanização de esferas de Sephadex. Foram observadas, em insetos refratários, grandes cápsulas enegrecidas e coalescentes; portanto, uma ativação do sistema de proPO com conseqüente aumento da melanização/encapsulação das esferas de Sephadex em mosquitos refratários. A ativação do sistema de proPO também ocorreu em hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* inoculadas com esferas de Sephadex. Além disso, no presente trabalho, observamos em MET que as esferas de Sephadex foram reconhecidas como elemento “não próprio” e provocaram a reação de encapsulação celular nos insetos inoculados, a semelhança do trabalho citado acima.

Por fim, realizamos uma análise do efeito da inoculação de material abiótico em insetos parasitados, Grupos P, P+S e P+Se, comparados aos controles, Grupos C, S e Se, respectivamente. Salientamos que não há na literatura grupos experimentais semelhantes, para a confrontação dos nossos resultados. De um modo geral, houve uma inibição significativa do sistema de proPO, nos períodos de inoculação inicial (2 h), intermediária (3 dias) e tardia (6 dias) na hemolinfa de insetos parasitados pela *Cotesia flavipes*, ou seja, em todos os períodos, nos grupos de insetos com parasitismo ou com parasitismo concomitante a inoculação de SSI ou Sephadex, ocorreu a inibição do sistema de proPO.

Em nosso trabalho, observamos em MET a formação da cápsula melanótica em torno de esferas de Sephadex na hemocele de insetos inoculados com esferas de Sephadex concomitante ao parasitismo pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se). Apesar de ter ocorrido diminuição na ativação do sistema de proPO, o Sephadex foi reconhecido com elemento não-próprio e encapsulado; já o parasitóide não foi reconhecido e se desenvolveu com sucesso, nos insetos inoculados com Sephadex. Fica claro, mais uma vez, que é importante que o sistema de proPO esteja inibido para o estabelecimento do parasitismo.

Compararmos entre si os grupos de insetos parasitados, P, P+S e P+Se. Em parasitismo inicial (2 h), observamos que a ativação espontânea do sistema de proPO na hemolinfa de larvas somente parasitadas (Grupo P) não diferiu com a de larvas parasitadas e inoculadas com veículo (Grupo P+S) ou com agente abiótico (Grupo P+Se). Já na presença do ativador tripsina, somente no grupo em que havia inoculação de agente abiótico (Grupo P+Se) houve um aumento significativo dos níveis de ativação do sistema de proPO, indicando que o agente abiótico propiciou, já no período inicial, um aumento na ativação do sistema de proPO em presença de tripsina.

Após 6 h de parasitismo e/ou inoculação houve um aumento significativo nos níveis de ativação do sistema de proPO em todos os grupos experimentais, tanto espontânea como na presença de ativador – sendo que no Grupo P+Se a ativação foi maior que no Grupo P+S, que por sua vez foi maior que no Grupo P. Fica evidente que a presença do agente abiótico faz com que haja aumento na ativação do sistema de proPO; assim também o veículo (Grupo P+S), porém de forma menos acentuada. Assim a inoculação de agente abiótico em insetos parasitados (controle = Grupo P+S) ativa o sistema de proPO nas primeiras horas (ainda que em níveis reduzidos pela ação do parasitóide), acarretando a encapsulação deste agente.

2. DETECÇÃO *in vitro* DE HEMÓCITOS COM REACÇÃO POSITIVA PARA PO

Inicialmente, vamos discutir as dificuldades técnicas enfrentadas nesta etapa do trabalho, que frustraram a obtenção de dados mais claros sobre a localização celular da PO em insetos controle (Grupo C) e na vigência do parasitismo (Grupo P).

No experimento de detecção de hemócitos com reacção positiva para PO, houve dificuldade de reprodução da técnica, embora tenhamos obtido, numa primeira tentativa, excelentes resultados. A hemolinfa de *Diatraea saccharalis* possui osmolaridade de 360mOsmKg^{-1} , utilizada nas soluções, mas com resultados frustrantes nos testes posteriores, embora FALLEIROS (1995) tenha conseguido bons resultados. Trocamos o tampão CacS-380, com osmolaridade ligeiramente acima da hemolinfa do nosso inseto, para o tampão TCS com osmolaridade de 342mOsmKg^{-1} , muito parecida com a osmolaridade do inseto. Experimentamos também colocar na lâmina a hemolinfa pura ou diluída em tampão; testamos diversos tempos de adesão dos hemócitos nas lâminas; testamos diversos tempos de fixação com diferentes concentrações do fixador; quando a tripsina era adicionada variamos o tempo de incubação e sua concentração; por vezes colocamos tripsina junto com o L-Dopa e ainda usamos alternativamente tripsina de suíno ao invés de bovino; variamos o tempo de incubação com o L-Dopa e o tempo de refixação. Todas estas alterações foram realizadas em várias combinações como demonstrado nas figuras dos resultados; porém todas as tentativas foram vãs, não sendo possível detectar onde estava o erro experimental, o que impossibilitou repetir a técnica com sucesso. O material ficava enegrecido devido à melanização, não permitindo a visualização perfeita para a contagem do tipo de hemócito marcado para PO^+ , já que às vezes, outros tipos de hemócitos ficavam escuros e davam uma falsa impressão de estarem marcados.

Na maioria dos insetos a PO é encontrada em sua forma inativa, a proPO (ASHIDA, 1981; LEONARD *et al.*, 1985a; SÖDERHALL *et al.*, 1996), e a presença de qualquer elemento “não próprio” ou injúria é capaz de desencadear sua conversão na forma ativa, a PO, iniciando uma série de reacções de defesa, relacionadas com esta cascata enzimática (RATCLIFFE *et al.*, 1985; RATCLIFFE & ROWLEY, 1987).

Os OE foram os únicos hemócitos de *Diatraea saccharalis* a reagirem positivamente à técnica de detecção da PO, em nível de MO, concordando com FALLEIROS (1995). A reacção foi visualizada de maneira difusa por todo o citoplasma, não estando aparentemente confinada a compartimentos citoplasmáticos.

Os tipos celulares que contém a PO variam, em função da espécie de inseto estudada. Em *Galleria mellonella* (DECLEIR *et al.*, 1960), em *Antheraea pernyi* (MONPEYSSIN &

BEAULATON, 1977), em *Bombyx mori* (KAWASE, 1960; IWAMA & ASHIDA, 1986), em *Spodoptera litura* (KURIHARA *et al.*, 1992), em *Manduca sexta* (JIANG *et al.*, 1997) e em *Chrysomya megacephala* (FARALDO, 2004), os OE são as células descritas como portadoras de PO. Outros trabalhos demonstraram a presença desta enzima em GR de *Galleria mellonella* (SCHMIT *et al.*, 1977), em PL de *Leucophaea maderae* (PRESTON & TAYLOR, 1970) e em coagulócito (CO) de *Locusta migratoria* (HOFFMANN *et al.*, 1970).

Segundo MONPEYSSIN & BEAULATON (1977), a atividade enzimática no OE estaria localizada em dois sítios distintos: em inclusões citoplasmáticas globulares e no citosol. De acordo com estes autores, a não reatividade em compartimentos como o complexo de Golgi e o RER, bem como a ausência de gradiente de precipitado, permitiram excluir a hipótese de uma migração da enzima ou do produto da reação dos grânulos para o citosol.

IWAMA & ASHIDA (1986), utilizando anticorpo monoclonal contra proPO em *Bombyx mori*, observaram que somente o OE incorporava o anticorpo, indicando que este tipo celular seria o responsável pela síntese da proPO. KURIHARA *et al.* (1992) também concluíram que o OE possui proPO, e que a fixação seria suficiente para ativar a enzima, já que o índice de melanização desta célula aumentou com longos tempos de fixação, cerca de 3 h em glutaraldeído.

Entretanto, a localização dessa enzima, se celular ou humoral, tem sido causa de discordância entre os autores. ASHIDA *et al.* (1990) acreditam que o sistema de proPO está presente apenas no plasma e na cutícula de insetos. LEONARD *et al.* (1985b) detectaram a atividade de PO em lisados de hemócitos e na hemolinfa de *Blaberus craniifer*, após a ativação da proPO com β -1,3-glucan, e acreditam que o sistema de proPO está presente tanto nos hemócitos como no plasma. De acordo com ASHIDA & BREY (1997), a ativação da proPO para localização do sistema de proPO pode não ser adequada, pois a PO produzida no plasma após a liberação da pró-enzima pelos hemócitos, desde o momento da coleta da hemolinfa, pode formar agregados ao redor dos mesmos, resultando numa localização artificial do sistema de proPO.

Em nosso trabalho anterior (NUNES, 2001) não conseguimos, ultra - estruturalmente, detecção citoquímica de PO no OE, fato também referido por FALLEIROS (1995) para o mesmo inseto; a explicação que a autora encontrou para a diferença dos resultados encontrados em microscopia de luz (quando observou reação positiva para a enzima) e microscopia eletrônica (reação negativa), foi a dificuldade de se visualizar uma enzima solúvel em citosol, normalmente electrón-denso por conter abundantes ribossomos livres.

MENEZES (1984), trabalhando com hemócitos de *Bombyx mori*, detectou ultra - estruturalmente a presença da PO em vesículas de GR, enquanto que os OE apresentaram

reação negativa a esta enzima. Entretanto, em preparações para microscopia de luz a PO foi detectada em vesículas de alguns GR e no citoplasma de OE. O autor justificou seus resultados alegando que a fixação do material em metanol, para microscopia de luz, ativaria a enzima que se encontra na forma de proPO; para a microscopia eletrônica, em que a reação foi processada após a fixação em glutaraldeído, apenas a PO na forma ativa dos GR pôde ser revelada. Sugeriu também que com o rompimento do OE, a proPO seria liberada para a hemolinfa e ativada. Já nos GR, a forma ativa (PO) empacotada em vesículas seria descarregada em regiões determinadas, devido à capacidade de mobilização desta célula.

Em grande número de insetos, o citoplasma de OE possui atividade de PO, que pode ser detectada após incubação com tirosina ou L-DOPA (CROSSLEY, 1975; DRIF & BREHÉLIN, 1983; FALLEIROS, 1995). Como a enzima PO deve estar presente sob a forma de proPO, utilizamos alternativamente a tripsina que aumenta a quantidade de PO produzida, quando comparada à ativação espontânea que ocorre com a coleta da hemolinfa (GREGÓRIO & RATCLIFFE, 1999b).

A função de OE ainda é pouco conhecida, mas a presença da atividade de PO indica que esta célula pode desempenhar papel no metabolismo de melaninas, na vigência da formação de cápsulas ao redor de material estranho. Os OE são células geralmente instáveis *in vitro*; em *Drosophila* ocorre ruptura de OE nestas condições. Este fato, somado à atividade de PO, pode indicar um papel para estas células no reconhecimento do não-próprio (GÖTZ, 1986a; SÖDERHÄLL & SMITH, 1986).

Observamos em nosso trabalho anterior (NUNES, 2001), que este tipo celular apresenta vacúolos positivos para fosfatase ácida e trimetafosfatase, como observado por FALLEIROS (1995), corroborando com as evidências de que OE apresentam compartimentos lisossomais.

Em outros trabalhos (FALLEIROS, 1995; NUNES, 2001), observou-se em *Diatraea saccharalis* que alguns dos OE apresentavam citoplasma desprovido de organelas, com escassas mitocôndrias e raros vacúolos, e que outros OE da mesma preparação apresentavam Golgi e alguns compartimentos membranosos. Tais achados, ao lado da variabilidade de tamanho dos OE principalmente em preparações de MO, sugerem a presença de diferentes estágios de maturidade celular na circulação. Vimos ainda que o parasitismo de *Diatraea saccharalis* pela *Cotesia flavipes* provoca alterações morfológicas ultra-estruturais importantes nos OE, proporcionais ao tempo de parasitismo, culminando com o rompimento da membrana plasmática com liberação de conteúdo citoplasmático e do núcleo da célula (NUNES, 2001). Isto provavelmente ocorreu em pelo menos alguns OE, em nosso experimento de detecção de hemócito positivo para PO, já que a gota de material coletado ficava muito melanizada. A ruptura ou lise de OE é freqüente em insetos, na vigência de

diferentes agressões. KURIHARA *et al.* (1992) observaram o mesmo fenômeno em *Spodoptera litura*, em nível de microscopia de luz, em experimentos in vivo de fagocitose de tinta da Índia e de encapsulação de látex. DAVIES *et al.* (1987) mostraram lise de OE em larvas de *Heliothis virescens* parasitadas por *Campoletis sonorensis*. RIBEIRO *et al.* (1996) observaram ultra - estruturalmente, OE rarefeitos em *Mythimna unipuncta* depois da inoculação de sacarato de ferro ou Epon.

Nossos resultados demonstraram, em tempos tardios de parasitismo, a lise dos OE. Não sabemos se esta lise ocorre para que haja extravasamento do conteúdo citoplasmático e liberação da PO, ou, sob a ação do parasitismo, para impedir a liberação de enzima factível de ser ativada.

3. EFEITO DO PARASITISMO E/OU DA INOCULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO NA PRODUÇÃO DE NO

Em invertebrados, muitos estudos têm sido feitos relacionando a produção de NO ao efeito citotóxico contra patógenos e também aos mecanismos de sinalização em vários processos fisiológicos (COLASANTI & VENTURINI, 1998). Entretanto, pouco existe na literatura sobre a produção dessa molécula em insetos, e raras são as citações da produção de NO na vigência de parasitismo (NAPPI *et al.* 2000; WHITTEN *et al.*, 2001); alguns trabalhos descrevem sua produção em tecidos (ELPHICK *et al.* 1993; RIBEIRO & NUSSENZVEIG, 1993; LUCKHART *et al.*, 1998) e outros evidenciam a geração de NO na hemolinfa (WEISKE & WIESNER, 1999; NAPPI *et al.* 2000; WHITTEN *et al.*, 2001; FOLEY & O'FARREL, 2003; FARALDO, 2005).

Em nosso trabalho constatamos a existência de uma produção basal de NO na hemolinfa dos insetos controle (Grupo C) que variou ao longo do desenvolvimento larval. A idade, por si só, revelou-se um fator importante na produção de NO na hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis*. Houve uma diminuição dos níveis de produção de NO à medida que as larvas se desenvolviam. Este fato poderia ser explicado pela proximidade da pupação da larva, que ocorre em torno dos 35 dias. A pupação acarreta grandes transformações nos insetos, incluindo talvez a diminuição, na hemolinfa, de substâncias importantes na reação de defesa, como o NO. Vale ressaltar que a mesma diminuição ocorreu com os níveis de ativação de proPO, com o avanço do desenvolvimento larval.

FARALDO (2005) também observou em hemolinfa de *Chrysomya megacephala* que existiu uma produção basal de NO em larvas controle (larvas não injetadas) que foi semelhante à de larvas injetadas com SSI, até 12 h pós-inoculação. WHITTEN *et al.* (2001), trabalhando com *Rhodnius prolixus* também observaram a produção basal de NO para este inseto, no intervalo de 3 dias, a qual não apresentou variação significativa neste curto período, pois o inseto em questão pode viver cerca de um ano e meio. NAPPI *et al.* (2000), trabalhando com *Drosophila melanogaster* e *Drosophila teissieri* também observaram uma produção basal de NO em larvas controle, embora não tenham feito a medição ao longo do desenvolvimento do inseto. Assim, em nenhum destes trabalhos foi realizada a medição dos níveis basais de produção de NO ao longo do desenvolvimento do inseto, como por nós apresentado.

Observamos em nossos resultados que os níveis de produção de NO da hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Grupo P) diminuíram nas primeiras horas de parasitismo, considerado parasitismo inicial e recente (2 h e 6 h). Já no parasitismo intermediário e tardio (3 e 6 dias), as diferenças não foram significativas quando comparadas com seus respectivos grupos controle (Grupo C). O fato de as larvas de *Diatraea saccharalis* apresentarem, logo nas primeiras horas de parasitismo, uma redução nos níveis de produção de NO na hemolinfa, sugere que o parasito, que se desenvolve com sucesso na hemocele do hospedeiro, deve ter iniciado mecanismos para evitar o sistema de defesa da larva hospedeiro, incluindo uma diminuição da quantidade de NO. Esta hipótese de bloqueio inicial dos mecanismos de defesa do inseto hospedeiro, é corroborada com os dados da ativação do sistema de proPO, onde vimos que o parasitismo também provoca uma diminuição na ativação espontânea (tampão) e induzida (tripsina) nos períodos experimentais analisados. Após 3 e 6 dias, quando o parasitismo já se estabeleceu, é provável que o NO deixe de ser determinante na eliminação do parasitóide, pois os níveis desta molécula se restabelecem na hemolinfa.

Existe variabilidade na produção de NO em insetos infectados, dependendo da espécie de inseto e do agente patógeno. A produção de NO nas amostras de hemolinfa de duas espécies de *Drosophila* infectadas com ovos de *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae) apresentaram-se significativamente maiores que nos controles, embora tenham sido medidas apenas entre 24 h e 26 h após a inoculação (NAPPI *et al.*, 2000); entretanto, nestes insetos os ovos do parasitóide são encapsulados pelo hospedeiro, o que não acontece com a *Diatraea saccharalis*. Em *Rhodnius prolixus* os níveis de NO produzidos pela hemolinfa também tiveram um aumento significativo após 1 e 2 dias de inoculação de *Trypanosoma rangeli* (WHITTEN *et al.*, 2001).

Em algumas situações, à semelhança do ocorrido em nosso experimento, a reação inicial dos insetos frente à inoculação de agente estranho é a diminuição dos níveis de produção de NO. FOLEY & O'FARREL (2003), observaram inicialmente uma diminuição da produção de NO em larvas de *Drosophila* após as primeiras horas de infecção com bactérias gram-negativas. No segundo dia, porém, houve um aumento da produção de NO quando comparado com larvas controle. Esses resultados mostraram que o aumento na produção de NO tornou-se necessário para uma resposta imune efetiva contra as bactérias gram-negativas, que foram eliminadas. Os autores concluíram que a infecção induziu, ainda que tardiamente, um aumento na produção de NO e este intermediou os passos iniciais da resposta imune inata em infecção contra bactérias gram-negativas.

A fim de estudar a reação dos insetos parasitados pela *Cotesia flavipes* frente a um agente abiótico (esferas de Sephadex) e sua relação com o experimento que utilizou apenas insetos não parasitados, foi necessário primeiramente verificar se a presença do veículo (SSI), por si só, teria efeito na produção de NO. No experimento realizado, após 2 h e 6 h de inoculação (inoculação inicial e recente), houve uma diminuição dos níveis de produção de NO, na hemolinfa das larvas inoculadas com SSI (Grupo S), quando comparadas com o grupo controle (Grupo C). Após 3 e 6 dias (inoculação intermediária e tardia) não houve diferença entre os grupos C e S. A redução dos valores obtidos para os níveis de NO nas primeiras horas (2 h e 6 h) pode ser explicada em função da considerável perda no volume de hemolinfa que ocorre durante a inoculação, e ainda porque a hemolinfa encontra-se diluída logo após este procedimento. Após 3 e 6 dias estes níveis se normalizaram, provavelmente devido à recuperação do volume de hemolinfa. Salientamos que no Grupo S houve também uma diminuição da ativação do sistema de proPO, espontânea (tampão) e induzida (tripsina), em todos os períodos experimentais (2 h e 6 h, 3 e 6 dias) quando comparados ao Grupo C.

A literatura mostra diferenças na produção de NO em insetos inoculados com SSI. FARALDO (2005), por exemplo, observou que a produção de NO em larvas controle e larvas inoculadas com SSI até 12 h foram semelhantes. A autora creditou tal semelhança ao nível basal produzido pelas células em resposta à simples manipulação das larvas para a obtenção de hemolinfa. Segundo o mesmo trabalho, ocorreu um aumento da produção de NO após 1 e 2 dias de inoculação de SSI nas larvas, quando comparadas ao controle. Já WHITTEN *et al* (2001) observaram que não houve diferenças significativas nos níveis de produção de NO de hemolinfa de *Rhodnius prolixus* controle e de insetos inoculados com solução tampão ao longo de 3 dias; porém, os autores não discutiram estes dados, já que a pesquisa destinava-se à análise dos níveis de produção de NO em insetos parasitados com diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli*.

Quando comparamos o grupo de larvas parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S) com seu respectivo controle (Grupo S) observamos para o Grupo P+S uma diminuição da produção de NO nos tempos intermediário e tardio (3 e 6 dias). Assim, ocorreu o inverso do constatado entre larvas parasitadas (Grupo P) e controle (Grupo C), onde a diminuição dos níveis de produção de NO, como dito anteriormente, ocorreu nas primeiras horas. Não temos explicação para este fato, já que no Grupo P+S também ocorreu perda e diluição de hemolinfa (pela inoculação do veículo SSI) nas primeiras horas de parasitismo/inoculação. Na ativação do sistema de proPO observamos que houve diminuição em todos os tempos

experimentais do Grupo P+S, quando comparados com o Grupo S. Devemos salientar que não há na literatura dados para a comparação dos nossos resultados.

Ao compararmos os grupos de larvas onde inoculamos SSI (Grupo S), Sephadex (Grupo Se), Sephadex concomitante ao parasitismo pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se), ou ainda larvas inoculadas com SSI concomitante ao parasitismo pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+S), observamos que após 2 h não houve diferença significativa dos níveis de produção de NO, entre os grupos experimentais.

Confrontando nossos dados com a literatura observamos que há diferenças nos níveis de produção de NO frente à inoculação de agente estranho. WEISKE & WIESNER (1999), descreveram no lepidóptero *Estigmene acraea* que a produção de NO pelos hemócitos, ativados por 2 h com lipopolissacarídeos (LPS) ou esferas de silicone, já se apresentou significativamente maior que nos controles. Também FARALDO (2005), observou em *Chrysomya megacephala* que em 0,5 h, 2 h, 4 h, 12 h, 1 e 2 dias após a inoculação com leveduras, os níveis de produção de NO apresentaram-se significativamente maiores que nos controles (larvas injetadas com SSI) em quase todos os tempos de inoculação, e atingiram um pico de produção 1 dia após a inoculação e um subsequente decréscimo a níveis basais após 2 dias.

Ao compararmos os grupos S, Se, P+Se e Grupo P+S, após 6 h, observamos que houve um aumento significativo dos níveis de produção de NO na hemolinfa de larvas parasitadas e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se), quando comparadas com larvas parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S). A presença do elemento que difere os grupos, o Sephadex, provoca, quando inoculado sozinho ou em associação com a *Cotesia flavipes*, aumento dos níveis de produção de NO, acompanhado de aumento da ativação do sistema de proPO, visto em nosso trabalho, com consequente encapsulação neste período conforme descrito por BOMBONATO (1999).

A ação do NO está presente nos mecanismos de auto-imunidade e na inflamação (FLORA & ZILBERSTEIN, 2000). Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro. No Grupo P+Se após 6 h, sugerimos que o aumento dos níveis de NO talvez esteja relacionado com uma inflamação causada pela inoculação do Sephadex.

Nossos resultados sugerem ainda que o NO e também a proPO têm um papel importante e essencial do arsenal citotóxico da *Diatraea saccharalis* para reconhecer e combater agentes estranhos, no caso o Sephadex.

Após 3 dias, os níveis de produção de NO diminuíram na hemolinfa de larvas parasitadas e inoculadas com Sephadex (Grupo P+Se) e em hemolinfa de larvas parasitadas e inoculadas com SSI (Grupo P+S), em relação às não parasitadas inoculadas com SSI (Grupo S). Não temos uma explicação para esta redução dos níveis de produção de NO para o Grupo P+Se, já que pela presença do agente abiótico a tendência seria de aumento, como visto 6 h após a inoculação. No caso do Grupo P+S, o parasitóide parece ser o responsável pela diminuição dos níveis de produção de NO, já que ele é o elemento diferenciador. Entretanto, para os grupos de insetos não inoculados com SSI, ou seja, para a comparação entre larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Grupo P) e seu respectivo controle (Grupo C), não houve diferença significativa nos níveis de NO neste mesmo período. Tal divergência nos leva a sugerir que além do parasitóide, também o próprio veículo (SSI) injetado nas larvas faz com que haja uma redução nos níveis de NO após 3 dias de sua inoculação, como já mencionado pela perda e diluição da hemolinfa, que diante de agressões sucessivas (parasitismo + inoculação) não tem tempo de restabelecer os níveis normais.

Já com 6 dias de inoculação, quando comparamos os grupos S, Se, P+Se e P+S, observamos que se manteve a redução dos níveis de produção de NO nas larvas do Grupo P+S quando comparadas com o grupo controle (Grupo S). Porém, neste período o grupo injetado com Sephadex (Grupo Se) também apresentou níveis mais baixos de NO quando comparados com o grupo controle (Grupo S). Uma explicação para esta redução na produção de NO nas larvas injetadas somente com Sephadex é difícil, visto que o elemento abiótico causa reação de defesa celular (encapsulação) nas larvas de *Diatraea saccharalis*, o que parece não acompanhar a reação de produção de NO. O que podemos sugerir, neste caso, é que a molécula de NO após 6 dias de encapsulação do Sephadex não é um fator decisivo para o término do processo de formação da cápsula.

Pelo presente trabalho, observamos que de uma maneira geral, houve uma tendência dos níveis de produção de NO em acompanhar os níveis de ativação do sistema de proPO. O parasitóide, que não foi reconhecido e se desenvolveu com sucesso na hemolinfa do inseto hospedeiro, inibiu os níveis de produção de NO e a ativação do sistema de proPO.

A ativação da proPO é fator decisivo na produção de PO e na encapsulação de partículas estranhas (ASHIDA, 1981; SÖDERHALL, 1982; LEONARD *et al.* 1985a,b; SAUL & SUGUMARAN, 1988). Já o papel do NO em insetos ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se que o NO é um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir células tumorais e patógenos, fazendo parte assim, do

arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, de ação antibactericida, antiviral e antiparasítica (DRAPIER *et al.*, 1988, GAZZINELLI *et al.*, 1992; FENG & WALKER, 1993; LOWENSTEIN *et al.*, 1993; OSWALD *et al.*, 1994). Assim, no caso do parasitóide, parece importante que a produção de NO esteja inibida, pelo menos nas primeiras horas, para que o parasito se desenvolva com sucesso.

4. LOCALIZAÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A localização celular da produção de NO foi realizada com reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1981), em hemolinfa de larvas do grupo controle (Grupo C – Larvas com 20, 23 e 26 dias de desenvolvimento) e de larvas parasitadas (Grupo P – Larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* após 2 h, 6 h, 3 e 6 dias), sem resultados positivos. Não foi possível, portanto, evidenciar marcação celular da produção de NO em nenhum dos cinco tipos de hemócitos existentes, PL, GR, ES, OE ou VE. O teste foi repetido por diversas vezes, sem êxito.

Também pelo método de Griess, utilizando hemolinfa de larvas de *Drosophila* parasitadas por *Leptopilina boulardi*, NAPPI *et al.* (2000) verificaram que os hemócitos envolvidos na produção de NO foram os lamelócitos, uma linhagem de PL, os quais estiveram presentes apenas em hemolinfa de larvas parasitadas; em larvas controle foram identificados somente precursores de PL e células “cristal”, as quais não foram coradas pelo reagente.

FARALDO (2005), trabalhando com hemolinfa de larvas de *Chrysomya megacephala* injetadas com SSI, injetadas com leveduras e larvas controle, verificou 1 dia após as injeções que os hemócitos marcados com o reagente de Griess foram os GR, e somente na hemolinfa de larvas injetadas com levedura; segundo a autora, por serem os GR os principais fagócitos dessa espécie. Neste tempo experimental o nível de produção de NO, para a hemolinfa de larvas injetadas com leveduras, foi de 45µM/ml (FARALDO, 2005).

Os níveis de produção de NO, para os experimentos de NAPPI *et al.* (2000), variaram de 90 a 110µM/ml em hemolinfa de larvas parasitadas. Em nosso trabalho, os níveis de produção de NO na hemolinfa de larvas controle (Grupo C) variou entre 90µM/ml em larvas com 20 dias de desenvolvimento e 50µM/ml em larvas com 26 dias de desenvolvimento. Para larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Grupo P), a quantidade de NO produzido foi de 60µM/ml para larvas com 2 h e 6 h de parasitismo, e 70µM/ml após 3 dias de parasitismo.

Entendemos que as comparações abrangem insetos de ordens diferentes, e que pode haver diferenças quanto à “sensibilidade” celular para a marcação com a referida técnica. Entretanto, pela quantidade de NO produzida segundo o trabalho de NAPPI *et al.* (2000), podemos dizer que, como a *Diatraea saccharalis* apresenta níveis de produção de NO menores, não foi possível a localização celular com a técnica empregada. Porém, se nos basearmos no trabalho de FARALDO (2005), faltará uma explicação para a marcação negativa do hemócito que produziu a molécula de NO, uma vez que a quantidade produzida na hemolinfa de *Diatraea saccharalis* foi maior que a citada pela autora, para a *Chrysomya megacephala*.

5. REAÇÃO DE ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ABIÓTICO EM LARVAS DE *Diatraea saccharalis* PARASITADAS PELA VESPA *Cotesia flavipes*

Inicialmente, discutiremos as inúmeras dificuldades técnicas enfrentadas na inoculação de material inerte (Sephadex) nas larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes*. No momento em que inoculávamos as esferas, muitos insetos morriam quase que imediatamente, o que nos levou a inocular um número maior de insetos para o sucesso do procedimento (aumentamos de 10 larvas propostas inicialmente, para 20 larvas por tempo de parasitismo/inoculação); para minimizar as perdas, diminuimos a quantidade do inoculado de 0,1mg/ml de solução para 0,05mg/ml. Nos 2 dias que sucederam à inoculação foi comum encontrarmos insetos mortos; passados estes 2 dias, os insetos sobreviventes desenvolviam-se bem.

A recuperação dos materiais inertes nas larvas parasitadas/inoculadas, nos tempos iniciais (6 h, 12 h e 1 dia) foi muito difícil, já que era impossível a visualização macroscópica das esferas de Sephadex; na tentativa de examinar estas esferas, retiramos a hemolinfa total do inseto e processamos o material como um todo.

A observação macroscópica das esferas de Sephadex com 6 h, 12 h e 1 dia de inoculação, concomitante ao parasitismo, não foi possível, uma vez as esferas inoculadas ainda não estavam melanizadas e confundiam-se com o corpo gorduroso e estruturas internas das larvas. Realizamos então inúmeros testes com corantes, para melhor visualização das esferas na hemocele.

Segundo TANAKA (1987b) partículas de Sephadex coradas com o Vermelho Congo, antes de serem inoculadas em larvas de *Pseudaletia separata*, coraram-se adequadamente; também LAVINE & BECKAGE (1996) recuperaram facilmente as esferas de Sephadex coradas em *Manduca sexta*. Entretanto, nossas tentativas em recuperar esferas de Sephadex previamente coradas com Vermelho Congo não deram certo, já que as esferas não se mantinham coradas no interior da larva. Há citações (BREHÉLIN *et al.*, 1975; PECH & STRAND 1996) de utilização de Azul de Coomassie a 0,1 %, para corar esferas de Sephadex; realizamos testes com duas marcas do produto, com os quais também não obtivemos sucesso.

Tentamos corar as esferas com outros tipos de corantes: Azul Tripán (1%), Hematoxilina (0,5%), Sudan Black (0,7%), Fast Green (1%), Azul de Metileno (0,1%), Azul de Toluidina (0,1%) e Tinta da China (0,1%) – todas as tentativas sem sucesso. Realizamos também testes com corantes fluorescentes como DAPI, Cromomicina e Fluoresceína que também não mantiveram a coloração das esferas de Sephadex.

LAVINE & BECKAGE (1996), observaram que após 1 dia de parasitismo pela vespa *Cotesia congregata*, as larvas de *Manduca sexta* mostraram uma forte supressão de sua resposta de encapsulação às esferas de Sephadex, após 2 e 3 dias de sua inoculação. Diferentemente, quando a inoculação das esferas de Sephadex foi feita após 8 dias de parasitismo, a frequência da encapsulação das esferas de Sephadex, após 2 e 3 dias da inoculação, não diferiu das larvas controle (não parasitadas). Segundo os autores, esta supressão da encapsulação das esferas, no período inicial do parasitismo, correlacionasse com anormalidades morfológicas ocorridas nos hemócitos do hospedeiro; estes apontaram o PDV como o principal responsável pelas alterações. O fato de não conseguirmos material melanizado, até 1 dia após o parasitismo, pode ser explicado pelo trabalho destes autores, que sugeriram que alterações comportamentais dos hemócitos geram incapacidade de encapsular material estranho.

Também não conseguimos obter esferas de Sephadex em larvas parasitadas pela *Cotesia flavipes* após 10 dias, quando a hemocele era tomada por uma grande massa de parasitóides, tornando impossível a visualização de esferas de Sephadex melanizadas.

Não conseguimos, portanto, material para a análise à MET com 6 h, 12 h, 1 e 10 dias após a inoculação, pela dificuldade de recuperação das esferas de Sephadex na hemocele da larva de *Diatraea saccharalis*.

Nos tempos intermediários de 2 e 3 dias, as esferas já melanizadas eram encontradas dispersas na hemocele do inseto. Já nos tempos tardios de inoculação, 6 e 10 dias (sendo que aos 10 dias, somente inoculadas com Sephadex), as esferas se concentravam na região posterior do inseto, formando uma massa escurecida. Não encontramos na literatura descrição semelhante para outro inseto, porém este fato já havia sido observado por BOMBONATO (1999) em *Diatraea saccharalis*.

Antes da recuperação dos materiais inertes implantados, o aspecto macroscópico dos mesmos era analisado ainda na hemocele do inseto; como dito anteriormente, a melanização das esferas de Sephadex foi detectada após 2 dias de inoculação.

Sabe-se que a cápsula é freqüentemente escurecida devido a presença de melanina, produto da ativação do sistema de proPO. Resultado da ativação da pró-enzima proPO, a PO é o componente terminal do sistema, que envolve ativação de proteases e inibidores destas enzimas (SÖDERHÄLL & SMITH, 1986; HUNG & BOUCIAS 1996; BECK *et al.*, 2000; BACCAN *et al.*, 2001). Assim, quando um elemento estranho penetra a hemocele, ocorre a ativação do sistema de proPO, que acarreta a produção de substâncias “imunologicamente”

ativas como opsoninas, moléculas tóxicas e sinais para indução de diferentes tipos de reações de defesa mediadas por hemócitos (SÖDERHÄLL, 1982; RATCLIFFE *et al.*, 1985; NAPPI & VASS, 1993; RATCLIFFE, 1993; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998).

Fatores microbianos tais como bactérias, fungos e componentes da parede celular de fungos, provocam a ativação do sistema de proPO na hemolinfa de insetos (SAUL & SUGUMARAN, 1988; BREHÉLIN *et al.*, 1989; CHARALAMBIDIS *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 1998). Também elementos abióticos possuem a capacidade de promover o desencadeamento do sistema de proPO (LACKIE, 1981, 1988; EHLERS *et al.*, 1992; CAI *et al.*, 2004).

Demonstrou-se que alguns fatores humorais podem afetar o sistema de proPO, provocando alterações na capacidade de espalhamento dos hemócitos sobre superfícies estranhas (requisito para encapsular), e na fagocitose de material particulado (MANDATO *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999; RICHARDS & PARKINSON 2000).

Os estudos sobre a reação de defesa dos insetos referem-se à encapsulação celular como um processo de defesa primário, que envolve a agregação de hemócitos do hospedeiro ao redor de um número muito grande de pequenos invasores (como bactérias, fungos, protozoários e certos vírus), um parasito ou outro elemento estranho de dimensões consideráveis (RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b; LACKIE, 1981; PECH & STRAND 2000).

Estudos das reações do hospedeiro a parasitóides mostram que pode haver uma supressão da imunidade do hospedeiro pelo parasito (VINSON, 1986; ASGARI *et al.*, 1996, 1997; ALLEYNE & WIEDENMANN, 2001a, b; BECK & STRAND 2003, 2005). Em alguns casos, os hemócitos do inseto hospedeiro estão alterados e mostram uma redução em sua capacidade de fagocitar ou encapsular partículas introduzidas na hemocele, em vigência de parasitismo (VINSON, 1977; STOLTZ & GUZO, 1986; PREVOST *et al.*, 1990; LAVINE & BECKAGE, 1996).

O parasitóide *Cotesia flavipes* não é encapsulado pelos hemócitos de *Diatraea saccharalis* (BOMBONATO, 1999; NUNES, 2001), embora o hospedeiro tenha a capacidade de encapsular material inerte, como partículas de Sephadex (BOMBONATO, 1999). Um dos objetivos do nosso trabalho foi constatar *in vivo*, se a introdução de um agente abiótico é capaz de desencadear os sistemas de defesa, teoricamente bloqueados pelo parasitóide, e provocar a encapsulação do Sephadex. Também se a reação do hospedeiro, inicialmente voltada para a encapsulação do Sephadex, poderia torná-lo apto a eliminar o parasitóide.

Várias são as estratégias utilizadas por insetos parasitóides para desenvolverem-se na hemocele de insetos hospedeiros, escapando de maneira eficiente das reações de defesa do hospedeiro: ser reconhecido, fagocitado ou encapsulado, dependendo do tamanho e número (WHITCOMB *et al.*, 1974; EDSON *et al.*, 1982; STOTZ & COOK, 1983; GÖTZ & BOMAN, 1985; GUPTA, 1985; RIZKI & RIZKI, 1990; FLEMING, 1992; DAHLMAN & VINSON, 1993; STRAND *et al.*, 1994; STRAND & PECH 1995a).

Muitos estudos sobre a relação hospedeiro-parasitóide baseiam-se no desenvolvimento de vespas da superfamília Ichneumoidea, especialmente algumas espécies braconídeas e ichneumídeas, em hospedeiros lepidópteros (KITANO, 1969, 1974; STRAND & PECH, 1995a). Nessa relação, diferentes mecanismos devem contribuir para a efetivação da relação inseto hospedeiro-parasitóide, com a eventual introdução de venenos ou vírus durante a ovoposição do parasitóide (STRAND, 1994; WEBB & LUCKHART, 1996).

Durante a oviposição, muitas fêmeas Hymenoptera parasíticas injetam veneno em seu hospedeiro larval. Este veneno é produzido em uma glândula associada ao seu trato reprodutor; este fluido complexo tem propriedades tóxicas e muitos de seus componentes foram caracterizados (EDSON *et al.*, 1982; RIZKI & RIZKI, 1990; JONES & COUDRON, 1993; STRAND *et al.*, 1994; STRAND & PECH, 1995a; WEBB & LUCKART, 1996). Sugere-se que o veneno, além das propriedades tóxicas, esteja envolvido na supressão imune do hospedeiro, como acontece com os venenos da *Apanteles glomeratus* e da *Apanteles kariyai*, que suprimem a resposta de seus respectivos hospedeiros, *Pieris rapae* e *Pseudaletia separata* (KITANO, 1982; TANAKA, 1987a,b).

RICHARDS & PARKINSON (2000), estudando *in vitro* a ação de doses sub-letais de veneno da vespa endoparasítica *Pimpla hipochondriaca* em hemócitos de larvas de *Lacanobia oleracea*, observaram uma potente ação supressora do veneno na resposta imune mediada por hemócitos, diminuindo em 50% a capacidade destas células em encapsular esferas de Sephadex. Além disso, descreveram danos aos hemócitos tais como “desintegração” celular (deixando apenas parte da membrana plasmática e núcleos intactos), rompimento de membrana plasmática, degranulação e diminuição da sua viabilidade, confirmando que o veneno tem propriedades citotóxicas. Também o veneno do parasitóide *Pimpla turionellae* atua diretamente nos hemócitos, inibindo a emissão de pseudópodes (OSMAN, 1978).

CAI *et al.* (2004) trabalhando com *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) parasitado por *Pteromalus puparium* (Hymenoptera: Pteromalidae) também observaram o efeito do veneno nos hemócitos do hospedeiro. Experimentos *in vitro* demonstraram que a porcentagem de

espalhamento dos PL e a encapsulação de esferas de Sephadex, foram significativamente menores. À microscopia eletrônica, mostraram que hemócitos incubados com veneno permaneceram com a configuração arredondada; não se espraiavam e não emitiam pseudópodes. Os autores também sugeriram que o veneno do parasitóide suprimiu ativamente a resposta imune do hospedeiro.

Além dos venenos, outras substâncias inoculadas durante a ovoposição podem comprometer o sistema imune de seus hospedeiros, como é o caso dos polidnavírus (PDV), partículas semelhantes a vírus (FLEMING *et al.*, 1983; WHIFIELD, 1990; FLEMING & SUMMERS, 1991; BECKAGE *et al.*, 1994; STRAND & PECH, 1995b; ASGARI *et al.*, 1996; BECKAGE, 1998, 2003; SHELBY & WEBB, 1999). Os PDV de muitos endoparasitos afetam o comportamento dos hemócitos e/ou sua viabilidade, atuando na supressão dos estágios tardios da resposta de encapsulação mediada por hemócitos (DAVIES *et al.*, 1987; DAVIES & VINSON, 1988; BECKAGE *et al.*, 1994; BECKAGE, 1998, 2003). FEDDERSON *et al.* (1976) mostraram que ovos de *Venturia canescens* apresentam, na sua superfície, partículas semelhantes a vírus, com características bastante parecidas a determinantes protéicos do hospedeiro, sugerindo que o mecanismo de evasão, neste caso, seria o mimetismo molecular.

Em algumas espécies de Braconidae, o veneno pode agir em conjunto com o PDV (KITANO, 1986; GUZO & STOLTZ, 1987; TANAKA, 1987a,b; WAGO & TANAKA, 1989; BECKAGE *et al.*, 1994). Nestes casos sugere-se que o papel acessório do veneno seria facilitar a entrada do PDV no interior das células do hospedeiro (STOLTZ *et al.*, 1988).

Uma vez na hemocele do inseto hospedeiro, ovos de algumas vespas das famílias Braconidae e Scelionidae liberam, na eclosão, células derivadas da membrana serosa, chamadas de teratócitos (TE) (VINSON & LEWIS, 1973; GÖTZ & BOMAN, 1985; STRAND, 1986; TANAKA & WAGO, 1990; DAHLMAN, 1991; STRAND & WONG, 1991; DAHLMAN & VINSON, 1993; STRAND & PECH, 1995a). Inicialmente os TE são células pequenas, aumentando consideravelmente de volume através da captação de nutrientes da hemolinfa, onde circulam livremente junto com os hemócitos do hospedeiro (SALT, 1968; DAHLMAN & VINSON, 1993). O papel desta célula na eficiência do parasitismo ainda não está claro (ZHANG & DAHLMAN, 1989; STRAND & WONG, 1991); postula-se que teria ainda função trófica e secretora (JOINER *et al.*, 1973; DAHLMAN & VINSON, 1993).

Assim, o caminho mais direto para prevenir a reação de encapsulação, utilizando veneno, PDV ou teratócitos, seria destruir os hemócitos, diminuir seu número na circulação ou alterar o comportamento destas células, que atuam na formação da cápsula. Portanto, é

consenso entre os pesquisadores que o parasitismo por endoparasitóides deve levar à redução na capacidade de espalhamento de hemócitos do hospedeiro (PL), com conseqüente redução da atividade de encapsulação destes organismos. Geralmente as contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH) também são afetadas, bem como sua morfologia. Tais alterações podem ser induzidas pela injeção de fluido de cálice, PDV, veneno, TE, proteína ovariana ou proteína de superfície do ovo (DAVIES & VINSON, 1986; ASGARI & SCHMIDT, 1994; BECKAGE et al., 1994, 2003; HARWOOD et al., 1994; LI & WEBB, 1994; STRAND, 1994; LUCKHART & WEBB, 1996; WEBB & LUCKHART, 1996; STETTLER et al., 1998).

A *Cotesia flavipes* ao parasitar um hospedeiro considerado “refratário”, como é o caso da *Manduca sexta* (Lepidoptera), não consegue se desenvolver com sucesso. Larvas de 1º, 2º, 3º, 4º e 5º instar foram rapidamente parasitadas por fêmeas do parasitóide, porém as larvas não eclodiram deste hospedeiro. Os ovos do parasitóide foram invariavelmente encapsulados pelos hemócitos de *Manduca sexta*, sendo que o primeiro estágio da encapsulação ficou evidente após 2 h de inoculação. Entretanto, poucos insetos hospedeiros conseguiram se desenvolver até o estágio de pupa. A dissecação de larvas e pupas sobreviventes mostrou ovos de vespas encapsulados e evidências de melanização (PÉREZ et al., 2005).

No presente trabalho, observamos que as esferas de Sephadex foram reconhecidas como elemento “não próprio” e provocaram a reação de encapsulação celular, tanto nos insetos inoculados com Sephadex (Grupo Se), como nos insetos em que a inoculação do agente abiótico ocorreu simultaneamente com o parasitismo pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se).

Devemos salientar que a discussão de nossos achados foi dificultada pela exigüidade, na literatura, de trabalhos com insetos parasitados submetidos à inoculação de agente abiótico, ou seja, com a observação da formação da cápsula na vigência do parasitismo.

STOLTZ & GUZO (1986), trabalhando com larvas de *Malacosoma distria* parasitadas pela vespa da superfamília Ichneumoidea (*Hyposoter fugitivus*), observaram que o sucesso do parasitismo esteve associado a uma mudança no comportamento dos hemócitos, principalmente dos PL os quais tiveram a capacidade de espalhamento afetada. Nestas larvas houve uma supressão da resposta de encapsulação de fungos e esferas de Sephadex, sugerindo para os autores que as alterações ocorridas nos hemócitos durante o parasitismo, diferentemente do nosso trabalho, tornam os mesmos incapazes de uma resposta imune natural frente ao material estranho. Os autores apontam o PDV como o principal responsável pelas alterações nos hemócitos. Constataram ainda o fato interessante de que a hemolinfa de

larvas parasitadas não melanizava *in vitro*, fenômeno que estaria relacionado com a estabilidade dos OE.

Em nosso trabalho observamos que a hemolinfa melanizava *in vitro* (dados apresentados na Ativação do Sistema de proPO) corroborando com a hipótese de que é necessária a ativação da proPO para que ocorra encapsulação.

PREVOST *et al* (1990) trabalhando com *Spodoptera frugiperda* parasitada por *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) observaram que o efeito do parasitismo na inibição da habilidade de espalhamento dos hemócitos era mais pronunciado em larvas susceptíveis do que em larvas resistentes. As larvas susceptíveis falham mais em encapsular o parasitóide, permitindo assim o seu desenvolvimento no hospedeiro. Isto sugere que a indução da mudança comportamental em PL é relevante para o sucesso da evasão à encapsulação pelo parasitóide, nas larvas susceptíveis.

Em nosso trabalho observamos que os tipos celulares envolvidos diretamente na reação de encapsulação foram PL, GR e ES, estando de acordo com os trabalhos iniciais de BOMBONATO (1999) para a mesma espécie de inseto. A literatura especializada relata que os tipos celulares GR e PL são as primeiras células a investirem contra o agente estranho. A reação seria iniciada pelos GR, que entrariam em contato com o invasor, sofrendo lise e liberando fatores de reconhecimento; em seguida, PL seriam atraídos para o local, aderindo-se e espalhando-se ao redor do invasor (RATCLIFFE & VINSON, 1983; LACKIE *et al.*, 1985; TANAKA, 1987b; WIESNER & GÖTZ, 1993, BOMBONATO 1999).

Ao compararmos nossos resultados de MET com os citados na literatura, encontramos concordância no que diz respeito à participação dos hemócitos na encapsulação, caracterizada pela adesão e espalhamento de PL e GR, com emissão de prolongamentos filopodiais por estas células (LACKIE *et al.*, 1985; RATCLIFFE *et al.*, 1985; TANAKA, 1987b; LACKIE, 1988; STRAND & PECH, 1995b, PECH & STRAND, 2000; BECK & STRAND, 2003, 2005). Já com relação à participação de ES no processo de encapsulação, BOMBONATO (1999) sugeriu que a degranulação vista em ES, serviria para a liberação de fatores, que estariam atuando ou contribuindo no processo de “atração” de PL e/ou GR para o local da encapsulação.

Encontramos poucas referências com relação à participação de ES no processo de encapsulação. RATCLIFFE & ROWLEY (1975) observaram que ES de *Pieris brassicae* tinham como função a fagocitose de partículas de látex, eritrócitos de aves e bactérias; fato não observado por FALLEIROS (1995) para a *Diatraea saccharalis*, em que os hemócitos

fagocitários de bactérias e partículas inertes, eram apenas os PL e GR. Já LING & YU (2005), trabalhando com *Manduca sexta*, observaram *in vitro* que cerca de 10% da população de GR e ES continham PO em suas superfícies celulares, e não os OE. Quando injetaram Sephadex os autores observaram, *in vitro*, que a proPO era ativada e o número de hemócitos com PO aumentava significativamente, após 12 h da injeção da partícula estranha. Os autores sugeriram que a ativação de proPO em GR e ES dá início à melanização e posterior formação de cápsula em torno das esferas de Sephadex. Em nosso trabalho realizamos a identificação de hemócitos positivos para PO, e diferentemente dos autores citados, a célula que continha esta enzima foi somente o OE.

De um modo geral, em insetos inoculados com Sephadex (Grupo Se) e em insetos inoculados com Sephadex e parasitados pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se), após 2 dias, a cápsula era constituída principalmente por células alongadas, achatadas e extremamente justapostas, interpretadas como PL. Estes PL se dispunham em número variável de camadas celulares envolvendo o agente abiótico (Sephadex). Nas proximidades da superfície da esfera de Sephadex, os PL exibiram aspecto de degeneração do citoplasma, sugestivo do processo apoptótico, com citoplasma mais denso e com alguns vacúolos de conteúdo heterogêneo. Os PL mostraram gradação de electrón-densidade do citoplasma celular, dependendo de sua localização na cápsula. Uma das hipóteses para explicar o processo apoptótico dos PL mais internos, seria a deficiência nutricional sofrida por esta célula, decorrente da distância entre os PL e o meio de onde provém os nutrientes, a hemolinfa, uma vez que esta cápsula era formada por várias camadas de células extremamente compactadas. LAVINE & BECKAGE (1996) também observaram o processo apoptótico, porém em hemócitos circulantes de *Manduca sexta* parasitada por *Cotesia congregata*. Sugeriram que este processo estava relacionado com a presença de PDV, como já postulado por STRAND & PECH (1995b) em *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitada por *Microplitis demolitor*. Em estudo posterior, PECH & STRAND (2000) observaram que PL de *Pseudoplusia includens* induziram a apoptose em GR. A apoptose foi caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear e surgimento de “bolhas” na superfície celular. Testes de viabilidade indicaram que os GR morriam rapidamente após aderir à porção final da cápsula; o experimento também demonstrou que um meio de cultura contendo PL não induzia apoptose em outros tipos celulares e que um meio de cultura com outros tipos celulares, que não os PL, não induziam apoptose em GR. Observaram também que a taxa de adesão de PL afetava a apoptose de GR. Meios de cultura com PL espalhados, induziam um alto nível de apoptose em

GR. Os autores sugerem que PL espalhados liberam um ou mais fatores que induzem a apoptose de GR, e que esta resposta é importante na fase final de formação da cápsula. Porém, não encontramos sinais de apoptose em GR na porção final da cápsula.

Nem sempre foi possível realizar uma distinção morfológica clara das células próximas ao Sephadex, dificultando a quantificação do número de camadas. Esta dificuldade, presente nos demais grupos, impediu-nos de quantificar, com exatidão, se houve uma reação celular maior ou menor, em função do parasitismo (quando comparamos o Grupo Se e o Grupo P+Se).

Entre PL adjacentes, foi possível observar a existência de desmossomos. A presença de estruturas juncionais do tipo desmossomo, já haviam sido descritas entre PL constituintes de cápsulas, em outros insetos (SCHMIT & RATCLIFFE, 1977; RATCLIFFE & GAGEN, 1977; RATCLIFFE & ROWLEY, 1979b; BOMBONATO, 1999). O seu papel seria o de permitir uma coesão celular intensa, na tentativa de separar o agente invasor das estruturas do inseto, em especial da hemolinfa. Concomitante ao achatamento dos PL e à formação de desmossomos, ocorreu também o aumento da quantidade de microtúbulos e microfilamentos, estruturas estas que provavelmente contribuem para a resistência de tais envoltórios (KURIHARA *et al.*, 1992). Estas modificações foram observadas em PL de *Diatraea saccharalis*, quando da encapsulação de diferentes materiais inertes como fios de algodão, nylon e esferas de Sephadex (BOMBONATO, 1999), enfatizando o papel dos PL na encapsulação.

Após 2 dias, tanto no Grupo Se como no Grupo P+Se, os PL e GR das camadas mais externas à cápsula apresentavam-se arredondados, com poucos e pequenos vacúolos citoplasmáticos. Obtivemos imagens de ES na porção externa da cápsula, exibindo modificações morfológicas importantes: rarefação das esférulas, fusão destas estruturas e liberação dos conteúdos para o meio extracelular. Na porção final da cápsula foram observadas ainda esférulas soltas, em meio a restos de ES. As modificações observadas em PL, GR e ES foram idênticas às dos hemócitos de insetos apenas parasitados pela *Cotesia flavipes*, vistas em nosso trabalho anterior (NUNES, 2001). Os ES mostraram sinais de degranulação com intensidade proporcional ao tempo de inoculação e/ou parasitismo. ES são células pouco estudadas, pois não se apresentam em todas as ordens de insetos, havendo muitas dúvidas sobre sua função na fisiologia destes organismos. As possíveis funções dos ES incluem sua interferência/controla na produção de seda, uma vez que NITTONO (1960) reportou uma correlação positiva entre o número de ES e a produção de seda, em *Bombyx mori*. Além disso, são apontadas para este tipo celular a síntese de algumas macromoléculas

(SCHARRER, 1972, GILLESPIE *et al.*, 1997; LAVINE & STRAND, 2002) e o transporte de substâncias, tais como hormônios (WIGGLESWORTH, 1959; BECKAGE, 2003).

Com relação às reações de defesa dos insetos, os ES foram relacionados com a melanização (JONES, 1959; LING & YU 2005), fagocitose (ZACHARY & HOFFMANN, 1973; RATCLIFFE & ROWLEY 1975; GUPTA, 1991), secreção de algumas proteínas da hemolinfa (GUPTA & SUTHERLAND, 1967; AKAI & SATO, 1979), regulação da coagulação, controle da adesão e migração de células – encapsulação (COOK *et al.*, 1985). BOMBONATO (1999), estudando a encapsulação de material inerte por *Diatraea saccharalis*, observou que há imagens de ES degranulados na superfície da cápsula, sugerindo que este tipo celular desempenha papel indireto na encapsulação, possivelmente liberando fatores quimiotáteis.

Poucos são os estudos quanto ao papel dos ES na secreção de proteínas da hemolinfa (fatores químicos). Em *Leucophaea maderae*, os ES e os GR são os tipos de hemócitos que contém hemaglutininas (AMIRANTE & MAZZALAI, 1978). Porém, deve-se lembrar que a presença de hemaglutinina nos hemócitos não quer dizer, necessariamente, que o hemócito a sintetiza. Parece que os ES e GR simplesmente seqüestram a aglutinina produzida em outros órgãos, como é o caso da hemaglutinina produzida pelo corpo gorduroso do gafanhoto *Melanoplus differentialis* (STILES *et al.*, 1988; BRADLEY *et al.*, 1989).

Em insetos inoculados com Sephadex e parasitados pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se), após 3 dias, havia na porção exterior à cápsula, PL arredondados com seus RER dilatados. Estes PL estavam em íntima associação por meio de interdigitações entre suas membranas plasmáticas. Também GR foram vistos com RER dilatados, indicando atividade secretora em ambas as células. A capacidade de adesão/espalhamento dos PL não estava afetada na vigência do parasitismo pela *Cotesia flavipes*, pois a cápsula em torno da esfera de Sephadex era muito semelhante à cápsula de insetos somente inoculados com Sephadex (Grupo Se). Em outras relações de Lepidoptera com insetos parasitóides, estas habilidades do PL estavam modificadas. Tais alterações de comportamento foram creditadas aos vírus que são inoculados durante a ovoposição (DAVIES *et al.*, 1987).

Em GR o aumento de RER também foi observado por RIBEIRO *et al.* (1996) em *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) durante a encapsulação de Epon e na fagocitose de sacarato de ferro, embora os autores não tenham discutido o significado destes achados.

Em nosso material, no Grupo P+Se, foi possível a visualização de TE com crescimento normal para o período de parasitismo. O papel dos TE na eficiência do parasitismo não está claro. Acredita-se, como dito anteriormente, que teria função trófica (SLUSS, 1968), com base na observação de que esta célula aumenta em tamanho e, por vezes, desaparece da hemolinfa do inseto hospedeiro, na medida em que a larva do parasitóide cresce. Estas observações sugerem que os TE seriam fonte de nutrientes específicos, particularmente nos últimos instares do parasitóide. De fato, foram encontradas células inteiras de TE e seus fragmentos no trato digestivo de muitas larvas de parasitóides (SCHLINGER & HALL, 1960; SLUSS & LEUTENEGGER, 1968; ARAKAWA & KITANO, 1989; STRAND & WONG, 1991). Há indicações, em nível ultra-estrutural, de que os TE teriam ainda a função de síntese e secreção de proteínas e, talvez, de outras substâncias necessárias para a efetivação do parasitismo (KOSCIELSKI et al., 1978; LAWRENCE, 1990).

Outros autores postulam que os TE afetariam o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, contribuindo para o sucesso do parasitismo (JOINER et al., 1973; ZHANG & DAHLMAN, 1989; TANAKA & WAGO, 1990; STRAND & WONG, 1991). KITANO (1969, 1974) e VINSON (1972) demonstraram que as larvas de alguns parasitóides não eram encapsuladas quando TE eram introduzidos na hemocele do inseto hospedeiro, mesmo na ausência de veneno ou PDV. Já em outras relações hospedeiro-parasitóide os TE contribuem, mas não são inteiramente responsáveis pela inibição da encapsulação (TANAKA & WAGO, 1990; LAVINE & BECKAGE, 1995; STRAND & PECH, 1995b). Os TE podem também contribuir na imunossupressão do hospedeiro por inibirem a atividade de PO. KITANO et al. (1990) observaram inibição de atividade de PO em hospedeiros parasitados pela *Cotesia congregata*, fato este relacionado à presença de TE.

Estudos sugerem que os TE podem seguir dois caminhos nas relações inseto hospedeiro-parasito. Existem relações onde o número de TE diminui antes do consumo de tecidos do hospedeiro, durante o desenvolvimento do parasito; isto pode ser explicado pelo fato de que algumas larvas de parasitóides alimentam-se exclusivamente de TE (SCHLINGER & HALL, 1960). Já em outras relações inseto hospedeiro-parasito, os TE não diminuem significativamente o seu número, sendo consumidos somente quando os tecidos do hospedeiro tornam-se escassos (TAWFIK, 1961; KITANO, 1965).

Nossas imagens de TE em *Diatraea saccharalis* parasitada pela *Cotesia flavipes* mostram claramente que esta célula aumenta o seu volume no decorrer do parasitismo, fato anteriormente descrito por CONTE (1994), na mesma relação. O autor relata que 30 h após a liberação dos TE na hemolinfa de *Diatraea saccharalis*, estes eram vistos associados ao corpo

gorduroso do hospedeiro, junto com grandes quantidades de hemócitos, sugerindo que os hemócitos estivessem empenhados numa tentativa de defesa. O fato de que os TE inicialmente apresentem-se como células pequenas, aumentando de volume através da captação de nutrientes da hemolinfa, onde circulam livremente junto com hemócitos do hospedeiro, foi observado por outros autores em diferentes insetos (SALT, 1968; STRAND & WONG, 1991; DAHLMAN & VINSON, 1993, entre outros).

Não se sabe como os TE não são reconhecidos como elemento estranho pelo inseto hospedeiro. STRAND & WONG (1991), estudando a relação do parasitóide *Microplitis demolitor* no hospedeiro *Pseudoplusia includens*, observaram que muitos TE eram encapsulados 24 h após sua injeção na hemocele do hospedeiro; quando, além de TE, era injetado também fluido do cálice ou PDV+veneno, a resposta de encapsulação do hospedeiro para esta célula estranha era totalmente suprimida. Isto permitiu aos autores concluir que PDV e veneno agem conjuntamente na supressão da resposta imune do hospedeiro, inclusive para o reconhecimento do TE.

Na cápsula de insetos inoculados com Sephadex e parasitados pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se), após 6 dias, ocorreram as mesmas modificações sub-celulares nos GR, PL e ES descritas para o período anterior. Observamos ainda TE com morfologia alterada, com grandes gotas lipídicas, quando comparados com TE oriundos de hemolinfa de insetos somente parasitados (Grupo P). Não pudemos precisar qual o significado biológico dessa alteração em TE. Talvez a inoculação de esferas de Sephadex concomitante ao parasitismo, seja o motivo da grande quantidade de gotas lipídicas, já que não encontramos na literatura nada semelhante.

ALLEYNE *et al.* (2001) estudaram o papel dos TE de duas espécies de endoparasitos, a *Cotesia chilonis* e a *Cotesia flavipes*. Estas espécies parasitam duas espécies de lagartas, a *Diatraea grandiosella* e a *Diatraea saccharalis*. O estudo teve como objetivo favorecer diferentes combinações entre hospedeiro-parasitóide para investigar a relação entre hospedeiros susceptíveis e o desenvolvimento dos TE. A *Diatraea saccharalis* foi susceptível às duas espécies de parasitóides; já a *Diatraea grandiosella* foi susceptível (adequada para o desenvolvimento) apenas à *Cotesia chilonis* e frequentemente encapsulou a progênie de *Cotesia flavipes*. A encapsulação das larvas de *Cotesia flavipes* pela *Diatraea grandiosella* teve início assim que os ovos eclodiram liberando os TE na hemolinfa do inseto hospedeiro. Cada ovo de *Cotesia flavipes* liberou cerca de duzentos TE e no caso de parasitismo na *Diatraea grandiosella* houve diminuição dos TE ao longo do tempo de parasitismo. Os

autores sugerem que a diminuição do número de TE de *Cotesia flavipes* favorece a não susceptibilidade da *Diatraea grandiosella*. Os TE têm papel fundamental no sucesso do parasitismo e no caso citado, em que houve uma diminuição do seu número, o parasitismo não se efetivou.

Na cápsula de insetos inoculados com Sephadex (Grupo Se), após 10 dias, obtivemos imagens em que as camadas celulares estavam em menor número em torno das esferas, se comparadas ao grupo analisado após 6 dias de inoculação de Sephadex, sendo que as células que compunham a cápsula estavam mais frouxamente dispostas. Este achado nos leva a sugerir que há diferenças individuais em larvas de *Diatraea saccharalis* quanto a velocidade de reação (encapsulação) contra um agente invasor; também que as partículas inoculadas não são simultaneamente encapsuladas em um mesmo inseto.

Sabe-se que o tempo de formação completa da cápsula difere dependendo do agente invasor, muito embora a estrutura da cápsula seja semelhante (RATCLIFFE & GAGEN, 1977; SCHMIT & RATCLIFFE, 1977, 1978). Pouco se conhece sobre os fatores que determinam o final do processo de encapsulação. SCHMIT & RATCLIFFE (1977) observaram que 72 horas após a inoculação de fragmentos de nervos de *Schistocerca gregaria* em *Galleria mellonella*, havia uma cápsula completa formada, não sendo visível qualquer hemócito em processo de adesão. BOMBONATO (1999) observou hemócitos em processo de adesão após 288 horas (12 dias) da inoculação de Sephadex em *Diatraea saccharalis*, quando já havia uma cápsula completa e extremamente elaborada ao redor das esferas coalescentes.

Diferentemente dos nossos resultados, RICHARDS & EDWARDS (2002) observaram que o parasitismo de larva de *Lacanobia oleracea* pela vespa ectoparasítica *Eulophus pennicornis* suprimiu a encapsulação de esferas de Sephadex. Esferas de Sephadex em larvas parasitadas tinham poucos hemócitos associados a elas, e estes tinham configuração arredondada e muito raramente apresentavam-se achatados. Resultados similares foram detectados em preparações *in vitro*. Houve algumas diferenças entre larvas parasitadas, injetadas com tampão PBS, e larvas inoculadas com esferas de Sephadex, o que levou os autores a sugerir que mudanças nas proteínas do plasma do hospedeiro, mediadas pelo parasitismo, devem contribuir para diferenças na resposta de encapsulação ocorridas nestas larvas.

Não conseguimos estabelecer um padrão na reação de defesa, proporcional ao tempo de parasitismo/inoculação. Porém, observamos que em insetos parasitados pela *Cotesia flavipes*, a reação de encapsulação das esferas de Sephadex (Grupo P+Se) foi muito semelhante à de insetos que foram somente inoculados com o agente abiótico (Grupo Se), salvo as alterações sub-celulares dos hemócitos de larvas parasitadas, já vistas em nosso trabalho anterior (NUNES, 2001).

Pelo presente trabalho, podemos concluir que hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pela *Cotesia flavipes* não perdem a capacidade de reconhecer material inerte. O sistema de defesa (encapsulação) contra o Sephadex permanece ativo mesmo na vigência de parasitismo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da análise dos níveis de ativação do sistema de proPO e de produção de NO, em hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pela vespa *Cotesia flavipes* e/ou inoculadas com agente abiótico, em diferentes tempos de parasitismo/inoculação, permitiram-nos concluir que:

- ❖ A redução significativa dos níveis de ativação do sistema de proPO e de produção de NO, nas larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas/inoculadas (Grupo C), em função do seu desenvolvimento entre 20 e 26 dias, demonstra que a idade larval é um fator relevante na análise da ativação do sistema de proPO e da produção de NO.
- ❖ Ao longo de sua vigência, o parasitismo por *Cotesia flavipes* inibe o sistema de proPO em *Diatraea saccharalis*, sugerindo que este sistema enzimático seja importante para o não reconhecimento do parasitóide; entretanto, a inibição dos níveis de NO só ocorre nas primeiras horas de parasitismo, sugerindo que a escassez inicial desta molécula exerça um papel importante no estabelecimento do parasitóide no inseto hospedeiro.
- ❖ A inoculação de agente abiótico (esferas de Sephadex) eleva os níveis de ativação do sistema de proPO e induz a formação de cápsula melanizada; entretanto, não eleva os níveis de produção de NO. Assim, o sistema de proPO tem participação na reação de defesa contra o agente abiótico, processo em que a molécula de NO não participa.
- ❖ O parasitismo por *Cotesia flavipes* frente à inoculação com agente abiótico (controle = Grupo Se) exerce efeito inibidor na ativação do sistema de proPO e não afeta os níveis de produção de NO; entretanto ocorre a encapsulação deste agente. A presença do Sephadex na hemocele produz a ativação do sistema de proPO (controle = Grupo P+S), ainda que em níveis reduzidos pela ação do parasitóide.
- ❖ A inoculação de agente abiótico em insetos parasitados (controle = Grupo P+S) ativa o sistema de proPO nas primeiras horas, o que acarreta a encapsulação deste agente; entretanto, isto não torna o hospedeiro apto a eliminar o parasitóide, que não é reconhecido e se desenvolve com sucesso.
- ❖ O oenocitóide é o hemócito de larvas de *Diatraea saccharalis* que contém a proPO, sendo impossível determinar, com o reagente de Greiss, o tipo de hemócito que produz o NO.
- ❖ Na observação em MET, a reação de encapsulação das esferas de Sephadex nos insetos parasitados pela *Cotesia flavipes* (Grupo P+Se) foi muito semelhante à de insetos somente inoculados com o agente abiótico (Grupo Se), salvo as alterações sub-celulares nos hemócitos de insetos parasitados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAI, H., SATO, S. Surface and internal ultrastructure of hemocytes of some insects. In: GUPTA, A P. (Ed). **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p. 130-154.
- ALLEYNE, M., WIEDENMANN, R.N. Suitability of lepidopteran stemborers for parasitization by novel-association endoparasitoids. **BioControl**, v. 46, p. 1-23, 2001a.
- ALLEYNE, M., WIEDENMANN, R.N. Encapsulation and total hemocyte numbers in three lepidopteran stemborers parasitized by *Cotesia flavipes* – complex endoparasitoids. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 100, p. 279-293, 2001b.
- ALLEYNE, M., WIEDENMANN, R.N. Effect of time in culture on the suitability of two novel-association pyralid hosts for *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) development. **Biological control**, v. 25, p. 116-122, 2002.
- ALLEYNE, M., WIEDENMANN, R.N., DIAZ, R.R. Quantification and development of teratocytes in novel-association host-parasitoid combinations. **J. of Insects Physiology**, v. 47, p. 1419-1427, 2001.
- AMIRANTE, G.A., MAZZALAI, F.G. Synthesis and localization of hemagglutinins in haemocytes of the cockroach *Leucophaea maderae*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 2, p. 435-440, 1978.
- ARAKAWA, T., KITANO, H. A possible reason for the decrease of the number of teratocytes in the body cavities of *Pieris rapae crucivora* (Lepidoptera: Pieridae) parasitized by *Apanteles glomeratus* (L.). **Appl. Entomol. Zool.**, v. 24, p. 229-231, 1989.
- ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J.**, v.7, p.349-360, 1993.
- ASGARI, S., SCHMIDT, O. Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in host, in host *Pieris rapae*. **J. Insect Physiol.**, v. 40, p. 789-795, 1994.
- ASGARI, S., HELLERS, M., SCHMIDT, O. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. **J. Gen. Virol.**, v.77, p.2653-2662, 1996.
- ASGARI, S., SCHMIDT, O., THEOPOLD, U. A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 3061-3070, 1997.
- ASHIDA, M. Purification and characterization of prophenoloxidase from the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.144, p.749-762, 1971.
- ASHIDA, M. A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of *Bombyx mori*. **Insect Biochem.**, v.11, p.57-65, 1981.
- ASHIDA, M., BREY, P. T. In: Brey, P. T. & Hultmark, D. (eds.). **Molecular mechanisms of immune responses in insects**, Chapman & Hall, New York, p. 135-172, 1997.
- ASHIDA, M., SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase activating system in crayfish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 77B, p. 21-26, 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação- Referências- elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. **Serial sources for BIOSIS proview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- ASHIDA, M., ISHIZAKI, Y., IWAHANA, H. Activation of prophenoloxidase by bacterial cells walls or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Research Commun.**, v. 113, p. 562-568, 1983.
- ASHIDA, M., YAMAZAKI, A., HIROKO, I. Biochemistry of phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. **Molting and metamorphosis**, p. 239-265, 1990.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*: a mini review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 100, no. 5, p. 567-572, ago. 2005.
- AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N. A.; GARCIA, E. S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, vol. 77, no. 3, p. 397-404, set. 2005.
- BACCAN, G.C., FALLEIROS, A.M.F., CAVAZZANA-Jr., M., ZANKEVICIUS, J.V., ATTIAS, M., SOUZA, W., JANKEVICIUS, S.I. *Veneza zonata* (Hemiptera: Coreidae)/trypanosomatid relationship: action of hemolymph *in vitro* and experimental infection. **J. Invert. Pathol.**, v. 77, p. 158-164, 2001.
- BARDUCCO, M.C., GREGÓRIO, E.A., TOLEDO, L. A. Hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) no período larval, estudo morfológico e quantitativo. **Rev. Bras. Biol.**, v. 48, p. 925-932, 1988.
- BAUER, E., TRENCZEK, T., DORN, S. Instar-dependent hemocyte changes in *Pieris brassicae* after parasitization by *Cotesia glomerata*. **Entomol. Experim. Appl.**, v.88, p. 49-58, 1998.
- BEAULATON, J. MONPEYSSIN, M. Ultrastructure cytochimie des hémocytes d'*Antheraea pernyi* Guer (Lepidoptera: Attacidae). II Cellules à shérules et oenocytoides. **Biol. Cell**, v. 28, p. 13-18, 1977.
- BECK, M., STRAND, M.R. RNA interference silences *Microplitis demolitor* bracovirus genes and implicates glc1.8 in disruption of adhesion in infected host cells. **Virology.**, v. 30, p. 52-55, 2003.
- BECK, M., STRAND, M.R. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect High Five and S2 cells. **J. Virol.**, v. 79, p. 1861-1870, 2005.
- BECK, M., THEOPOLD, U., SCHMIDT, O. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p. 1275-1283, 2000.
- BECKAGE, N.E. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. **Parasitology**, v. 116, p. 57-64, 1998.
- BECKAGE, N.E. Immunology. In: Resh. VH, Carde RT, editors. Encyclopedia of insects. San Diego: Academic Press. p. 55-560, 2003.
- 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*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 26, p. 165-195, 1994.
- BENNETT, F.D. A comparison of the reproductive strategies and certain other characteristics of *Apanteles spp.* and the tachinid parasites of *Diatraea saccharalis* (Fabr.). In:

- CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, v. 16, p. 523-527. São Paulo, 1977.
- BERESKY, M.A., HALL, D.W. The influence of phenylthiourea on encapsulation, melanization, and survival in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* parasitized by the nematode *Neoplectana carpocapsae*. **J. Invert. Pathol.**, v.29, p.74-80, 1977.
- BITKOWSKA E., DZBENSK, T.H., SZADZIEWSHS, M., WEGNER, Z. Inhibition of xenograft rejection reaction in the bug *Triatoma infestans*. **J. Invert. Pathol.**, v. 40, p. 186-189, 1982.
- BOMBONATO, M.T.S. **Análise morfológica e quantitativa dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) frente ao parasitóide *Metagonistylum minense* (Diptera: Tachnidae)**. Botucatu, 1994. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BOMBONATO, M.T.S. **Os hemócitos e a reação de encapsulação em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae): estudo morfológico e quantitativo**. Botucatu, 1999. 90p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BOMBONATO, M.T.S., GREGÓRIO, E.A. Estudo morfológico e quantitativo de hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.12, p.867-879, 1995.
- BOTELHO, P.S.M., MACEDO, N., MENDES, A.C., SILVEIRA NETO, S. Aspects of the population dynamics of *Apanteles flavipes* (Cameron) and support of its host *Diatraea saccharalis* (Fabr.). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 17., 1980, Manila. **Proceedings**. Manila, 1980. p. 1736-1745.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of -protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 93-100, 1976.
- BRADLEY, R.S., STUART, G.S., STILES, B., HAPNER, K.D. Grasshopper haemagglutinin: immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic property. **J. Insect Physiol.**, v. 35, p. 353-361, 1989.
- BREDT D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., LOWENSTEIN, C., REED, R.R., SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, p. 714-718, 1991.
- BREHÉLIN, M., HOFFMANN, J.A., MATZ, G., PORTE, A. Encapsulation of implated foreing bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha*. **Cell Tissue Res.**, v. 160, p. 283-289, 1975.
- BREHÉLIN, M., DRIF, L., BAUD, L., BOEMARE, N. Insect hemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. **Insect Biochem.**, v. 19, p. 301-307, 1989.
- BREWER, F.D., VINSON, S.B. Chemicals affecting the encapsulation of foreign material in an insect. **J. Invert. Pathol.**, v.18, p. 287-289, 1971.
- BRÍVIO, M., PAGANI, M., STEFANO, R. Immune supression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle. **Experimental Parasitology**, v. 101, p. 149-156, 2002.

- BROOKMAN, J.L., RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. Optimization of a monolayer phagocytosis assay and its application for studying the role of the prophenoloxidase system in the wax moth, *Galleria mellonella*. **J. Insect Physiol.**, v. 34, p. 337-45, 1988.
- BROOKMAN, J.L., RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. **Insect Biochem.**, v.19, p. 47-57, 1989a.
- BROOKMAN, J.L., RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. Studies on nodule formation in locusts following injection of microbial products. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 53, p. 315-323, 1989b.
- BUTT, T.M., WRAIGHT, S.P., GALAINI-WRAIGHT, S., HUMBER, R.A., ROBERTS, D.W., SOPER, R.S. Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorales) by the potato leaf hopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). **J. Invert. Pathol.**, v. 52, p. 49-56, 1988.
- CAI, J., YE, G.Y, HU, C. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. **J. of Insect Physiology**, v. 50, p. 315-322, 2004.
- CARTON, Y. La réaction d'immunité cellulaire (capsula hémocytaire) chez un insecte, en fonction de la région du corps. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 52, p. 59-62, 1977.
- CHARALAMBIDIS N.D., FOUKAS, L.C., ZERVAS, C.G., MARMARAS, V.J. Hemocyte surface phenoloxidase (PO) and response to lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitis capitata*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 26, p. 867-874, 1996.
- CHIPPENDALE, G.M. The southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*: Case history of an invading insect. **Research Bulletin**, 52p, 1979.
- CHUN, J., RIEHLE, M., PASKEWITZ, S.M. Effect of mosquito age and reproductive status on melanization of Sephadex beads in *Plasmodium*- refractory and- susceptible strains of *Anopheles gambiae*. **J. Invert. Pathol.**, v. 66, p. 11-17, 1995.
- COHEN, S.M. Imaginal disc development. IN: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), *Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 747-841, 1993.
- COLASANTI, M., VENTURINI, G. Nitric oxide in invertebrates. **Mol. Neurobiol.**, v. 17 (supl.1-3), p. 157-174, 1998.
- CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitadas e não parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro, 1994. 160p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- CONTE, H., CRUZ-LANDIN, C. Ultra-estrutura do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lep.: Pyralidae) parasitadas por *Apanteles flavipes* (Hym.: Braconidae). In: Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1993a. Caxambú. **Anais**, v. 14, p. 243-4.
- CONTE, H., CRUZ-LANDIN, C. Histoquímica do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lep.: Pyralidae) parasitadas por *Apanteles flavipes* (Hym.: Braconidae). In: Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 1993b, Curitiba. **Anais**, v.7, p.109.
- COOK, D.I., STOLTZ, D.B., PAULEY, C. Purification and preliminary characterization of

- insect spherulocytes. **Insect Biochem.**, v. 15, p. 419-426, 1985.
- COOMBE, D.R., VEY, P.L., JENKIN, C.R. Self and nonself recognition in invertebrates. **Q. Rev. Biol.**, v. 59, p. 231-255, 1984.
- CROSSLEY, A.C.S. The cytophysiology of insect blood. **Adv. Insect Physiol.**, v.11, p.117-222, 1975.
- CROSSLEY, A.C.S. Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage, and secretion in hemocytes. In: GUPTA, A. P. (Ed). **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979, p. 423-473.
- DAHLMAN, D.H. Teratocytes and host/parasitoid interactions. **Biol. Control**, v. 1, p.118-126, 1991.
- DAHLMAN, D.H., VINSON, S.B. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics. In: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 145-165.
- DAVIES, D.H., VINSON, S.B. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigricaps* of encapsulation *in vitro* by hemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. **J. Insect Physiol.**, v. 32, p. 1003-1010, 1986.
- DAVIES, D.H., VINSON, S.B. Interference with function of plasmatocytes of *Heliothis virescens in vivo* by calyx fluid of the parasitoid *Campoletis sonorensis*. **Cell Tissue Res.**, v. 251, p. 467-475, 1988.
- DAVIES, D.H., STRAND, M.R., VINSON, S.B. Changes in differential haemocyte count and *in vitro* behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. **J. Insect Physiol.**, v. 33, p. 143-153, 1987.
- DECLEIR, W., AERTS, F., VERCAUTEREN, R. The localisation of polyphenoloxidase in hemocytes. **Int. Congr. Entomol. Proc.**, v. 3, p. 176-179, 1960.
- DRAPIER J.C., WEIIZESBIN, J., HIBBS, J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. **European J. Immuno.**, v. 18, p. 1587-1592, 1988.
- DRIF, L., BREHÉLIN, M. The circulating hemocytes of *Culex pipiens* and *Aedes aegypti*: cytology, histochemistry, hemograms and functions. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 7, p. 687-690, 1983.
- DULARY, B., LACKIE, A.M. Haemocytic encapsulation and the prophenoloxidase-activation pathway in the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. **Insect Biochem.**, v. 15, p. 827-834, 1985.
- DUNN. P.E. Biochemical aspects of insect immunology. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 31, p. 321-339, 1986.
- EDSON, K.M., VINSON, S.B., STOLTZ, D.B., SUMMERS, M.D. Virus in a parasitoid wasps: suppression of the cellular immune response in the parasitoids host. **Science**, v. 211, p. 582-583, 1981.
- EDSON, K.M., BARLIN, M.R., VINSON, S.B. Venom apparatus of braconid wasps: comparative ultrastructure of reservoirs and gland filaments. **Toxicon**, v. 20, p. 533-562, 1982.
- EHLERS, D., ZOSEL, B., MOHRIG, W., KAUSCHKE, E., EHLERS, M. Comparasion of *in vivo* and *in vitro* phagocytosis in *Galleria mellonella*. **Parasitol. Res.**, v. 78, p. 354-359, 1992.

- ELPHICK, M.R., GREEN, I.C., O'SHEA, M. Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. **Brain Res.**, v. 619 (supl.1-2), p. 344-346, 1993.
- ELPHICK, M.R., RAYNE, R.C., RIVEROS-MORENO, V., MONCADA, S., O'SHEA, M. Nitric oxide synthesis in locust olfactory interneurons. **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 821-829, 1995.
- FALLEIROS, A.M.F. **Células sangüíneas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Estudo citoquímico ultra-estrutural e à microscopia eletrônica de varredura.** Botucatu: 1995. 154p. Tese (Doutorado em Anatomia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- FALLEIROS, A.M.F., GREGÓRIO, E.A. Hemócitos Fagocitários em Larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v. 12, p. 751-758, 1995.
- FARALDO, A.C. Mecanismos de defesa celular e humoral de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) contra agentes estranhos. Botucatu, 2004. 102p. Tese (Doutorado em Zoologia) - 2004 Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- FARALDO, A.C., NUNES, A.S., FACCIOLI, L.H., DEL BEL, E.A., LELLO, E. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. Nitric Oxide: **Biol. Chem.**, 13(4):240-246. 2005.
- FARALDO, A.C., GREGÓRIO, E.A., LELLO, E. Morphological and quantitative aspects of nodule formation in hemolymph of the blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). **J. Invert. Pathol.** (no prelo). 2006.
- FEDDERSON, I., SANDER, K., SCHMIDT, O. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinates protect and insect parasitoid from encapsulation. **Experientia**, v. 42, p. 1278-1281, 1976.
- FEDER, D, SALLES, JM, GARCIA, ES *et al.* Haemolymph and Fat Body Metallo-protease Associated with *Enterobacter cloacae* Infection in the Bloodsucking Insect, *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Nov./Dez. 1998, vol .93, no. 6, p. 823-826. ISSN 0074-0276.
- FENG, H.M., WALKER, D.H. Interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha exert their antirickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxide. **American J. Physiol.**, v. 143, p. 1016-1023, 1993.
- FIELDING R., BOSE, P., AMEIS, K.M., VACCA-GALLOWAY, L.L. A novel behavioral method to detect motoneuron disease in wobbler. **Brain Research**, v. 813, p. 334-342, 1998.
- FISHER, C.W., BRADY, U.E. Activation, properties and collection on haemolymph phenoloxidase of the american cockroach *Periplaneta americana*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 75, p. 111-114, 1983.
- FLEMING, J.G.W. Polydnviruses: Mutualists and pathogenic. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 401-425, 1992.
- FLEMING, J.G.W., SUMMERS, M.D. Polydnvirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 9770-9774, 1991.
- FLEMING, J.G.W., BLISSARD, G.W., SUMMERS, M.D., VINSON, S.B. Expression of *Campoletis sonorensis* virus in the parasitized host, *Heliothis virescens*. **J. Virol.**, v. 48, p. 74-78, 1983.

- FLORA FILHO, R. e ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, vol. 46, no. 3, p. 265-271, jul./set. 2000.
- FOLEY, E., O'FARREL, P.H. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. **Genes Devel.**, v. 17 (supl. 1), p. 115-125, 2003.
- FORTON, K.F., CHRISTENSEN, B.M., SUTHERLAND, D.R. Ultrastructure of the melanization response of *Aedes trivittatus* against inoculated *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Parasitol.**, v. 71, p. 331-341, 1985.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ALVES, S.B., VENDRAMIM, J.D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. p. 358-61.
- GARCIA, E.S., MACHADO, E.M.M., AZAMBUJA, P. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. **J. Insect Physiol.**, v. 50, p. 157-165, 2004a.
- GARCIA, E.S., MACHADO, E.M.M., AZAMBUJA, P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.**, v. 107, p. 31-38, 2004b.
- GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., HIENY, S., JAMES, S.L., SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European J. Immunol.**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.
- GILLESPIE, J.P., KANOST, M.R., TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 42, p. 611-643, 1997.
- GILLOT, C. **Entomology**. New York and London: Plenum Press, 1995. 798p.
- GOMES, S.A.O., FEDER, D., THOMAS, N.E., GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *in vivo* and *in vitro* experiments. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 73, p. 289-293, 1999.
- GOMES, S.A.O., FEDER, D., GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **J. Insect Physiol.**, v. 49, p. 829-837, 2003.
- GONÇALVES, S.M. **Estudo dos elementos figurados da hemolinfa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) nos períodos de pré-pupa, pupa e adulto**. Botucatu, 1983, 67p. Dissertação (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- GÖTZ, P. Encapsulation in arthropods. In: BREHÉLIN, M. (Ed.). **Immunity in invertebrates: cells, molecules and defense reactions**. Heidelberg. p. 153-170, 1986a.
- GÖTZ, P. Mechanisms of encapsulation in Diptera hosts. In: LACKIE, A.M. (Ed.). **Immune mechanisms in invertebrate vectors**. Oxford: Oxford University Press, p. 1-19, 1986b.
- GÖTZ, P., BOMAN, H.G. Insect immunity. In: KERTUT, G.A., GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 454-485.

- GÖTZ, P., VEY, A. Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): defense reaction of *Chironomus* larvae against fungi. **Parasitology**, v. 68, p. 1-13, 1974.
- GÖTZ, P., VEY, A. Humoral encapsulation in insects. In: GUPTA, A.P. (Ed.). **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. New York: Wiley - Intersciences, 1987. p. 407-430.
- GÖTZ, P., ROETTGEN, J., LINGG, W. Encapsulemente humoral en tant réaction de défense chez les Diptères. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 52, p. 95-97, 1977.
- GREEN, L.C., LUZURIAGA, K.R., WAGNER, D.A., RAND, W., ISTFAN, N., YOUNG, V.R., TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 7764-7768, 1981.
- GREGÓRIO, E. A, RATCLIFFE N.A. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 181-186, 1991a.
- GREGÓRIO E.A., RATCLIFFE, N.A. The prophenoloxidase system and *in vitro* interaction of *Trypanosoma rangeli* with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* haemolymph. **Parasite Immunol.**, v. 13, p. 551-564, 1991b.
- GRIMSTONE, A.V., ROTHERAM, S., SALT, G. An electron microscope study of capsule formation by insect blood cells. **J. Cell. Sci.**, v. 2, p. 281-292, 1967.
- GUPTA, A.P. Cellular elements in the hemolymph. In: KERKUT, G.A., GILBERT, L.I. (eds). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 402-444.
- GUPTA, A.P. Arthropod immunocytes. Identification, structure, functions and analogies to the functions of vertebrates B- and T-lymphocytes. In: GUPTA, A.P. (Ed.). **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. New York: Wiley Interscience Publication, 1987. p. 3-59.
- GUPTA, A.P. Cellular Immunity. In: GUPTA, A.P.(Ed.). **Immunology of insects and other arthropods**. New York: CRC Press Series, 1991, p 61-99.
- GUPTA, A.P., SUTHERLAND, D.J. Phase contrast and histochemical studies of spherule cells in cockroaches. **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, v. 60, p. 557-565, 1967.
- GUPTA, S., WANG, Y., JIANG, H. Purification and characterization of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-1, an enzyme involved in insect immune responses. **Protein express. and purification**, v. 39, p. 261-268, 2004.
- GUZO, D., STOLTZ, D.B. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. **J. Insect Physiol.**, v. 33, p. 19-31, 1987.
- HARWOOD, S.H., GROSOVSKY, A.J., COWLES, E.A., DAVIS, J.W., BECKAGE, N.E. An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product. **Virology**, v. 205, p. 381-392, 1994.
- HAYNES, W. G., HAND, M.F., DOCKRELL, M.E. EADINGTON, D.W., LEE, M.R., HUSSEN, Z., BENJAMIN, N., WEBB, D.J. Physiology role of nitric oxide in regulation of renal function in humans. **American J. Phys.**, v. 272, p. 364-371, 1997.
- HECKER, H., SCHWARZENBACH, M., RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduvvid bug, *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Res.**,

- v. 76, p. 311-318, 1990.
- HENSLEY, S.D., HAMMOND Jr., A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **J. Entomol.**, v. 61, p. 1742-1743, 1968.
- HIBBS J.B., TAINTOR R.R., VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and amino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.
- HOFFMANN, J. A., PORTE, A., JOLY, P. On the localization of phenoloxidase activity in coagulation of *Locusta migratoria* (L.)(Orthoptera). **C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.**, v. 270, p. 629-631, 1970.
- HOFFMANN, J.A., ZACHARY, D., HOFFMANN, N., BREHÉLIN, M. Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. In: GUPTA, A.P. (Ed.). **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. New York: Cambridge University Press, 1979. p.29-66.
- HOROV, D.W., DUNN, P.E. Phagocytosis and nodule formation by haemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Invert. Pathol.**, v. 41, p. 203-213, 1983.
- HUANG, P.L., LO, E.H. Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. **Prog. Brain Res.**, v. 118, p. 13-25, 1998.
- HUNG, S.Y., BOUCIAS, D.G. Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae. **J. Invert. Pathol.**, v. 67, p. 35-40, 1996.
- HUXHAM, I.M., LACKIE, A.M. A simple visual method for assaying the activation and inhibition of phenoloxidase production by insect haemocytes *in vitro*. **J. Immunol. Methods**, v. 94, p. 271-277, 1986.
- HUXHAM, I.M., LACKIE, A.M. Behaviour *in vitro* of separated fractions of haemocytes of the locust *Schistocerca gregaria*. **Cell Tissue Res.**, v. 251, p. 677-684, 1988.
- IWAMA, R., ASHIDA, M. Biosynthesis of the prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochem.**, v. 16, p. 547-555, 1986.
- JIANG, H., WANG, Y., KOROCHKINA, S.E., BENES, H., KANOST, M.R. Molecular cloning of cDNAs for two prophenoloxidases subunits from the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, p. 693-699, 1997.
- JIANG, H., WANG, Y., KANOST, M.R. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca Sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1220-1225, 1998.
- JOHANSSON, M.W., SODERHALL, K. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. **J. Comp. Physiol.**, v. 156, p. 175-181, 1985.
- JOINER, R.L., VINSON, S.B., BENSKIN, J.B. Teratocytes as source of juvenile hormone activity in a parasitoid-host relationship. **Nature New Biol.**, v. 246, p. 120-121, 1973.
- JONES, J.C. A phase contrast study of the blood cells in *Prodenia* larvae (Lepidoptera). **Q. J. Microsc. Sci.**, v. 100, p. 17-23, 1959.
- JONES, J.C. Hemocytogenesis in insects. In: GORDON, A.S. (ed.). **Regulation of hematopoiesis**. New York: Appleton, 1970. p. 7-65.
- JONES, J.C., COUDRON, T. Venoms of parasitic Hymenoptera as investigatory tools. In: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 267-304.

- KAWASE, S. Tyrosinase in the silkworm during the pupation period. **J. Insect Physiol.**, v. 5, p. 335-340, 1960.
- KERWIN J.F., LANCASTER, J.R., FELDMAN, P.L. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 4343 1995.
- KITANO, H. Studies on the origin of giant cells in the body fluid of *Pieris rapae crucivora* attacked by *Apanteles glomeratus*. Determination of their origin and speculation on their biological significance. **Zool. Mag.**, v. 74, p. 192-197, 1965.
- KITANO, H. Defensive ability of *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera: Braconidae) to the hemocytic reaction to *Pieris rapae crucivora* Boisduval (Lepidoptera: Pyralidae). **Appl. Entomol. Zool.**, v. 4, p. 51-55, 1969.
- KITANO, H. Effects of the parasitization of a braconid *Apanteles*, on the blood of its host *Pieris*. **J. Insect Physiol.**, v. 20, p. 315-327, 1974.
- KITANO, H. Effect of the venom of the gregarious parasitoid *Apanteles glomeratus* on its hemocytes encapsulation by the host, *Pieris*. **J. Invert. Pathol.**, v. 40, p. 61-67, 1982.
- KITANO, H. The role of *Apanteles glomeratus* venom in defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. **J. Insect Physiol.**, v. 32, p. 369-375, 1986.
- KITANO, H., WAGO, H., ARAKAWA, T. Possible role of teratocytes of the gregarious parasitoid, *Cotesia glomerata* in the suppression of phenoloxidase activity in the larval host, *Pieris rapae crucivora*. **Arch. Insect Physiol.**, v. 13, p. 177-185, 1990.
- KOSCIELSKY, B., KOSCIELSKA, M.K., SZROEDER, J. Ultrastructure of the polygerm of *Ageniaspis fuscicollis*. **Zoomorphol.**, v. 89, p. 279-288, 1978.
- KRAMER, K.J., HOPKINS, P.L. Tyrosine metabolism for insect cuticle tanning. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 6, p. 279-301, 1987.
- KURIHARA, Y., SHIMAZU, T., WAGO, H. Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) I. Phase microscopic study. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 27, p. 225-235, 1992.
- KUZIN, B., ROBERTS, I., PEUNOVA, N., ENIKOLOPOV, G. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. **Cell**, v. 87, p. 639-649, 1996.
- LACKIE, A.M. Immune recognition in insects. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 5, p. 191-204, 1981.
- LACKIE, A.M. Haemocyte behaviour. **Adv. Insect Physiol.**, v. 21, p. 85-177, 1988.
- LACKIE, A.M., TAKLE, G., TETLEY, L. Haemocytic encapsulation in the locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) and in the cockroach *Periplaneta americana* (Dictyoptera). **Cell Tissue Res.**, v. 240, p. 343-351, 1985.
- LANDUREAU, J.C., SZÖLLÖSI, A. Démonstration par la méthode de culture *in vitro*, du rôle des hémocytes dans la spermatogenèse d'un insecte. **C.R. Acad. Sci. (Paris)**, v. 278, p. 3359-3362, 1974.
- LAVINE, M.D., BECKAGE, N.E. Polydnviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction. **Parasitology Today.**, v.11, p. 368-378, 1995.
- LAVINE, M.D., BECKAGE, N.E. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. **J. Insect Physiol.**, v. 42, p. 41-51, 1996.

- LAVINE, M.D., STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1295-1309, 2002.
- LAW, J.H., RIBEIRO, J.M.C., WELLS, M.A. Biochemical insights derived from insect diversity. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 87-111, 1992.
- LAWRENCE, P.O. Serosal cells of *Biosteres longicaudalatus* (Hymenoptera: Braconidae): Ultrastructure and release of polypeptides. **Arch. Insect Biochem.**, v. 13, p. 199-216, 1990.
- LEE, M.J., ANSTEE, J.H. Phenoloxidase and its zymogen from the hemolymph of larvae of the lepidopteran *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 110, p. 379-384, 1995.
- LEONARD, C.M., SÖDERHÄLL, K., RATCLIFFE, N.A. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. **J. Insect Physiol.**, v. 31, p. 789-799, 1985a.
- LEONARD, C.M., SÖDERHÄLL, K., RATCLIFFE, N.A. Studies of prophenoloxidase and protease of *Blaberus craniifer* haemocytes. **Insect Biochem.**, v. 15, p. 803-810, 1985b.
- LI, X., WEBB, B.A. Apparent functional role for a cysteine-rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response. **J. Virol.**, v. 68, p. 7482-7489, 1994.
- LIMA FILHO, M. **Quantificação de *Apanteles flavipes* (Cameron, 1891) em cana-de-açúcar para controle de *Diatraea spp.*** Piracicaba, 1989. 107p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Escola Superior Agronomia Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.
- LING, E., YU, X.Q. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 1356-1366, 2005.
- LOWENSTEIN C., ALLEN, G., WALKER A., ROSE, N., SYNDER, S., HERSKOWITZ A. Nitric Oxide inhibits viral replication in myocarditis. **Circulation**, v. 88, IG-IH (Abstr). 1993.
- LUCKHART, S., ROSENBERG, R. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. **Gene**, v. 232, p. 25-34, 1999.
- LUCKHART, S., WEBB, B.A. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 20, p. 1-21, 1996.
- LUCKHART, S., VODOVOTZ, Y., CUI, L., ROSENBERG, R. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 5700-5705, 1998.
- MANDATO, C.A., DIEHL-JONES, W.L., MOORE, S.J., DOWNER, R.G.H. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. **J. Insect Physiol.**, v. 43, p. 1-8, 1997.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. **Trends Biochem. Sci.**, v. 14, p. 488-492, 1989.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, (fasc. 17), p. 12231-12234, 1993.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-930, 1994.

- MAYER B. Regulation of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase. **Cell. Biochem. Function.**, v. 12, p. 167-177, 1994.
- MELLO, C.B., GARCIA, E.S., RATCLIFFE, N.A., AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 65, p. 261-268, 1995.
- MELLO, C.B., AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S., RATCLIFFE, N.A. Differential *in vitro* and *in vivo* behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.**, v. 82, p. 112-268, 1996.
- MENDES, A.C. Métodos de criação de parasitos da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 6, 1980, Campinas. Campinas: UNICAMP, 1980. p. 103-132.
- MENEZES, H. Estudo sobre a participação dos hemócitos de *Bombyx mori* (L.) nos mecanismos de defesa contra agentes estranhos. São Paulo, 1984. 80p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 1984
- METCALF, C.L., FLINT, P.W. **Insectos destructivos y insectos utiles, sus costumbres y su control.** México: Continental, 584p. 1966.
- MOILANEN, E., VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, v. 27, p. 359,367, 1995.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rew.**, v. 43 (supl.2), p. 109-142, 1991.
- MONPEYSSIN, M., BEAULATON, J. Données sur la localisation ultrastrucutrale d'une activité phénoloxidasique dans les hémocytes circulants d'*Antheraea pernyi* au'dernier âge larvaire. **J. Insect Physiol.**, v. 23, p. 939-943, 1977.
- MULLEN, L.M., GOLDSWORTHY, G.J. Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin. **J. Insect Physiol.**, v. 52, p. 389-398, 2006.
- MULLER, U., HILDEBRANDT, H. The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of *Apis mellifera* is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli. **Eur. J. Neurosci.**, v. 7, p. 2240-2248, 1995.
- MULLINS, D.E. Chemistry and physiology of the hemolymph. In: KERKUT, G.A., GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.** Oxford: Pergamon Press, 1985, v. 3, p. 355-400.
- NAOUM, P. Sleep enhances plasticity in the developing visual cortex. **Neuron.**, v. 30, p. 275-287, 2001.
- NAPPI, J. Parasite encapsulation in insects. In: MARAMOROSCH, K., SHOPE, R.E.S. (Eds.). **Invertebrate Immunity.** New York: Academic Press, 1975. p. 293-326.
- NAPPI, A.J., CHRISTENSEN, B.M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: application to insect innate immunity. **Insect Biochem. and Molecular Biol.**, v. 35, p. 44-459, 2005.
- NAPPI, J., STREAMS, F. Haemocytic reactions of *Drosophila melanogaster* to the parasites *Pseudocoila mellipes* and *P. bochei*. **J. Insect Physiol.**, v. 15, p. 551-566, 1969.
- NAPPI, J., VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. **Pigment Cell Res.**, v. 6, p. 117-126, 1993.

- NAPPI, A.J., VASS, E., FREY, F., CARTON, Y. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. **Nitric Oxide: Biol. Chem.**, v. 4 (supl. 4), p. 423-430, 2000.
- NATHAN, C., XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13725- 13728, 1994.
- NEVES D.P. *Plasmodium* – Malária. In: Atheneu (Ed). **Parasitologia Humana**, São Paulo, 11 ° edição, p. 143-162, 2005.
- NICHOLSON S. *et al.* Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 2293-2302, 1996.
- NIGHORN, A., GIBSON, N.J., RIVERS, D.M., HILDEBRAND, J.C., MORTON, D.B. The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 7244-7255, 1998.
- NITTONO, Y. Studies on the blood cells in the silkworm *Bombyx mori*. L. **Bull. Seric. Exp. Stn.**, v. 16, p. 171-266, 1960.
- NUNES, C.C.C. **Caracterização citoquímica e ultra-estrutural dos hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitada pela vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Botucatu, 2001. 105p. Tese (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- O'SHEA, M., COLBERT, R., WILLIAMS, L., DUNN, S. Nitric oxide compartments in the mushroom bodies of the locust brain. **Neuroreport.**, v. 9, p. 333-336, 1998.
- OLAND, L.A., TOLBERT, L.P. Multiple factors shape development of olfactory glomeruli: insights from an insect model system. **J. Neurobiol.**, v. 30 (1), p. 92-109, 1996.
- OSMAN, S.L. Die wirkung der sekrete der weiblichen genitalanhangsdrüsen von *Pimpla turionellae* auf die hämocyten und die einkapselungsreaktion von wirtspuppen. **Z. Parasitenkd.**, v. 57, p. 89-100, 1978.
- OSWALD, I.P., ELTOUM, I., WYNN, T.A., SCWARTZ, B., CASPAR, P., PAULIN D., SHER, A., JAMES, S.L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 999-1003, 1994.
- PASKEWITZ, S.M., RIEHLE, M. Response of *Plasmodium* refractory and susceptible strains of *Anopheles gambiae* to inoculated Sephadex beads. **Develop. & Comp. Immunol.**, v. 18, p. 369-375, 1994.
- PASKEWITZ, S.M., RIEHLE, M. A factor preventing melanization of Sephadex CM-25 beads in *Plasmodium*- susceptible and refractory *Anopheles gambiae*. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 34-41, 1998.
- PECH, L.L., STRAND, M.R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **J. Cell Sci.**, v. 8, p. 2053-2060, 1996.
- PECH, L.L., STRAND, M.R. Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1565-1563, 2000.
- PENDLAND, J.C., HEATH, M.A., BOUCIAS, D.G. Function of a galactose-binding lectin from *Spodoptera exigua* larval haemolymph: opsonization of blastospores from entomogenous hyphomycetes. **J. Insect Physiol.**, v. 34, p. 533-540, 1988.
- PERSSON, M.A., VEY, A., SÖDERHÄLL, K. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by

- separated blood cells from crayfish (*Astacus leptodactylus*). **Cell Tissue Res.**, v. 247, p. 409-415, 1987.
- POINAR Jr, G.O., LEUTENEGGER, R., Ultrastructural investigation of the melanization process in *Culex pipiens* (Culicidae) in response to a nematode. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 36, p. 148-158, 1971.
- POINAR Jr, G.O., LEUTENEGGER, R., GÖTZ, P. Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica* (Coleoptera) in response to a parasitic nematoda (Mermithidae). **J. Ultrastruct. Res.**, v. 25, p. 293-306, 1968.
- POINAR Jr., G.O., HESS, R.T., PETERSEN, J.I. Immune response of mosquitoes against *Romanomermis culicivorax* (Mermithida: Nematoda). **J. Nematol.**, v. 11, p. 110-116, 1979.
- PRESTON, J.W., TAYLOR, R.L. Observations on the phenoloxidase system in the haemolymph of the cockroach *Leucophaea maderae*. **J. Insect Physiol.**, v. 16, p. 1729-1744, 1970.
- PREVOST, G., DAVIES, D.H., VINSON, S.B. Evasion of encapsulation by parasitoid correlated with the extent of the host hemocyte pathology. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 55, p. 1-10, 1990.
- QUAGIO-GRASSIOTO, I. **Espermatogênese em *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuteribridae). Aspectos ultraestruturais.** Botucatu, 1993, 135p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- RATCLIFFE, N. A. Cellular defense reaction of insects. **Fortschr. Zool.**, v. 27, p. 223-244, 1982.
- RATCLIFFE, N.A. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. In: LACKIE, A.M. (Ed.). **Immune mechanism in invertebrate vectors.** Oxford: Clarendon Press, 1986, p. 21-43.
- RATCLIFFE, N.A. Cellular defense responses of insects: unresolved problems. In: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects.** San Diego: Academic Press, 1993. p. 267-304.
- RATCLIFFE, N.A., GAGEN, S.J. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 28, p. 373-382, 1976.
- RATCLIFFE, N.A., GAGEN, S.J. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. **Tissue Cell**, v. 9, p. 3-85, 1977.
- RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. Cellular defence reactions of insect haemocytes *in vitro*. Phagocytosis in a new suspension culture system. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 26, p. 225-33, 1975.
- RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. A comparative synopsis of the structure and functions of the blood cells of insect and other invertebrates. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 3, 1979a. p. 186-243.
- RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. Role of hemocytes in defense against biological agents. In: GUPTA, A.P. (Ed.). **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques.** Cambridge: Cambridge University Press, 1979b. p. 331-414.

- RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. Insect responses to parasites and other pathogens. In: JOULSBY, E.J.L (Ed). **Immune responses in parasitic infections; immunology, immunopathology and immunoprophylaxes, protozoa, arthropods and invertebrates**. C.R.C. Press, Florida, 1987. p. 123-254.
- RATCLIFFE, N.A., WALTERS, J.B. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 29, p. 407-415, 1983.
- RATCLIFFE, N.A., LEONARD, C.M., ROWLEY, A.F. Prophenoloxidase activation: nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. **Science**, v. 266, p. 557-559, 1984.
- RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F., FITZGERALD, S.W., RHODES, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. Rev. Cytol.**, v. 97, p. 183-349, 1985.
- RATCLIFFE, N.A., BROOKMAN, J.L., ROWLEY, A.F. Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 5, p. 33-39, 1991.
- RATNER, S., VINSON, S.B. Encapsulation reactions *in vitro* by haemocytes of *Heliothis virescens*. **J. Insect Physiol.**, v. 29, p. 855-863, 1983.
- RAVINDRANATH, M.H., DENNELL, R, COOPER, E.L. Crab lectins: receptor specificity and biomedical applications. IN: COHEN, E. (Ed.). **Recognition proteins, receptors and probes: invertebrates**. New York: Academic Press, 1984, p. 83-95.
- REGULSKI, M., TULLY, T. Molecular and biochemical characterization of dNOS – a *Drosophila* Ca²⁺ calmodulin-dependent nitric-oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 9072-9076, 1995.
- RIBEIRO, J.M.C., NUSSENZVEIG, R.H. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. **FEBS**, v. 330 (supl.2), p. 165-168, 1993.
- RIBEIRO, J.M., HAZZARD, J.M., NUSSENZVEIG, R.H., CHAMPAGNE, D.E., WALKER, F.A. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. **Science**, v. 260, p. 539-541, 1993.
- RIBEIRO, C., SIMÕES, N., BREHÉLIN, M. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. *in vivo* and *in vitro* studies. **J. Insect Physiol.**, v. 42, p. 815-822, 1996.
- RICHARDS, E.H., EDWARDS, J.P. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, suppresses haemocyte-mediated recognition of non-self and phagocytosis. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p. 1-11, 1999.
- RICHARDS, E.H., EDWARDS, J.P. Parasitism of *Lanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis* disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo*. **J. Insect Physiol.**, v. 9, p. 747-769, 2002.
- RICHARDS, E.H., PARKINSON, N.M. Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. **J. Invert. Phatol.**, v.76, p. 33-42, 2000.
- RISCADO, G.M. **Eficiência comparada de *Apanteles flavipes* no controle de *Diatraea* spp. no Rio de Janeiro**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1982. 77p.

- RIZKI, T. M., RIZKI, R. M. Surface changes on hemocytes during encapsulation in *Drosophila melanogaster*. In: Gupta, A. P. (Ed). **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. New York: Wiley Interscience, 1987. p. 157-190.
- RIZKI, T.M., RIZKI, R.M. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 8388-8392, 1990.
- ROHLOFF, L.H., WEISNER, A., GÖTZ, P. A fluorescence assay demonstrating stimulation of phagocytosis by haemolymph molecules of *Galleria mellonella*. **J. Insect Physiol.**, v. 40, p. 1045-1049, 1994.
- ROWLEY, A. F., RATCLIFFE, N. A. **Invertebrate Blood Cells: Insects**. New York: Academic Press, 1981. v. 2, p. 421-488.
- ROWLEY, A.F., BROOKMAN, J.L., RATCLIFFE, N.A. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in bacterial activity. **J. Invert. Pathol.**, v. 56, p. 31-38, 1990.
- SALT, G. The defence reactions of insects to metazoan parasites. **Parasitology**, v.5 3, p. 527-642, 1963.
- SALT, G. The resistance of insect parasitoids to the defense reactions of their hosts. **Biol. Rev.**, v. 43, p. 200-232, 1968.
- SALT, G. The cellular defense reactions of insects. London: Cambridge University Press, 1970. 118p.
- SAUL S., SUGUMARAN, M. Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 5, p. 1-11, 1987.
- SAUL S., SUGUMARAN, M. Prophenoloxidase activation in the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae. **Archs. Insect Biochem. Physiol.**, v. 7, p. 91-103, 1988.
- SAUL, S.J., BIN, L., SUGUMARAN, M. The majority of prophenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the haemocytes. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 11, p. 479-486, 1987.
- SAXENA, B.P. Comparative study of haemocytes of three lepidopterans by light and scanning electron microscopy. **Acta Entomol. Bohemoslov.**, v. 89, p. 323-329, 1992.
- SCHARRER, B. Hemocytes within prothoracic glands of insects. **Amer. Zool.**, v. 5, p. 235-236, 1965.
- SCHARRER, B. Cytophysiological features of haemocytes in cockroaches. **Z. Zellforsch.**, v. 129, p. 301-319, 1972.
- SCHACHTNER, J., KLAASSEN, L., TRUMAN, J.W. Metamorphic control of cyclic guanosine monophosphate expression in the nervous system of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **J. Comp. Neurobiol.**, v. 396, p. 238-252, 1998.
- SCHLINGER, E. I., HALL, J.C. The biology, behavior, and morphology of *Praon palitans*, an internal parasite of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata* (Hymenoptera: Braconidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 53, p. 144-160, 1960.
- SCHMIDT, H.H.H.W. **Cell**, v. 78, p. 919-925, 1994.
- SCHMIT, A.R., RATCLIFFE, N.A. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 23, p. 175-184, 1977.

- SCHMIT, A.R., RATCLIFFE, N.A. The encapsulation of araldite implants and recognition of foreignness in *Clitumnus extradentatus*. **J. Insect Physiol.**, v. 24, p. 511-521, 1978.
- SCHMIT, A.R., ROWLEY, A., RATCLIFFE, N.A. The role of *Galleria mellonella* haemocytes in melanin formation. **J. Invert. Pathol.**, v. 29, p. 232-234, 1977.
- SECCO, V.N.D. **Ultra-Estrutura do desenvolvimento do ovário de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuteribridae)**. Botucatu, 1990. 71p.. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- SHELBY, K.S., WEBB, B.A. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. **J. Insect Physiol.**, v. 45, p. 507-514, 1999.
- SHELBY, K.S., ADEYEYE, O.A., OKOT-KOTBER, B.M., WEBB, B.A. Parasitism-linked block of host plasma melanization. **J. Invertebr Pathol.**, v. 75, p. 218-225, 2000.
- SILVA, C.C.A. Activation of prophenoloxidase and removal of *Bacillus subtilis* from the hemolymph of *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 487-491, 2002.
- SILVA C.C.A., DUNPHY, G.B., RAU, M.E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev. Comp. Immu.**, v. 24, p. 367-379, 2000a.
- SILVA C.C.A., DUNPHY, G.B., RAU, M.E. Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) with the antimicrobial defenses of the house cricket, *Acheta domesticus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v.76, p. 285-292, 2000b.
- SILVA, A.G.A., GONÇALVES, C.R., GALVÃO, D.M., GONÇALVES, A.J.L., GOMES, J., SILVA, M.N., SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, v. 1, 1968. 622p.
- SLUSS, R.R. Behavioral and anatomical responses of the convergent lady beetle to parasitism by *Perilitus coccinellae* (Schronk) (Hymenoptera: Braconidae). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 10, p. 9-27, 1968.
- SLUSS, R.R., LEUTENEGGER, R. The fine structure of the trophic cells of *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). **J. Ultrastruct. Res.**, v. 25, p. 441-451, 1968.
- SMITH, V.J., SODERHALL, K. Beta-1, 3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. **Biol. Bull.** (Woods Hole), v. 164, p. 299-314, 1983a.
- SMITH, V.J., SODERHALL, K. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. **Cell Tissue Res.**, v. 233, p. 295-303, 1983b.
- SNYDER, S.H., BREDET, D.S. Biological role of nitric oxide. **Science Am.**, v. 266, p. 68-77, 1992.
- SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanisms of arthropods. A review. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 6, p. 601-611, 1982.
- SÖDERHÄLL, K., AJAXON, R. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces ssp.* And extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. **J. Invert. Pathol.**, v. 39, p. 109-131, 1982.
- SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p. 23-28, 1998.

- SÖDERHÄLL, K., HÄLL, L. Lipopolysaccharide induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocytes lysate. **Biochem. Biophys.**, v. 797, p. 99-104, 1984.
- SÖDERHÄLL, K., SMITH, V.J. Separation of the haemocyte population of *Carcinos maenae* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 7, p. 229-239, 1983.
- SÖDERHÄLL, K., SMITH, V.J. Prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. In: GUPTA, A.P. (Ed.). **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. New York: Wiley Interscience, p. 251-287, 1986.
- SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L., JOHANSSON, M. W. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: Söderhall, K., Iwanaga, S., Vasat, G. (eds.). **New Directions in Invertebrate Immunology**. SOS, Fair Haven, N.J., 1996. p. 229-253.
- STETTLER, P., TRENCZEK, T., WYLER, T., PFISTER-WILHELM, R., LANZREIN, B. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. **J. Insect Physiol.**, v. 44, p. 817-831, 1998.
- STILES, B., BRADLEY, R.S., STUART, G.S., HAPNER, K.D. Site of synthesis of haemolymph agglutinin of *Melanoplus differentialis* (Acrididae: Orthoptera). **J. Insect Physiol.**, v. 34, p. 1077-1083, 1988.
- STOLTZ, D.B., COOK, D.I. Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid Hymenoptera. **Experientia**, v. 39, p. 1022-1024, 1983.
- STOLTZ, D.B., GUZO, D. Apparent haemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma distria* larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 32, p. 377-388, 1986.
- STOLTZ, D.B., GUZO, D., BELLAND, E.R., LUCAROTTI, C.J., MACKINNON, E.A. Venom promotes uncoating *in vitro* of DNA from a braconid polydnavirus. **J. Gen. Virol.**, v. 69, p. 903-907, 1988.
- STRAND, M.R. The physiological interactions of parasitoids with their hosts and their influence on reproductive strategies. In: WAAGE, J., GREATHEAD, D. (Ed.). **Insects parasitoids**. London: Academic Press, 1986. p. 97-136.
- STRAND, M.R. *Microplitis demolitor* polydnavirus infects and expresses in specific morphotypes of *Pseudoplusia includens* haemocytes. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 3007-3020, 1994.
- STRAND, M.R., JOHNSON, J.A. Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*. **J. Insect Physiol.**, v. 42, p. 21-31, 1996.
- STRAND, M.R., NODA, T. Alterations in the haemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. **J. Insect Physiol.**, v. 37, p. 839-850, 1991.
- STRAND, M.R., PECH, L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 40, p. 31-56, 1995a.
- STRAND, M.R., PECH, L.L. *Microplitis demolitor* polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*. **J. Gen. Virol.**, v. 76, p.283-291, 1995b.
- STRAND, M.R., WONG, E.A. The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. **J. Insect Physiol.**, v. 37, p. 503-515, 1991.

- STRAND, M.R., JOHNSON, J.A., NODA, T., DOVER, B.A. Development and partial characterization of monoclonal antibodies to venom of the parasitoid *Microplitis demolitor*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.26, p.123-136, 1994.
- STUEHR, D.J., MARLETTA M.A. Mamallian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7738-7742, 1985.
- STUEHR, D.J., CHO, H.J., KWON, N.S., WEISE, W.F., NATHAN, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: FAD-and FMN- containing flavoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7773-7777, 1991.
- SUGUMARAN, M. Quinone methode scleratization: A revised mechanism for B-Scleratization of insect cuticle. **Biorg. Chem.**, v. 15, p. 194-211, 1987.
- SUGUMARAN, M., SAUL, S.J., RAMESH, N. Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenoloxidase in insect hemolymph. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 132, p. 1124-1129, 1985.
- TAKEDA, N. Brain hormone carrier haemocytes in the moth *Monema flavescens*. **J. Insect Physiol.**, v. 23, p. 1245-1254, 1977.
- TANAKA, T. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanteles kariyai*, Watanabe, on the cellular defense reaction of the host, *Pseudaletia separata*, Walker. **J. Insect Physiol.**, v. 33, p. 413-420, 1987a.
- TANAKA, T. Morphological changes in haemocytes of the host, *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 11, p. 57-67, 1987b.
- TANAKA, T., WAGO, H. Ultrastructural and functional maturation of teratocytes of *Apanteles kariyai*. **Archs. Insect Biochem.**, v. 13, p. 187-197, 1990.
- TAWFIK, M.F.S. Teratocytes in the larva of *Prodenia litura* parasitized by *Microplitis demolitor*. **J. Insect Pathol.**, v. 3, p. 221-224, 1961.
- TENG B., MURTHY, K.S., KUEMMERLE, J.F., GRIDER, J.R., SASE, K., MICHEL, T., MAKHLOUF G.M. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. G342-351, 1998.
- TERÀN, F.O., PRECETTI, A.A.C.M., DERNEIKA, O. Broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. In: COOPERSUCAR. **Pragas da cana-de-açúcar**. São Paulo, 1983. p. 4-15 (Reunião Técnica Agrônômica).
- TOLEDO, L.A., GREGORIO, E.A. Aspectos ultra-estruturais e quantitativos de hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) nos períodos larval, de pré-pupa e de pupa. In: COLÓQUIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, 12, 1989, São Paulo. **Resumos..**, São Paulo, 1983a. v. 1, p. 193-194.
- TOLEDO, L.A., GREGÓRIO, E.A. Ultraestrutura dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, , 1983, São Paulo. **Resumos.**, São Paulo, 1983b. p. 47-48.
- TRUMAN, J.W. The eclosion hormone sytem of insects. **Prog. Brain Res.**, v. 92, p. 361-374, 1992.
- TRUMAN, J.W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects. **Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 87-101, 1996.

- TSUKAMOTO, T., ISHIGWO, M., FUNATSU, M. Isolation of latent phenoloxidase from prepupae of the housefly *Musca domestica*. **Insect Biochem.**, v. 16, p. 573-581, 1986.
- TYSON, C.J., JENKIN, C.R. Phagocytosis of bacteria *in vitro* by haemocytes from the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). **Ajebak**, v. 52, p. 341-348, 1974.
- VEY, A., GÖTZ, P. Antifungal cellular defense mechanisms in insects. In: GUPTA, A.P. (Ed.). **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. New York: Wiley Interscience, 1986, p. 89-115.
- VEY, A., QUIOT, J.M. Effect *in vitro* de substances toxiques produites par le champignon *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok, sur la reaction hemocyttaire du coleoptere *Oryetes rhinoceros*. **C.R. Seances Acad. Sci. III**, v. 280D, p. 931-934, 1975.
- VINSON, S.B. Factors involved in successful attack on *Heliothis virescens* by the parasitoid *cardiochiles nigriceps*. **J. Invert. Pathol.**, v. 20, p. 118-123, 1972.
- VINSON, S.B. *Micropletis croceipes*, inhibitions of the *Heliothis zea* defence reactions to *Cardiochiles nigriceps*. **Exp. Parasitol.**, v. 41, p. 112-117, 1977.
- VINSON, S.B. Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. In: PATHAK, J.P.N. (Ed.). **Insect immunity**. Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1986. p. 171-187.
- VINSON, S.B., LEWIS, W.J. Teratocytes: growth and numbers in the hemocele of *Heliothis virescens* attacked by *Microplitis croceipes*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 22, p. 351-355, 1973.
- VINSON, S.B., SCOTT J.R. Parasitoid eggshell changes in a suitable and unsuitable host. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 47, p. 1-15, 1974.
- WAGO, H., TANAKA, T. Synergistic effects of calyx fluid and venom of *Apanteles kariyai*, Watanabe, on the granular cells of *Pseudaletia separata*, Walker. **Zool. Sci.**, v. 6, p. 691-696, 1989.
- WANG, Y., JIANG, H., KANOST, M.R. Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 29, p. 1075-1086, 1999.
- WATKINS, M. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. **J. Invert. Pathol.**, v. 17, p. 59-66, 1971.
- WEBB, B.A., LUCKART, S. Factores mediating short-and long-term immune supression in a parasitized insect. **J. Insect Physiol.**, v. 42, p. 33-40, 1996.
- WEEKS, J.C., JACOBS, G.A., PIERCE, J.T., SANDSTROM, D.J., STREICHERT, L.C., TRIMMER, B.A., WIEL, D.E., WOOD, E.R. Neural mechanisms of behavioral plasticity: metamorphosis and learning in *Manduca sexta*. **Brain Behav. Evol.**, v. 50, p. 69-80, 1997.
- WEISKE, J., WIESNER, A. Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. **Nitric oxide: Biol. Chem.**, v. 3 (supl.2), p. 123-131, 1999.
- WHIFIELD, J.B. Parasitoids polydnviruses and endosymbiosis. **Parasitol. Today**, v. 6, p. 381-384, 1990.

- WHITCOMB, R.F., SHAPIRO, M., GRANADOS, R.P. Insect defense mechanism against microorganism and parasitoids. **Physiol. Insecta**, v. 5, p. 447-536, 1974.
- WHITTEN, M.M.A., MELLO, C.B., GOMES, S.A.O., NIGAM, Y., AZAMBUJA, E.S., GARCIA, E.S., RATCLIFFE, N.A. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. **Exp. Parasitol.**, v. 98, p. 44-57, 2001.
- WIECZOREK, H., GIBER, G., HARVEY, W.R., HUSS, M., MERZENDORFER, H., ZEISKE, W. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺-V-ATPase. **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 127-135, 2000.
- WIEDENMANN, R.N., SMITH JR, J.W. Parasitization of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) by *Cotesia chilonis* and *C. flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Environ. Entomol.**, v. 24, p. 950-961, 1995.
- WIESNER, A., GÖTZ, P. Silica beads induce cellular and humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae and in isolated plasmatocytes obtained by a newly adapted nylon wool separation method. **J. Insect Physiol.**, v. 39, p. 865-876, 1993.
- WIGGLESWORTH, V.B. Insect blood cells. **Ann. Ver. Entomol.**, v. 4, p. 1-16, 1959.
- WIGGLESWORTH, V.B. Hemocytes and growth in insects. In: GUPTA, A.P. (org.). **Insect hemocytes**. New York: Academic Press, 1979, p. 303-318.
- YOSHIDA, H., ASHIDA, M. Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochem.**, v. 16, p. 539-545, 1986.
- YUDA, M., HIRAI, K., MATSUMURA, H., ANDO, K., CHINZEI, Y. cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 242, p. 807-812, 1996.
- ZACHARY, D., HOFFMANN, J.A. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala*. **Z. Zellforsch.**, v. 141, p. 55-57, 1973.
- ZELEDON, R., DEMONGE, E. Natural immunity of the bug *Triatoma infestans* to the protozoan *Trypanosoma rangeli*. **J. Invert. Pathol.**, v. 8, p. 420-424, 1966.
- ZHANG, D., DAHLMAN, D.L. *Microplitis croceipes* teratocyte cause development arrest of *Heliothis virescens* larvae. **Archs. Insect Biochem. Physiol.**, v. 12, p. 51-61, 1989.
- ZLOTKIN, E., GUREVITZ, M., SHULOV A. The toxic effects of phenoloxidase from the haemolymph of tenebrionid beetles. **J. Insect Physiol.**, v. 19, p. 1057-1065, 1973.

RESUMO

NUNES, C.C.C. Efeito do parasitismo de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) pela vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) nas reações de defesa frente à inoculação de agente abiótico: sistema de profenoloxidase, produção de óxido nítrico e reação de encapsulação. Botucatu, 2006. 154p. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO: No presente trabalho, analisamos os níveis de ativação de proPO e produção de NO em hemolinfa de larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas e parasitadas pela vespa *Cotesia flavipes* e/ou inoculadas com agente abiótico, em diferentes tempos de parasitismo/inoculação, e em função da idade larval; propusemo-nos ainda a observar a ultra-estrutura da cápsula formada ao redor do agente abiótico (esfera de Sephadex), na vigência do parasitismo. Larvas de *D. saccharalis* com 20 dias de desenvolvimento (5^o instar) foram naturalmente parasitadas pela *C. flavipes*. Após diferentes tempos de parasitismo e/ou inoculação com agente abiótico (2 h, 6 h, 3 e 6 dias), a hemolinfa da broca da cana-de-açúcar foi coletada e congelada a -20°C para posterior análise dos níveis de ativação *in vitro* do sistema de proPO e da produção de NO. Para observar a reação de encapsulação do agente abiótico, as esferas de Sephadex foram recuperadas e preparadas para análise ultra-estrutural, por meio de técnica convencional. Existiu redução significativa dos níveis de ativação do sistema de proPO e da produção de NO nas larvas de *D. saccharalis* não parasitadas/inoculadas, em função do desenvolvimento larval, entre 20 e 26 dias. O parasitismo por *C. flavipes* inibiu a ativação do sistema de proPO em todos os tempos experimentais; quanto aos níveis de produção de NO, houve inibição apenas nos tempos de parasitismo inicial (2 h) e recente (6 h). A inoculação de Sephadex em larvas não parasitadas aumentou os níveis de ativação do sistema de proPO em todos os tempos experimentais, mas não aumentou os níveis de produção de NO destas larvas. O parasitismo de larvas de *D. saccharalis* pela *C. flavipes* concomitante à inoculação de esferas de Sephadex, inibiu significativamente a ativação do sistema de proPO, mas não afetou os níveis de produção de NO, em todos os períodos analisados. A larva de *D. saccharalis* parasitada pela *C. flavipes* conseguiu identificar e encapsular as esferas de Sephadex, da mesma forma que os insetos não parasitados, visto ultra-estruturalmente. Assim, nossos resultados indicam que embora houvesse diminuição da ativação do sistema de proPO devido ao parasitismo, o Sephadex foi reconhecido como elemento não-próprio e encapsulado; já o parasitóide não foi reconhecido e se desenvolveu com sucesso na hemocele de seu hospedeiro. O hemócito responsável pela síntese de proPO em *D. saccharalis* é o oenocitóide; não conseguimos detectar o tipo de hemócito responsável pela produção de NO.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis*, *Cotesia flavipes*, Profenoloxidase, Óxido Nítrico, Encapsulação, Parasitismo, Ultra-estrutura.

ABSTRACT

NUNES, C.C.C. The effect of the parasitism of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae by the wasp *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) in the defense reactions against abiotic agent: profenoloxidase system, nitric oxide production and encapsulation reaction. Botucatu, 2006. 154p. Thesis (PhD in Zoology) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Abstract: This work aimed to analyze the proPO activation and the NO production in the hemolymph of *Diatraea saccharalis* larvae non parasitized and parasitized by the wasp *Cotesia flavipes* and/or inoculated with abiotic agent (Sephadex beads), along the parasitism/inoculation, and related with larval age; the ultrastructural observation of the capsule formed around the abiotic agent during the parasitism was also performed. *D. saccharalis* larvae with 20 days of development (5^o larval instar) were parasitized by *C. flavipes*. After different times of parasitism and/or inoculation of the abiotic agent (2 h, 6 h, 3 e 6 days), the sugarcane borer hemolymph was collected and freezed at -20°C for posterior analyses of the *in vitro* proPO system activation and NO production. To observe the encapsulation response to the abiotic agent implant, the Sephadex beads were recovered and conventionally prepared for ultrastructural analyses. There was a significant reduction in both the activation of the proPO system and in the NO production of *D. saccharalis* non parasitized/inoculated larvae related with the larval development, from 20 to 26 days old. The parasitism by *C. flavipes* inhibit the proPO system activation in all the experimental time; the level of NO production was inhibited only at the initial (2 h) e recent (6 h) parasitism. The inoculation of Sephadex beads in non parasitized larvae increased the level of the proPO system activation, in all the experimental times, but it didn't increase the NO production of these larvae. The parasitism of *D. saccharalis* larvae by *C. flavipes* concomitant with the inoculation of Sephadex beads significantly inhibited the activation of the proPO system, but it didn't affect the production levels of NO, in all the analyzed times. The *D. saccharalis* larvae parasitized by *C. flavipes* were able to identify and encapsulate the Sephadex beads as the non parasitized insects, as evaluated by the ultrastructural analyses. Thereby, our results indicate that although there was an inhibition of the proPO system due to the parasitism, the Sephadex beads were recognized as non-self and encapsulated; already the parasitoid was not recognized and successfully developed into the insect host hemocele. The hemocyte responsible for the proPO syntheses in *D. saccharalis* was the oenocitoid; it was impossible to detect the hemocyte type responsible for the NO production.

Key words: *Diatraea saccharalis*, *Cotesia flavipes*, Profenoloxidase, Nitric oxide, Encapsulation, Parasitism, Ultrastructure.