

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA DE UMA
SERPINA (*CfSerpina*) DO ENDOPARASITOIDE *Cotesia
flavipes* Cameron, 1891 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)
SOBRE O SEU HOSPEDEIRO *Diatraea saccharalis*
(Fabricius, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Juliana Barroso Silva
Engenheira Agrônoma

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA DE UMA
SERPINA (*Cf*Serpina) DO ENDOPARASITOIDE *Cotesia
flavipes* Cameron, 1891 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)
SOBRE O SEU HOSPEDEIRO *Diatraea saccharalis*
(Fabricius, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Me. Juliana Barroso Silva

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2018

Silva, Juliana Barroso

S586a Avaliação biológica e biotecnológica de uma serpina (*C/Serpina*) do endoparasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) sobre o seu hospedeiro *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)/ Juliana Barroso Silva. -- Jaboticabal, 2018
iv, 54 f. :il.; 29 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Guilherme Duarte Rossi

Banca examinadora: Ana Maria Guidelli Thuler, Fernando Luis Cõnsoli, Manoel Victor Franco Lemos, Odair Aparecido Fernandes

Bibliografia

1. Regulação hospedeira. 2. Teratócitos. 3. Cenobionte. 4. Função biológica. 5. Biotecnologia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 596,79:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

E-mail: juliana.barrososilva@yahoo.com.br

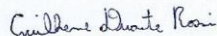
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA DE UMA SERPINA (*Cf* Serpina) Do ENDOPARASITOIDE *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) SOBRE O SEU HOSPEDEIRO *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

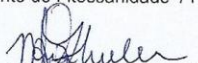
AUTORA: JULIANA BARROSO SILVA

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

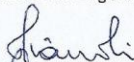
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



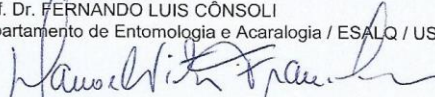
Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANA MARIA GUIDELLI THULER
Departamento de Engenharia Ambiental / UNIUBE - Uberaba/MG



Prof. Dr. FERNANDO LUIS CÔNSOLI
Departamento de Entomologia e Acarologia / ESALQ / USP - Piracicaba/SP



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juliana Barroso Silva - nascida em 21 de maio de 1989, na cidade de Aracajú - SE, filha de Ivanete Barroso Silva e de José Julio Braga da Silva. Ingressou no curso de Agronomia em 2007 pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) na cidade de Belém-PA. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq) na área de Entomologia e monitora da disciplina de Entomologia Geral. Obteve seu título de Engenheira Agrônoma em junho de 2011. Em agosto de 2011 iniciou o mestrado pelo programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) na cidade de Recife, onde desenvolveu a dissertação na linha de pesquisa em Ecologia Química sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Braz Torres e co-orientação da Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes. Parte do seu trabalho de dissertação foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA/CENARGEN), localizada na cidade de Brasília-DF. Obteve seu título de mestra em dezembro de 2013. Em março de 2014, iniciou o curso de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), na cidade de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi e atuou na linha de pesquisa Biotecnologia e Resistência de Plantas à Insetos, Ácaros e Nematoides.

E-mail: juliana.barrososilva@yahoo.com.br

“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

Dedico

A minha mãe Ivanete Barroso Silva por ser um grande exemplo de mulher honesta e batalhadora e por não medir esforços na minha educação.

Homenageio

A todos os educadores que trabalham duro, se esforçam diariamente e fazem o possível e o impossível para melhorar a educação no Brasil.

Ofereço

Aos meus pais, minhas irmãs, professores e amigos, por todo o incentivo e ajuda que me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, pelas bênçãos e por iluminar meus caminhos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da FCAV/UNESP pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi pela orientação, pela paciência, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo e confiança durante toda a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pelo incentivo e confiança durante meu trabalho no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA).

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cònsoli pelas contribuições para o estudo da *CfSerpina*.

Ao conselho do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) e ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e ao Prof. Dr. Raphael de Campos Castilho pelas oportunidades e apoio.

À Bióloga Josy Aparecida dos Santos Costa da "Biofábrica de Cotesia" da Usina São Martinho (Pradópolis, SP) pelo fornecimento dos insetos e disponibilidade.

À técnica Eliane Cunha pela amizade, ajuda e apoio durante as atividades no Laboratório de Genética e Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (LGBBA).

À Profa. Dra. Suely Vilela e aos técnicos Adélia Cintra, Santé Carone e Thiago Silva do laboratório de Toxinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP) pelo auxílio na purificação da CfSerpina.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) pelos ensinamentos e pela amizade.

Às funcionárias Ligia Dias Tostes Fiorezzi e Cibele da Silva Anton pelo auxílio.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Bioquímica de Insetos, Thiago Trevisoli, Diandro Barilli, Ciro Pedro, Ana Letícia, Nicole de Paula e Victor Vieira, pelo companheirismo, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do LGBBA, Maria Laura, Camila Figueiredo, Paula Borges, Mariane Câmara, Marina Serra, Ariadne Sanches e Nestor Dário, pela ajuda, pela amizade e pelos momentos de descontração.

A todos os colegas da pós-graduação pela companhia, amizade e apoio durante o curso, em especial ao Samuel Andrade, Sofia Jiménez, Jeruska Brenha, Daniela Viana, Ezequias Correia, Danilo da Matta, Kelly Gonçalves e Jandir Cruz.

Aos meus queridos amigos de moradia, Naira Alencar, Dayse Veloso, Ana Dulce, Tamiris Kempner, Laudecir Lemos, Ediane Alves, Aline Bettiol, João Bettiol e Paloma Teodósio pela grande amizade, convivência, confiança e apoio durante toda essa caminhada.

Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Insetos parasitoides	3
2.2. Interações parasitoide-hospedeiro.....	4
2.3. Interação <i>Cotesia flavipes</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	5
2.4. Regulação hospedeira	6
2.5. Sistema imunológico dos insetos hospedeiros.....	9
2.6. Inibidores de serino proteases no sistema imunológico dos insetos	11
2.7. Inibidores de serino proteases no sistema digestório dos insetos	13
2.8. Exploração biotecnológica de moléculas derivadas de parasitoides	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Clonagem do transcrito CfSerpina no vetor de expressão pET24 α	17
3.2. Produção, purificação, detecção por Western Blot e quantificação da CfSerpina solúvel.....	17
3.3. Ensaio de avaliação da inibição da melanização na hemolinfa de <i>Diatraea saccharalis</i> na presença de CfSerpina.....	19
3.4. Ensaio de atividade de fenoloxidase na hemolinfa de <i>Diatraea saccharalis</i> após injeção de CfSerpina e laminarina.....	20
3.5. Ensaio de desenvolvimento larval de <i>Diatraea saccharalis</i> utilizando CfSerpina.....	21
3.6. Ensaio de inibição de tripsinas intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i> utilizando CfSerpina.....	22
3.7. Ensaio de inibição de proteases gerais intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i> utilizando CfSerpina.....	23
3.8. Estabilidade de CfSerpina no conteúdo intestinal de <i>Diatraea saccharalis</i>	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Produção, purificação e quantificação da CfSerpina produzida em <i>E. coli</i> BL21	25
4.2. Avaliação da inibição da melanização na hemolinfa de <i>Diatraea saccharalis</i> utilizando CfSerpina solúvel.....	27
4.3. Avaliação da atividade da fenoloxidase na hemolinfa de <i>Diatraea saccharalis</i>	27
4.4. Avaliação do desenvolvimento larval de <i>Diatraea saccharalis</i> após ingestão de CfSerpina	28

4.5. Avaliação da inibição da atividade de tripsina e proteases gerais intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i> pela CfSerpina	29
4.6. Avaliação da estabilidade da CfSerpina no conteúdo intestinal de <i>Diatraea saccharalis</i>	29
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICE.....	53

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA DE UMA SERPINA (*CfSerpina*)
DO ENDOPARASITODE *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) SOBRE O SEU HOSPEDEIRO *Diatraea saccharalis* (Fabricius,
1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

RESUMO – Os parasitoides são insetos que utilizam outros insetos para se desenvolverem e completarem seu ciclo imaturo de desenvolvimento. Os parasitoides podem manipular a fisiologia e afetar o crescimento e desenvolvimento de seus hospedeiros, o que frequentemente resulta na morte de suas vítimas. Durante o parasitismo de *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) sobre *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), teratócitos são liberados após eclosão da larva do parasitoide no interior do hospedeiro e esses teratócitos produzem um transcrito que codifica uma serpina (*CfSerpina*). As serpinas são inibidores de serino proteases muitas vezes associadas à regulação da cascata de ativação de profenoloxidasas em fenoloxidasas, enzimas relacionadas com a melanização de corpos estranhos no hospedeiro. O presente estudo foi conduzido para investigar a função biológica da *CfSerpina* e avaliar seu potencial biotecnológico como agente de controle de *D. saccharalis* após ingestão. A *CfSerpina* foi produzida em sistema heterólogo em células de *E. coli* BL 21, purificada em coluna de níquel-sepharose e quantificada pelo método de Bradford para posterior detecção por *Western blot*. A proteína foi produzida em quantidades suficientes para a realização da avaliação biológica e biotecnológica. Após os ensaios, verificou-se que a *CfSerpina* não pode ser associada à inibição da ativação da cascata de profenoloxidasas na hemolinfa de *D. saccharalis*. Além disso, a exploração biotecnológica da *CfSerpina* como uma proteína tóxica para *D. saccharalis* não causou mortalidade ou alterações no ganho de peso larval de *D. saccharalis* após ingestão e não resultou em inibição *in vitro* da atividade de proteases digestivas de *D. saccharalis*. Investigações sobre outras possibilidades de regulação da fisiologia de *D. saccharalis* por *CfSerpina* precisam ser conduzidos para definição do papel dessa proteína no processo de regulação hospedeira.

Palavras-chave: Regulação hospedeira, teratócitos, cenobionte, função biológica, biotecnologia.

**BIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL EVALUATION OF A SERPIN (*CfSerp*)
DERIVED FROM THE ENDOPARASITOID *Cotesia flavipes* Cameron, 1891
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ON ITS HOST *Diatraea saccharalis* (Fabricius,
1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

ABSTRACT - Parasitoids are insects which use other insects to develop and complete their immature cycle. Parasitoids can manipulate the physiology and affect the growth and development of their hosts, which often results in the death of their victims. During parasitism of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) by the parasitoid *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) teratocytes are released after the eclosion of parasitoid larvae inside the host and these teratocytes produce a transcript that encodes a putative serpin (*CfSerp*). Serpins are serine proteases inhibitors often associated with the regulation of the activation of prophenoloxidas into phenoloxidas, enzymes responsible for melanization of foreign bodies in the host. The study was conducted to investigate the biological function of *CfSerp*, as well to evaluate its biotechnological potential to disrupt the development of *D. saccharalis* larvae after ingestion. *CfSerp* was produced in a heterologous system using *E. coli* BL 21 cells, purified on a nickel-sepharose column, quantified by the Bradford method, and detected by Western blot. Purified *CfSerp* was produced in sufficient amount for biological and biotechnological evaluation. *CfSerp* could not be associated with the inhibition of activation of prophenoloxidas cascade in the host insect hemolymph. In addition, biotechnological exploitation of *CfSerp* as a toxic protein after ingestion did not result in the disruption of the development of *D. saccharalis* larvae and no *in vitro* inhibition of digestive proteases of *D. saccharalis* by *CfSerp* was observed. Investigations to unravel the role of *CfSerp* on the regulation of *D. saccharalis* physiology still need to be conducted.

Keywords: Host regulation, teratocytes, koinobiont, biological function, biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

Os danos ocasionados pela ocorrência de insetos pragas têm sido um dos maiores problemas que comprometem a produção e o aumento da produtividade em áreas agrícolas de todo o mundo (OERKE; DEHNE, 2004; OERKE, 2006; OLIVEIRA et al., 2014). Para o manejo de insetos pragas, o controle químico tem sido uma das principais formas (AL SALEH, 1994; FANTKE, 2012).

No entanto, o uso de inseticidas químicos tem causado uma série de problemas devido sua toxicidade para o homem, o meio ambiente e os organismos benéficos como polinizadores e inimigos naturais como os predadores e parasitoides (PIMENTEL, 1992; EIJIGU; MEKONNEN, 2005; CRESSELL, 2011; TORRES et al., 2015). Além disso, o uso indiscriminado desses produtos tem resultado na seleção de insetos pragas resistentes a determinados grupos químicos (KARUNKER et al., 2008; NAUEN; DENHOLN, 2005), na resistência cruzada a inseticidas (MOTA-SANCHEZ et al., 2006) ou no aumento da importância de pragas consideradas secundárias (DUTCHER, 2007).

Algumas táticas alternativas ao controle químico podem ser empregadas para o manejo de insetos pragas de forma integrada para reduzir os impactos negativos do controle químico e proporcionar a melhoria da sustentabilidade dos agroecossistemas (WAR et al., 2012).

Uma abordagem atualmente utilizada é a produção de plantas transgênicas que expressam as toxinas inseticidas Cry e Vip de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) (TABASHNIK, 1994; CARRIÈRE et al., 2003; CHRISTOU et al., 2006, GATEHOUSE, 2008). Apesar do sucesso comercial das plantas transgênicas, a evolução da resistência de insetos a proteínas inseticidas indica a necessidade da obtenção constante de novas proteínas inseticidas com diferentes modos de ação para serem utilizadas no manejo da resistência de insetos a plantas transgênicas (GATEHOUSE, 2008; TABASHNIK et al., 2008; GATEHOUSE, 2011).

Dentro do contexto de obtenção de moléculas inseticidas para manejo de insetos pragas, os parasitoides da ordem Hymenoptera representam um reservatório de biodiversidade molecular com grande potencial (PENNACHIO; GIORDANA; RAO, 2012). Durante o parasitismo, esses organismos utilizam variadas ferramentas

bioquímicas para manipular diversos mecanismos fisiológicos de seus hospedeiros como a resposta imunológica, metabolismo, crescimento e desenvolvimento (DAHLMAN et al., 2003; PENNACHIO; STRAND, 2006).

Como exemplos de fontes de moléculas dos parasitoides ativas na regulação da fisiologia do hospedeiro, observam-se os polidnavírus (PDVs) (BURKE; STRAND, 2012), venenos (ASGARI; RIVERS, 2011, MANZOOR et al., 2016), partículas semelhantes a vírus (VLPs) (MORALES, et al., 2005), fluidos do cálice do ovário (YU et al., 2007) e teratócitos (STRAND, 2014).

Dentre esses fatores parasíticos, o endoparasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) libera teratócitos no interior do seu hospedeiro *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Cambidae). Teratócitos são células dissociadas da serosa do ovo durante a eclosão das larvas do parasitoide que ficam dispersas na hemolinfa do hospedeiro (STRAND, 2014). Os teratócitos são ativos na produção de moléculas com atividade reguladora sobre o crescimento e o desenvolvimento do hospedeiro (ZHANG; DAHLMAN; GELMAN, 1992; STRAND, 2014; GAO et al., 2016).

Uma serpina do endoparasitoide *C. flavipes* (*CfSerpina*) foi isolada de seus teratócitos (ROSSI, 2012). As serpinas atuam com um mecanismo único de substrato suicida, através da formação de complexos covalentes estáveis com suas proteinases-alvo que resulta em uma mudança conformacional do complexo inibidor-enzima e, conseqüentemente, na inibição irreversível da enzima (GETTINS, 2002; KHAN et al., 2011).

O presente trabalho foi conduzido para (i) produzir uma serpina proveniente dos teratócitos do endoparasitoide *C. flavipes* (*CfSerpina*) em sistema heterólogo. (ii) avaliar o envolvimento da *CfSerpina* na inibição da ativação de profenoloxidasas de *D. saccharalis* e (iii) avaliar o potencial biotecnológico da *CfSerpina* como agente de controle de *D. saccharalis* após ingestão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Insetos parasitoides

Parasitoides são insetos que depositam seus ovos no corpo de outros artrópodes, no geral outros insetos, que servem como fonte nutricional para que os parasitoides realizem seu desenvolvimento imaturo. Ao final da fase parasítica, os parasitoides levam seus hospedeiros à morte ou os deixam impossibilitados de se reproduzirem (GODFRAY, 1994).

Os parasitoides ocorrem em várias ordens de insetos (Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera, Strepsiptera), mas a maior parte das espécies de parasitoides é observada na ordem Hymenoptera e apresenta enorme diversidade biológica em hábitos (PENNACHIO; STRAND, 2006; PENNACCHIO; CACCIA; DIGILIO, 2014; GLUPOV; KRYUKOVA, 2016).

A maioria dos parasitoides apresenta uma relação de extrema especificidade para parasitar um estágio particular da vida de um hospedeiro como, por exemplo, ovos, larvas, pupas ou adultos (GODFRAY; SHIMADA, 1999). Outros podem completar seu desenvolvimento imaturo entre as fases de ovo e larva (KAESLIN et al., 2010) ou entre as fases de larva e pupa de seus hospedeiros (HERNADEZ et al., 2009). Os parasitoides adultos são de vida livre (VINSON; PENNACCHIO; CÔNSOLI, 2001).

Estima-se que cerca de 20% de todas as espécies de insetos seja de parasitoides e muitas dessas espécies causam alta mortalidade em populações de insetos hospedeiros em todo o mundo (BURKE; STRAND, 2014). A morte do organismo hospedeiro pode ser decorrente do sucesso do desenvolvimento e da emergência da prole das vespas parasitoides (mortalidade mediada pela resposta reprodutiva) (ABRAM et al., 2016), pela nutrição direta nos hospedeiros (alimentação destrutiva do hospedeiro) (JERVIS; KIDD, 1986; CHAN; GODFRAY, 1993) ou pela injeção de compostos químicos que resulta na mutilação dos ovos e larvas dos hospedeiros (ASGARI; RIVERS, 2011; ABRAM et al., 2016; CEBOLLA et al., 2018). Ovos parasitados cujas larvas dos parasitoides não se desenvolvem também contribuem para a morte dos seus hospedeiros (DESNEUX et al., 2009).

Dessa forma, parasitoides são empregados em programas de controle biológico de pragas através da importação, introdução e colonização visando ao controle de pragas exóticas ou nativas (controle biológico clássico), através da conservação dos parasitoides existentes em um ambiente (controle biológico natural) ou através de liberações inundativas após a criação massal em laboratório (controle biológico aplicado) (PARRA et al., 2002).

2.2. Interações parasitoide-hospedeiro

Os endoparasitoides são insetos cujo desenvolvimento imaturo ocorre dentro do corpo de seus hospedeiros e os ectoparasitoides têm seu desenvolvimento imaturo fora do corpo dos seus hospedeiros (GODFRAY; SHIMADA, 1999). O desenvolvimento dos parasitoides pode ocorrer de forma solitária, na qual uma única larva do parasitoide se desenvolve em um hospedeiro, ou de forma gregária, quando mais de um indivíduo da mesma espécie de parasitoide se desenvolve no mesmo hospedeiro (GORD; LEGNER; CALTAGIRONE, 1999).

Em função das interações existentes com seus hospedeiros, os parasitoides podem ser divididos em dois grupos: os idiobiontes e os cenobiontes. Os parasitoides idiobiontes matam ou paralisam o crescimento de seus hospedeiros no momento da oviposição (PENNACHIO; STRAND, 2006, GLUPOV; KRYUKOVA, 2016), enquanto os cenobiontes permitem que seu hospedeiro continue se desenvolvendo de forma controlada até que o estágio imaturo dos parasitoides se complete (GODFRAY, 1994; PENNACHIO; CACCIA; DIGILIO, 2014). Os parasitoides cenobiontes geralmente apresentam período de desenvolvimento imaturo mais longo quando comparado com os ectoparasitoides idiobiontes (GLUPOV; KRYUKOVA, 2016).

Em sua maioria, os idiobiontes são ectoparasitoides ou endoparasitoides que parasitam estágios sésseis de desenvolvimento como ovos ou pupas, apresentam hábitos de busca mais amplos e são capazes de parasitar uma ampla gama de hospedeiros de tamanho apropriado. Este grupo representa o plano ancestral para o estilo de vida dos parasitoides (PENNACHIO; STRAND, 2006).

Os parasitoides cenobiontes são, em sua maioria, endoparasitoides cujos descendentes consomem os nutrientes e se desenvolvem na hemocele do inseto

hospedeiro (NAKAMATSU; TANAKA, 2004; PENNACCHIO; CACCIA; DIGILIO, 2014). Esse grupo é normalmente associado a uma estreita gama de hospedeiros, com comportamento de forrageamento especializado e seus representantes tendem a parasitar herbívoros que se alimentam da mesma planta que o adulto do parasitoide de forma a minimizar o encontro entre espécies incompatíveis com o parasitismo (SHAW, 1994). Os parasitoides cenobiontes são considerados como organismos de estratégia de vida evoluída (PENNACCHIO; STRAND, 2006).

Para que a fêmea parasitoide consiga obter sucesso no parasitismo e transmitir seus genes para as próximas gerações, a mesma necessita localizar seu hospedeiro adequado em um processo sistemático que segundo Tumlinson, Lewis e Vet (1993) envolve as seguintes etapas: a) localização do habitat do hospedeiro; b) localização do hospedeiro; c) aceitação do hospedeiro; d) adequação do hospedeiro; e) regulação do seu hospedeiro. As alterações provocadas pelo parasitoide sobre seu hospedeiro são conhecidas como regulação hospedeira (VINSON; IWANTSCH, 1980).

2.3. Interação *Cotesia flavipes* e *Diatraea saccharalis*

No Brasil, a broca da cana de açúcar *D. saccharalis* é considerada a principal praga da cana de açúcar, especialmente na região sudeste do País. A praga causa injúrias pela alimentação nos tecidos foliares nos seus primeiros dias de vida e danos diretos pela abertura de furos e galerias no colmo da planta que impedem o fluxo da seiva, reduzem a produção de sacarose e resultam na atrofia do colmo que, conseqüentemente, causa o tombamento ou morte da planta (BOTELHO; MACEDO, 2002). Além dos danos diretos, ocorrem danos indiretos ocasionados por fungos como *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* Sheldon que infectam as plantas pelas aberturas criadas pela broca da cana e causam a podridão vermelha que compromete a produção de açúcar e álcool (BOTELHO; MACEDO, 2002; FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

Para o manejo da broca, liberações inundativas do endoparasitoide cenobionte e gregário *C. flavipes* que parasita os ínstares larvais de *D. saccharalis* são realizadas. Esse programa de controle biológico é considerado como um dos

mais eficientes do País e do mundo, com cerca de 3,3 milhões de hectares tratados (PARRA, 2014).

No momento do parasitismo, a vespa parasitoide deposita seus ovos na hemocele do hospedeiro juntamente com uma série de fatores parasíticos que regulam a fisiologia do hospedeiro e garantem o desenvolvimento larval do parasitoide e impedem o desenvolvimento da lagarta (SCAGLIA et al., 2005; ROSSI; SALVADOR; CÔNSOLI, 2014).

Desta forma, o sucesso do parasitismo de *C. flavipes* sobre *D. saccharalis* é decorrente das regulações fisiológicas que o parasitoide realiza sobre seu hospedeiro. Como consequências da regulação hospedeira mediada por *C. flavipes*, observam-se no hospedeiro o retardo do desenvolvimento, a redução do consumo relativo de alimento, redução das taxas metabólicas e de crescimento, alterações no fluxo de alimentos no intestino médio e alterações nas concentrações de carboidratos, glicogênio e lipídios (SALVADOR; CÔNSOLI, 2008; ROSSI; SALVADOR; CÔNSOLI, 2014). O parasitismo por *C. flavipes* também é capaz de ocasionar profundas alterações na imunidade celular de *D. saccharalis*, o que reduz a quantidade de hemócitos e plasmatócitos na hemocele e a atividade de fenoloxidasas (PO) e de lisozimas no hospedeiro (MAHMOUD et al., 2012).

2.4. Regulação hospedeira

Uma vez no interior dos seus hospedeiros, os endoparasitoides alteram a composição bioquímica da hemolinfa do hospedeiro e a torna um ambiente adequado aos requisitos nutricionais para o desenvolvimento imaturo do parasitoide (SALVADOR; CÔNSOLI, 2008). Para superar as defesas imunológicas do inseto hospedeiro e conseguir êxito no parasitismo, as vespas parasitoides evoluíram estratégias passivas e ativas.

As estratégias passivas são aquelas que estão relacionadas às propriedades físicas da superfície de seus ovos ou larvas que os protegem do encapsulamento ou através da combinação de substâncias químicas que os camuflam ou os mimetizam no interior do hospedeiro (QUICKE, 2015). As estratégias ativas estão ligadas à utilização de fatores parasíticos que são introduzidos no momento da oviposição ou

no decorrer do desenvolvimento embrionário e larval do parasitoide no interior do corpo do hospedeiro para alterar a fisiologia do hospedeiro e evitar a rejeição do desenvolvimento dos parasitoides (ASGARI et al., 2003; TENG et al., 2016).

Secreções associadas ao aparelho reprodutor feminino de *C. flavipes* afetam o crescimento, ganho de peso, prolongamento da fase larval, alteração do período final de desenvolvimento e deformações nas pupas que apresentaram características do último ínstar larval, além de deformações no aparelho bucal e asas do seu hospedeiro *D. saccharalis* (LOPES, 2008).

Um dos fatores ativos utilizados pelas vespas parasitoides associado ao processo de regulação hospedeira são os polidnavírus (PDVs). Os PDVs são vírus associados a algumas vespas endoparasitoides das famílias Braconidae e Ichneumonidae subdivididos, respectivamente, nos gêneros Bracovirus e Ichnovirus (WEEB et al., 2000). Como resultado da infecção das células do hospedeiro pelos PDVs, observam-se mudanças fisiológicas dadas pela expressão de genes virais que podem ser observadas no hospedeiro, como a supressão do sistema imunológico em função da morte ou redução da capacidade de aderência dos hemócitos a corpos estranhos (STRAND; PECK, 1995; PENACCHIO; CACCIA DIGILIO, 2014; TENG et al., 2016) ou alterações no desenvolvimento que podem resultar na morte do hospedeiro (WEBB; STRAND, 2005; STRAND; BURKE, 2013). O Bracovirus do endoparasitoide *Cotesia vestalis* (Haliday, 1834) (Hymenoptera: Braconidae), por exemplo, é responsável pela inibição da metamorfose de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) em função da redução da glândula protorácica do hospedeiro em seu último ínstar larval (KIM et al., 2013).

As partículas semelhantes a vírus (VLPs) também estão associadas à capacidade de suprimir o sistema imunológico do hospedeiro pela destruição das células de defesa como os lamelócitos (MORALES et al., 2005).

O veneno dos parasitoides é um importante componente do arsenal empregado no processo de regulação hospedeira. Nos ectoparasitoides idiobiontes, o veneno geralmente induz paralisia a longo prazo de forma a imobilizar e regular o desenvolvimento e as atividades fisiológicas como crescimento e metabolismo dos hospedeiros (DANNEELS et al., 2010). Por outro lado, a função do veneno nos endoparasitoides cenobiontes está relacionada principalmente à paralisia

temporária, regulação do hospedeiro pela supressão do sistema imunológico e para a proteção de ovos e larvas do parasitoides (ASGARI et al., 2003). Além disso, os venenos dos endoparasitoides cenobiontes podem resultar no atraso do desenvolvimento do hospedeiro e ter efeito sinérgico com os PDVs ou VLPs sobre a regulação hospedeira em alguns sistemas hospedeiro-endoparasitoide (ASGARI; RIVERS, 2011).

O veneno de parasitoides consiste em vários peptídeos e proteínas que auxiliam a expressão de genes dos polidnavirus e são capazes de regular a ativação de profenoloxidasas (PPO's) e inibir a agregação e disseminação de hemócitos (ASGARI, 2006; COLINET et al., 2009; TENG et al., 2016). O veneno dos parasitoides também pode causar a atrofia de tecidos internos e órgãos secretores e regular a metamorfose do hospedeiro (MOREAU; GUILLOT, 2005; ASGARI; RIVERS, 2011), alterar a expressão de genes nos hemócitos, no tecido adiposo e no citoesqueleto e modular atividades como ciclo celular, apoptose, resposta ao estresse e regulação da transcrição e tradução gênica nos hospedeiros (FANG et al., 2010).

Algumas vespas endoparasitoides produzem teratócitos, células originadas da membrana serosa que envolvem o embrião do parasitoide durante o desenvolvimento embrionário (KIM; KIM, 2016). Estas células, após a eclosão da larva no interior de seus hospedeiros, dissociam-se e são dispersas na hemolinfa do hospedeiro (MAITI et al., 2003; STRAND, 2014). Os teratócitos podem aumentar de tamanho a medida em que absorvem nutrientes da hemolinfa do hospedeiro (BASIO; KIM, 2005) e, em fases tardias do desenvolvimento do endoparasitoide, desempenham função trófica e servem de alimento para as larvas dos parasitoides (VINSON; SCOTT, 1974; STRAND; WONG, 1991).

Os teratócitos podem atuar na inibição do crescimento e do desenvolvimento do hospedeiro independentemente da ação de outros fatores parasíticos como veneno ou PDVs (DAHLMAN et al., 2003). Os teratócitos de alguns parasitoides podem produzir moléculas que atuam na regulação da tradução de proteínas no hospedeiro de forma a redirecionar o funcionamento fisiológico do hospedeiro para suprir o desenvolvimento do parasitoide (DAHLMAN, et al., 2003; DONG; ZHANG; DAHLMAN, 1996).

Outras moléculas produzidas pelos teratócitos de parasitoides podem causar parada no crescimento e no desenvolvimento do hospedeiro (DAHLMAN et al., 2003) em função de alterações do sistema endócrino do hospedeiro como a redução da atividade da esterase do hormônio juvenil do hospedeiro ou pela alteração do metabolismo de ecdisteroide do hospedeiro (ZHANG; DAHLMAN; GELMAN, 1992).

Outras fontes de moléculas utilizadas pelos parasitoides para a regulação hospedeira são as proteínas ovarianas (OP) e o fluido do cálice do ovário. Essas secreções são compostas por moléculas que podem atuar na supressão do sistema imunológico do hospedeiro ou podem estar associadas a outros fatores parasíticos de modo a proporcionarem um ambiente favorável para a sobrevivência e desenvolvimento da progênie dos parasitoides em detrimento dos seus hospedeiros (VINSON; IWANTSCH, 1980; YAN et al., 2016).

A regulação hospedeira pode se prolongar além do período no qual o hospedeiro e os parasitoides estão interagindo fisicamente entre si. Após o desenvolvimento larval e saída do parasitoide do corpo do hospedeiro, o parasitismo pode resultar em mudanças de uma gama de traços fenotípicos e comportamentais do hospedeiro. Por exemplo, o hospedeiro pode passar a proteger o parasitoide contra o ataque de predadores e hiperparasitoides (parasitoides que parasitam outros parasitoides) (HARVEY et al., 2008).

2.5. Sistema imunológico dos insetos hospedeiros

As relações de parasitismo entre parasitoides e seus hospedeiros resultam em uma contínua coevolução entre os parasitoides que necessitam ter sucesso durante o parasitismo e seus hospedeiros que respondem ao parasitismo (BURKE; STRAND, 2014).

Para estabelecimento dos endoparasitoides, esses devem ultrapassar, evitar ou inativar barreiras físicas e químicas de seus hospedeiros. Alguns componentes do sistema imunológico devem ser rapidamente alterados para viabilização da sobrevivência do parasitoide imaturo em seu hospedeiro (CAI; YE; HU, 2004). Por exemplo, ovos e larvas das vespas endoparasitoides precisam contornar as respostas mediadas pelos hemócitos como, particularmente, a encapsulação (CAI; YE; HU, 2004).

De uma maneira geral, os insetos apresentam um sistema de defesa inata bem desenvolvido visto que sistema imunológico adquirido baseado em anticorpos é ausente (STRAND, 2008). Insetos refratários ao parasitismo por parasitoides ou patógenos possuem respostas imunológicas celulares e humorais ativadas por várias vias de sinalização. Observam-se componentes das respostas celular, como fagocitose, nodulação e encapsulação, ou humoral, como a produção de peptídeos antimicrobianos e ativação das profenoloxidasas (PPO's) em fenoloxidasas (PO's) que resultam na melanização (JIANG et al., 2003; MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009; LI et al., 2016).

As PO's são enzimas responsáveis pela catálise da oxidação de tirosina e o-difenois em quinonas que posteriormente polimerizam para formação da melanina (TANG et al., 2008; YAN et al., 2017). A melanina formada é depositada na superfície de corpos invasores encapsulados ou nodulados pela agregação de hemócitos ou sobre locais de ferimentos no corpo do hospedeiro (KANOST; GORMAN, 2008; YAN, et al., 2017). Além disso, a resposta humoral mediada pela atividade direta das PO's também resulta na formação de subprodutos como semiquinonas, ânions superóxidos e radicais hidroxila (NAPPI; POIRIÉ; CARTON, 2009) além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) que auxiliam na interrupção do desenvolvimento de corpos invasores (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009; NAPPI; POIRIÉ; CARTON, 2009; KANOST; GORMAN, 2008).

Quando o inseto não é perturbado por corpos invasores, as PO's apresentam-se na forma de zimógeno inativo na hemolinfa PPO. Após o reconhecimento de um invasor, as PPO's são ativadas por hidrólise proteolítica em um local específico próximo da extremidade amino terminal por serino proteases presentes na hemolinfa (KANOST; GORMAN, 2008). As serino proteases apresentam um resíduo do aminoácido serina no sítio ativo que é essencial para a atividade enzimática e são ativadas como parte de uma cascata de reações desencadeada pelo reconhecimento de uma infecção. Como resultado, o sistema imunológico, na maioria das vezes, produz uma resposta local de melanização em um local específico e por duração limitada (KANOST; GORMAN, 2008).

2.6. Inibidores de serino proteases no sistema imunológico dos insetos

A regulação da ativação da cascata de ativação das PPO's apresenta grande importância, uma vez que produtos como quinonas e intermediários reativos de oxigênio resultantes da atividade das PO's e reações transientes são potencialmente tóxicos para o hospedeiro (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004; COLINET et al., 2009; KANOST; GORMAN, 2008). Essa cascata de ativação é regulada por inibidores de serino proteases presentes na hemolinfa de artrópodes (KANOST, 1999).

Diferentes inibidores de serino proteases podem ser observados. Como exemplo são citados os inibidores do tipo Kunitz que apresentam peso molecular abaixo de 10 kDa e uma família de inibidores com peso em torno de 4 kDa (BREUGELMANS, 2009). Na hemolinfa de insetos, inibidores de serino proteases foram identificados como o inibidor presente em *Antheraea mylitta* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Saturniidae) com grande atividade de inibição de proteases fúngicas (RAI et al., 2010) e um inibidor composto de um domínio de pacifastina presente na hemolinfa de *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae) e *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Orthoptera: Acrididae) capaz de bloquear a ativação de PPO (KELLENBERGER; ROUSSEL, 2005).

Em destaque, as serpinas são proteínas que apresentam peso molecular de aproximadamente 40-60 kDa, atuam na regulação de proteases da hemolinfa de invertebrados (GETTINS, 2002; YAN et al., 2017) e controlam rigorosamente a cascata de ativação das PPO's em PO's (KANOST, 1999). Três serpinas foram identificadas na hemolinfa de *Manduca sexta* (L., 1763) (Lepidoptera: Sphingidae) (serpina-1J, serpina-3 e serpina-6). Essas serpinas foram associadas com a interrupção da ativação das PPO's pois, quando adicionadas como proteínas recombinantes no plasma, resultaram na inibição direta das proteases ativadoras de PPO's (WANG; JIANG, 2004).

Como ferramenta para evitar o sistema imunológico de seus hospedeiros, os endoparasitoides podem utilizar serpinas para a regulação da cascata de ativação das PPO's. Por exemplo, uma serpina (Tipo ISy) do veneno do parasitoide *Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton et Keiner-Pillault, 1979) (Hymenoptera: Figitidae) resultou na inibição da cascata de ativação das PPO's na hemolinfa da larva hospedeira *Drosophila yakuba* Burla, 1954 (Diptera: Drosophilidae) (COLINET

et al., 2009). Outro exemplo é observado no parasitoides de pupas *Pterolamus puparum* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Pteromalidae) cujas serpinas formam complexos com proteinases presentes na hemolinfa do seu hospedeiro e resultam na inibição da ativação de PPO's do seu hospedeiro *Pieris rapae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae) (YAN et al., 2017) (Figura 1).

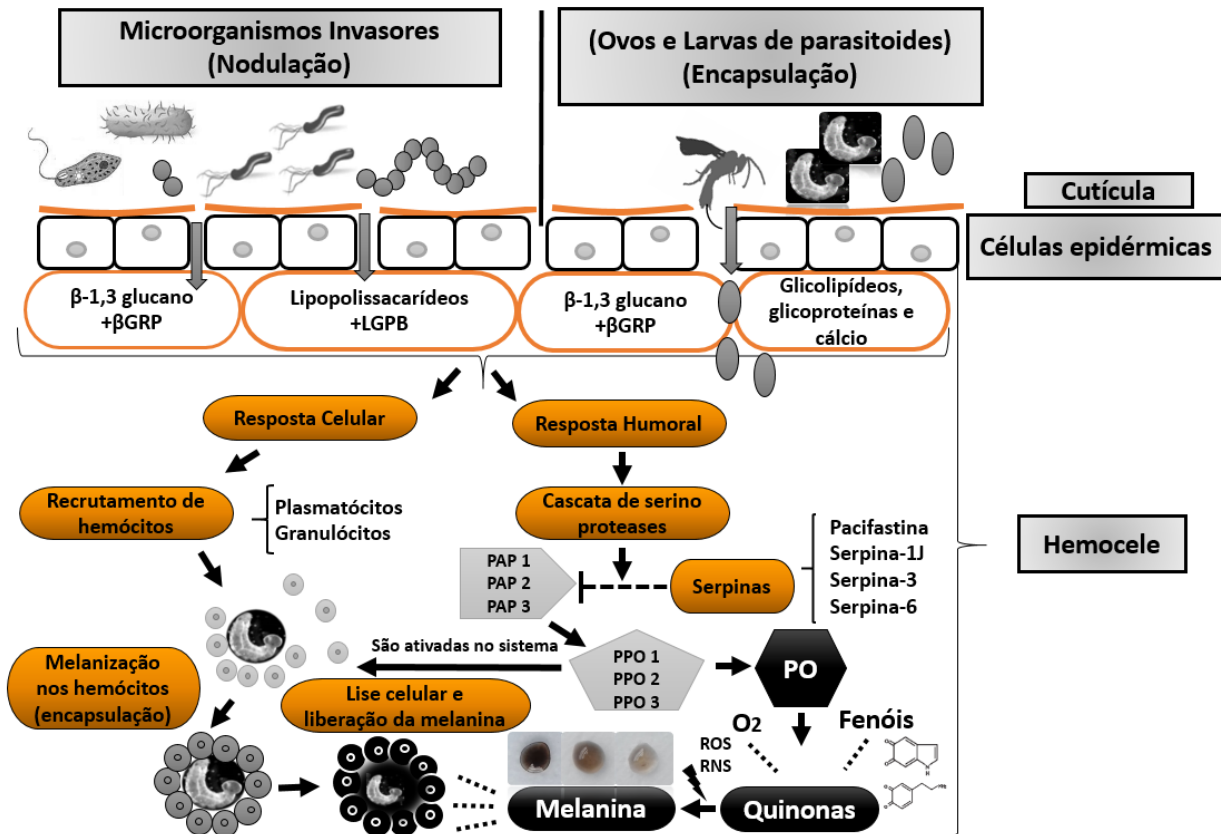


Figura 1: Modelo da via de ativação das profenoloxidasas (PPO) em fenoloxidasas (PO) e etapas da melanização após invasão na hemocele dos insetos. Figura baseada em Kanost et al. (2008), González-Santoyo e Córdoba-Aguilar (2012) e Dubovskiy et al. (2016). (PAP: Proteinases; ROS: Espécies reativas de oxigênio; RNS: Espécies reativas de nitrogênio; β GRP: Proteína de reconhecimento de beta glucano; LGPB: Proteína de reconhecimento de lipossacarídeo).

2.7. Inibidores de serino proteases no sistema digestório dos insetos

O intestino dos insetos é uma das principais interfaces de contato entre o inseto e o ambiente. O entendimento do funcionamento intestinal pode ser útil para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos pragas cujas moléculas atuem no intestino dos herbívoros (TERRA; FERREIRA, 1994). Por exemplo, novas táticas de controle de insetos pragas podem ser desenvolvidas pelo conhecimento das enzimas digestivas dos insetos e da sensibilidade dessas a inibidores (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006; CHOUGULE et al., 2008).

As proteases digestivas do intestino de insetos herbívoros são hidrolases, ou seja, enzimas que catalisam reações de hidrólise de ligações peptídicas. Com base na natureza do grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases podem ser classificadas dentro dos seguintes grupos: serino proteases, aspartil proteases, cisteíno proteases e metaloproteases (TERRA; FERREIRA, 2005). As serino proteases são caracterizadas por apresentarem um resíduo de serina em seu centro catalítico, as aspartil proteases apresentam duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico, as cisteíno proteases apresentam um aminoácido cisteína no seu centro catalítico e as metaloproteases requerem íons metálicos em seu mecanismo catalítico (RAO et al., 1998).

As serino proteases, incluindo tripsina e quimotripsina, são as proteases digestivas predominantes no intestino de lepidópteros imaturos e representam cerca de 95% da atividade digestiva sobre proteínas (TERRA; FERREIRA, 1994; BROEHAN et al., 2007). A diversidade de serino proteases em um inseto pode ser correlacionada à adaptação do mesmo a diferentes plantas hospedeiras bem como à exposição dos insetos a biomoléculas antagonicas de ocorrência natural como os inibidores de proteases (IPs) derivados de plantas (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006).

Os inibidores de serino proteases (ISPs) podem ser classificados em serpinas, α -macroglobulinas (A2Ms), inibidores canônicos e inibidores não-canônicos (KROWARSCH et al., 2003; RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004a). Das 68 famílias de ISP, a família das Serpinas é a que apresenta o maior número de inibidores com sequências determinadas (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004b; MEEKINS; KANOST; MICHEL, 2017).

A maioria das serpinas compartilha estruturas idênticas com sete ou nove alfa hélices e três beta folhas e também compartilham um *loop* (centro reativo exposto) (RCL) que se liga à serino protease alvo próximo da região C terminal da sequência. Nas serpinas, o RCL possui uma ligação *scissile* entre os resíduos P1 na região N-terminal do sítio de clivagem e P1' na região C-terminal no sítio de clivagem (GETTINS, 2002).

O mecanismo de inibição pelas serpinas é iniciado pela reação da serino protease ativa com o *loop*, que corresponde ao centro reativo da serpina. Essa ligação gera um complexo covalente permanente (complexo de Michaelis) no qual a serino protease é lançada para o pólo oposto da serpina em um ângulo de 70Å (ângstroms). Desta forma, a arquitetura catalítica da serino protease é destruída, sua estrutura é desordenada e a serino protease é inativada irreversivelmente (RAU et al., 2007). Devido a esta característica de inibição irreversível, as serpinas são conhecidas como inibidores “suicidas” ou de “uso único” (HUNTINGTON; RANDY; CARRELL, 2000). A maioria das serpinas inibem serino proteases, mas também há serpinas quem inibem caspases (RAY et al., 1992) e cisteíno proteases semelhantes a papaína (IRVING, et al., 2002).

ISPs podem ser encontrados em grande parte nos vegetais e compõem parte de um mecanismo de defesa básico das plantas (GATEHOUSE, 2011). Muitos ISPs têm sido isolados e testados através de bioensaios e a ingestão desses ISPs tem resultado em alterações sobre o desenvolvimento de diferentes insetos herbívoros (YEH et al., 1997; BABU; SUBRAHMANYAM, 2010; MACEDO et al., 2011; DA SILVA et al., 2014; EL-LATIF, 2014; OLIVEIRA, MARANGONI, MACEDO, 2014; JAMAL et al., 2015; JOHNSON, et al., 2016; RUAN et al., 2017; HAMZA et al., 2018).

Na agricultura, os ISPs podem ser empregados no processo de piramidação em plantas transgênicas com toxinas inseticidas Cry e Vip da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner. Esse tipo de combinação pode contribuir para aumento da eficiência do manejo de insetos pragas (PARDO-LOPES, 2009; GATEHOUSE, 2011). Outra possibilidade é a piramidação de genes de inibidores de serino proteases com genes de inibidores de cisteíno proteinases. Estudos realizados indicaram efeitos significativos sobre a redução do peso, deformidades e redução da

fertilidade de insetos herbívoros após consumo de plantas com piramidação de diferentes genes de ISPs (DUNSE et al., 2010; QUILIS et al., 2014; FERRER et al., 2016; HAMZA et al., 2018).

2.8. Exploração biotecnológica de moléculas derivadas de parasitoides

A ordem Hymenoptera e sua ampla diversidade de espécies parasitoides representa um grande grupo de organismos antagonistas de insetos (WHITFIELD, 2003). Os parasitoides possuem uma ampla diversidade de fatores parasíticos que atuam durante o processo de regulação hospedeira e constituem um grande reservatório de biomoléculas com potencial biotecnológico para, por exemplo, realizar o controle de insetos pragas (DI LELIO et al., 2014).

O primeiro relato em que um produto de gene de parasitoide foi utilizado como estratégia de desenvolvimento de uma planta transgênica para controle de pragas foi realizado com a proteína TSP14 isolada dos teratócitos de *Microplitis croceipes* (Cresson, 1872) (Hymenoptera: Braconidae). A informação genética que codifica a TSP14 foi inserida para expressão da proteína em plantas de tabaco nas quais foram observados aumento da mortalidade e redução da taxa de crescimento e desenvolvimento da lagarta do tabaco *M. sexta* e *Chloridea virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) em relação a plantas controle (MAITI et al., 2003). Outro estudo avaliou a expressão de uma quitolectina proveniente dos teratócitos do parasitoide *Toxoneuron nigriceps* (Viereck, 1912) (Hymenoptera: Braconidae) em plantas de tabaco que resultou no aumento da mortalidade de larvas de *C. virescens* em três dias após início da alimentação (ROSSI et al., 2012).

O Ichnovirus de *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae) inibe a expressão gênica no nível pós-transcricional de proteínas associadas ao crescimento, à resposta antimicrobiana e à melanização e torna os hospedeiros mais suscetíveis a má formação (pupas não viáveis) e à infecção por doenças (SHELBY et al., 1998). As proteínas da família CysMotif produzidas pelo Ichnovirus de *C. sonorensis* (rVHv1.1 e rVHv1.4) em sua forma nativa ou recombinante demonstraram inibir a síntese de proteínas no tecido testicular, nos hemócitos e no tecido gorduroso de *C. virescens* (KIM, 2005). As proteínas recombinantes rVHv1.1 e rVHv1.4 produzidas por expressão em Baculovirus foram

aplicadas sobre a dieta de insetos e foi observada a supressão do crescimento e desenvolvimento de larvas de *C. virescens*. A proteína rVHv1.1 reduziu até 70% o crescimento das lagartas e causou deformações nas pupas, além de causar efeito significativo na redução de peso de um hospedeiro não permissivo, *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) (GILL et al., 2006).

Um gene de cistatina viral identificado a partir do PDV de *Cotesia vestalis* (Haliday, 1834) (Hymenoptera: Braconidae) foi utilizado para gerar uma planta de tabaco transgênica expressando CpBV-CST1. Foi observado que lagartas de *S. exigua* em seus primeiros ínstares tiveram alta mortalidade após se alimentarem da planta de tabaco e efeitos similares de resistência contra outros insetos infestantes como *Helicoverpa assulta* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) também foram observados (KIM et al., 2016).

Uma anquirina viral (ANK) do PDV de *T. nigriceps* (TnBVANK1) foi expressa em plantas de tabaco transgênicas que apresentaram atividade inseticida e alterações no desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae). O efeito da proteína não foi associado à translocação desta anquirina para a hemocele do hospedeiro onde supostamente seus receptores estariam localizados. Experimentos de imunolocalização evidenciaram o acúmulo da proteína viral (TnBVANK1) na borda das células epiteliais do intestino médio, exercendo forte impacto negativo no transporte de aminoácidos (DI LELIO et al., 2014).

Um gene derivado do PDV de *Cotesia rubecula* (Marshall, 1885) (Hymenoptera: Braconidae) (CrV1) foi inserido em Baculovirus (AcMNPV-CrV1). Esse entomopatógeno recombinante teve seu poder inseticida aumentado sobre *Pieris rapae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae) em função da despolimerização do citoesqueleto de actina dos hemócitos e redução da capacidade de propagação dos hemócitos sobre a superfície de organismos estranhos (WEI; PEREZ-RODRIGUEZ; RODRIGUEZ-PEREZ, 2016).

Embora espera-se que as proteínas derivadas de parasitoides não estejam naturalmente em contato direto com o intestino das suas larvas hospedeiras, estes estudos mostram o potencial destas moléculas quando administradas por ingestão

(MAITI et al., 2003). Com os avanços dos estudos da atividade inseticida destas proteínas e a elucidação dos seus modos de ação após ingestão, meios de melhorar a atividade inseticida destas moléculas poderão ser descobertos (GILL et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Clonagem do transcrito CfSerpina no vetor de expressão pET24 α

A informação genética completa responsável pela codificação de uma serpina dos teratócitos de *C. flavipes* foi determinada previamente (Rossi, 2012) e foi enviada para a empresa GenOne (http://genone.com.br/servicos/sintese_genes.htm; Rio de Janeiro, Brasil) para síntese do gene com otimização de códons para expressão em *Escherichia coli* e posterior clonagem no plasmídeo de expressão pET24 α (pET24 α -CfSerpina). O plasmídeo foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.2. Produção, purificação, detecção por Western Blot e quantificação da CfSerpina solúvel

Células competentes de *E. coli* BL21 transformadas por choque térmico com o plasmídeo pET24 α -CfSerpina foram plaqueadas em meio LB sólido (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de NaCl e 15 g.L⁻¹ de ágar) contendo 50 μ g.mL⁻¹ de canamicina e as placas foram incubadas por 16 h a 37°C. Após incubação, uma colônia foi transferida para tubo tipo Falcon (50 mL) com 10 mL de meio LB líquido e 50 μ g.mL⁻¹ de canamicina e realizou-se o cultivo (37°C; 250 rpm; 16 h) para preparo do pré-inóculo.

Após transferência de 10 mL do pré-inóculo (densidade ótica, DO_{600nm} = 0,6) para um Erlenmeyer (1000 mL) com 300 mL de LB 2x contendo 50 μ g.mL⁻¹ de canamicina, a expressão da CfSerpina foi induzida pela adição de IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopiranoside) 1,0 mM quando o cultivo apresentou DO_{600nm} = 0,5 e o mesmo foi cultivado a 37°C e 200 rpm por 4 horas. A expressão de CfSerpina foi induzida por 4 horas, o cultivo foi centrifugado (15.300g; 10 min; 4°C) e o sobrenadante descartado.

Para a obtenção dos lisados bacterianos foi utilizada a metodologia empregada por Bergamasco et al. (2011), com as seguintes modificações: para o início da lise celular, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato-salino (0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,02 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,5 M NaCl; pH 7,4) sob agitação constante em vórtex até a completa dissolução do “pellet” bacteriano. As amostras foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL onde foram adicionados 300 μL de lisozima (100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 100 μL de DNase (100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os tubos foram incubados (37°C; 30 min; 60 rpm) e posteriormente incubados em gelo.

Para a completa lise celular, alíquotas de 5 mL da solução foram submetidas a 3 ciclos de sonicação de 60 seg em intervalos de 10 seg. As amostras foram centrifugadas (10621g; 30 min; 4°C) e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado e armazenado a -20°C até o processo de purificação.

Uma coluna “Níquel-Sepharose™ 6 FAST FLOW” foi equilibrada com 25 mL tampão de lavagem (9,9 mM de Tris base, 49,9 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 99,93 mM NaCl, pH 8,0). Após equilibrar a coluna, 19 mL de proteínas solúveis foram adicionados à mesma e o volume eluído foi coletado em dois tubos de ensaio (F1 e F2). A coluna foi lavada com 15 mL de tampão de lavagem e dois tubos de 5 mL cada (Void 1 e Void 2) foram coletados. A eluição das proteínas aderidas à resina foi realizada com tampão de lavagem com diferentes concentrações de imidazol (10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM e 250 mM).

Cada concentração de imidazol foi aplicada duas vezes (5 mL) na coluna e as frações eluídas foram coletadas separadamente. Ao término do processo, a coluna foi lavada com 30 mL de água destilada e armazenada com 5 mL de etanol 20% a 4°C. Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em gelo até realização da diálise em membrana de celulose (12 MWCO, Sigma-Aldrich®) contra uma solução de 10 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 em um volume de 4 L a 4°C. A troca da solução de diálise foi realizada três vezes por dia durante três dias. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas durante cinco dias em um liofilizador Labconco® e ressuspensas em 1 mL de água deionizada para a verificação do padrão proteico das proteínas purificadas em SDS-PAGE 7,5% (LAEMMLI, 1970; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A concentração de proteínas solúveis obtidas após o processo de diálise foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando o reagente comercial *Bradford Reagent* (Sigma Aldrich) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Após a purificação, a detecção da CfSerpina produzida por expressão heteróloga em *E. coli* BL21 foi realizada por *Western Blot* (Towbin et al., 1979). Uma amostra da eluição de 250 mM de imidazol foi corrida em gel SDS-PAGE 7,5% com o marcador "Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder" (Fermentas). Para a detecção da proteína com cauda de histidina foi utilizado o anticorpo monoclonal primário antipoli-histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (GE Health Care Bio-Sciences, Piscataway, NJ, EUA) para o reconhecimento do anticorpo primário ligado à proteína. A revelação foi realizada com Sigmafast DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

3.3. Ensaio de avaliação da inibição da melanização na hemolinfa de *Diatraea saccharalis* na presença de CfSerpina

Lagartas de *D. saccharalis* do 5º instar (8 lagartas) foram anestesiadas em gelo durante 10 min e posteriormente secas com papel toalha. Uma falsa perna de cada lagarta foi excisada e 10 µL de hemolinfa (gota) foram coletados em papel Parafilm. A hemolinfa de lagartas parasitadas foi coletada 24 horas após parasitismo. O parasitismo das lagartas foi realizado oferecendo-se manualmente uma lagarta de 5º instar a uma única fêmea de *C. flavipes* previamente acasalada.

Em seguida, foram adicionados 10 µL de cada uma das seguintes soluções de (A-E) individualmente à gota de hemolinfa:

(A) 10 µL de NaCl 0,8%;

(B) 10 µL de CfSerpina (24,34 µg) em NaCl 0,8%;

(C) 10 µL de CfSerpina (24,34 µg) em NaCl 0,8% com laminarina 0,5% (Lam, Indutor de resposta imunológica);

(D) 10 µL NaCl 0,8% com Lam 0,5%;

(E) 10 µL Lam 0,5%;

(F) 10 µL de hemolinfa de *D. saccharalis* 24 h após o parasitismo por *C. flavipes* + 10 µL de Lam 0,5%;

(G) 10 µL de hemolinfa de *D. saccharalis* 24 h após o parasitismo + 10 µL NaCl 0,8%;

(H) 10 µL de hemolinfa de *D. saccharalis* 24 h após o parasitismo + 10 µL de hemolinfa de lagarta não parasitada.

Após a adição dos tratamentos, foi aguardada uma hora para a visualização dos diferentes padrões de melanização em temperatura ambiente. Foram realizadas 3 repetições deste ensaio.

3.4. Ensaio de atividade de fenoloxidase na hemolinfa de *Diatraea saccharalis* após injeção de CfSerpina e laminarina

Grupos de lagartas do 3^o ao 5^o instares (lagartas aptas para o parasitismo) foram anestesiadas em gelo durante 10 min e posteriormente foram secas externamente com papel toalha. Em seguida, foram injetados nas lagartas 10 µL das seguintes soluções individualmente:

T1: NaCl 0,8%;

T2: CfSerpina em NaCl 0,8%;

T3: Lam 0,5% em NaCl 0,8%;

T4: CfSerpina em NaCl 0,8% + Lam 0,5%;

T5: NaCl 0,8% em *D. saccharalis* 24 h após o parasitismo por *C. flavipes* (Parasitismo foi realizado conforme o item 3.3);

T6: Injeção de 10 µL de Lam 0,5% + NaCl 0,8% em *D. saccharalis* 24 h após o parasitismo por *C. flavipes*.

As injeções foram realizadas com o auxílio de uma seringa (25 µL - Hamilton®) pela lateral do inseto para evitar danos aos órgãos internos. Uma hora após a injeção, uma falsa perna de cada lagarta foi cortada sobre papel Parafilm para a coleta da hemolinfa. Uma repetição foi considerada pelo agrupamento da hemolinfa de 3 lagartas. Foram realizadas 10 repetições para cada tratamento.

Um volume de 30 µL de hemolinfa foi submetido a centrifugação (200g; 5 min, 25°C) para a sedimentação dos hemócitos. O sobrenadante foi coletado e 10 µL do

mesmo foram transferidos para um tubo tipo Eppendorf (2 mL) e foram adicionados 990 µL do substrato para determinação da atividade de fenoloxidase (5 mM de L-Dopa, 10 mM de cacodilato de sódio, 5 mM de CaCl₂ pH 7,0). Após leve agitação, a amostra foi transferida para cubeta e realizou-se a determinação do branco em espectrofotômetro. Leituras de absorbância foram realizadas de forma contínua de 10 em 10 min por 1 hora no comprimento de onda de 490 nm. A fase linear da atividade de fenoloxidase (Absorbância vs tempo; R² ≥ 0,99) foi utilizada nos cálculos de atividade. Uma unidade (U) de fenoloxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para alterar 0,01 unidades de absorbância por minuto e a atividade de fenoloxidases foi expressa por µL de hemolinfa.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar versão 5.9 (FERREIRA, 2011).

3.5. Ensaio de desenvolvimento larval de *Diatraea saccharalis* utilizando CfSerpina

Posturas de *D. saccharalis* foram obtidas em uma criação mantida na "Biofábrica de Cotesia" da Usina São Martinho no município de Pradópolis-SP e foram mantidas em condições controladas (27 ± 1°C; UR 60 ± 10 %; fotofase de 12 horas) até eclosão das lagartas para serem utilizadas nos bioensaios.

Os bioensaios para avaliação dos efeitos de CfSerpina sobre imaturos de *D. saccharalis* foram conduzidos utilizando-se placas de cultivo de células (12 poços de 2 cm de diâmetro) que continham dieta artificial de alimentação (PARRA, 2001).

A CfSerpina foi aplicada sobre a superfície da dieta artificial na concentração de 100 µg por poço e água como controle. Após aplicação dos tratamentos, aguardou-se um período para a secagem da superfície da dieta e foi colocada uma lagarta recém eclodida sobre a dieta artificial. Os bioensaios foram mantidos em condições controladas (25 ± 1°C; UR 60 ± 10 %; fotofase de 12 horas) e o ganho de peso das lagartas foi avaliado em 10, 15 e 20 dias após a montagem do experimento.

Os dados foram analisados quanto à normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade da variância (COCHRAN, 1941). Os dados foram transformados em Log10 para normalização e submetidos a ANOVA. As análises estatísticas (teste t de Student, $p \leq 0,05$) foram feitas utilizando o software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

3.6. Ensaio de inibição de tripsinas intestinais de *Diatraea saccharalis* utilizando CfSerpina

Para o ensaio de inibição enzimática, cada tratamento consistiu da coleta 20 intestinos de lagartas de *D. saccharalis* do 3º ao 5º ínstar. Para a coleta dos intestinos, as lagartas foram anestesiadas em gelo e secas externamente com papel toalha. Com o auxílio de uma pinça e tesoura oftalmológica, foi realizado um corte longitudinal por uma das laterais de cada lagarta de forma a expor o tubo digestivo para dissecação do intestino médio com seu conteúdo.

Para o preparo dos extratos enzimáticos dos intestinos médios de *D. saccharalis*, os tecidos foram transferidos para homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com 500 µL de tampão 100 mM glicina-NaOH pH 9,0. Após homogeneização, adicionaram-se mais 500 µL de tampão 100 mM glicina-NaOH pH 9,0 para completa homogeneização. Os tecidos foram transferidos para tubos Eppendorf (2 mL) e centrifugados (10.000g; 10 min; 25°C). O sobrenadante foi coletado e mantido em gelo.

Para a reação de detecção de atividade tripsina, foram utilizados 400 µL do substrato BApNA 1,0875 mM (ERLANGER et al., 1961) e 400 µL de tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,0. O início da reação enzimática foi dado pela adição de 200 µL do extrato enzimático diluído em água (10x). Nos tubos do tratamento controle (T1) (ausência de inibidor), 200 µL de água deionizada foram adicionados. Nos tratamentos de inibição foram adicionados 200 µL (5 µg) de CfSerpina (T2). Outro controle foi realizado pela adição de 200 µL (5 µg) de albumina de soro bovino (BSA) (T3). Foi realizado controle para verificar hidrólise não enzimática do substrato (substituição do volume de extrato enzimático por água).

As reações foram incubadas em banho maria (30°C) com interrupção das reações a cada 30 min pela adição de ácido acético 10% durante 120 min. Em seguida, leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 410 nm.

Uma unidade de tripsina (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 nmol de *p*-nitroanilina/min e foi calculada utilizando-se uma curva padrão de *p*-nitroanilina (0-0,25 µmol) preparada nas mesmas condições do ensaio (concentração final do tampão glicina-NaOH 33,33 mM pH 9,0).

Os dados foram analisados quanto à normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade da variância (COCHRAN, 1947) e submetidos a ANOVA. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

3.7. Ensaio de inibição de proteases gerais intestinais de *Diatraea saccharalis* utilizando CfSerpina

As reações para avaliação de inibição de proteases gerais no intestino de *D. saccharalis* foram compostas por 500 µL do substrato azocaseína (5 mg/mL), 400 µL de tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,0 e 50 µL de extrato enzimático sem diluição (item 3.6). Os tratamentos foram diferenciados pela adição de 50 µL de água (atividade controle) (T1) 50 µL (50 µg) de CfSerpina (T2), ou 50 µL (50 µg) de BSA (controle com BSA) (T3). Foi realizada uma reação para controle de hidrólise espontânea de substrato na ausência do extrato enzimático, substituindo-o por água.

As reações foram incubadas em banho maria (30°C) com interrupções das reações a cada 1 h pela adição 500 µL de ácido tricloroacético 10% por 4 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000g; 5 min; 25°C) e a absorbância do sobrenadante coletado foi lida em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 440 nm.

Uma unidade de atividade de proteases gerais (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para alterar 0,01 unidade de absorbância a 440nm/min.

Os dados foram analisados quanto à normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade da variância (COCHRAN, 1947) e submetidos a ANOVA. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

3.8. Estabilidade de CfSerpina no conteúdo intestinal de *Diatraea saccharalis*

A CfSerpina utilizada nesse ensaio foi produzida na forma de corpos de inclusão. Após a lise celular e centrifugação (item 3.2), foram adicionados 5 mL de água Milli-Q aos restos celulares e corpos de inclusão presentes no sedimento que foram homogeneizados em vórtex. As amostras foram centrifugadas (10.000g; 10 min; 25°C), o sobrenadante foi descartado e 1,5 mL de tampão de lavagem (10 mM de Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 M de ureia, pH 7,5) foi adicionado ao sedimento. A amostra foi incubada por 5 min em temperatura ambiente e uma nova centrifugação foi realizada (10.000g; 10 min; 25°C). O sobrenadante foi descartado e os corpos de inclusão presentes no sedimento foram lavados com 1,5 mL de água Milli-Q. Uma nova centrifugação foi realizada (10.000g; 10 min; 25°C) e o sobrenadante foi descartado.

A quantificação da CfSerpina produzida na forma de corpos de inclusão foi realizada por densitometria. Para isso, um gel SDS-PAGE 7,5% foi preparado contendo a fração insolúvel da CfSerpina e cinco diferentes concentrações de BSA (0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05 mg/mL). O gel foi corado para revelação das proteínas com Coomassie Brilliant Blue R-250, digitalizado em scanner HP Scanjet G4050 e a concentração foi determinada utilizando-se o Software ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare).

O conteúdo intestinal de lagartas de *D. saccharalis* de 3^o ínstar foi obtido conforme item 3.6 pela retirada do extrato enzimático bruto contido no intestino do inseto. O conteúdo intestinal foi centrifugado (10.000g; 10 min; 25°C) e o líquido sobrenadante foi coletado como conteúdo intestinal.

Um volume de 4 µL de conteúdo intestinal foi incubado com 12,5 µg de CfSerpina em tubos do tipo Eppendorf (2 mL) durante 30 min a 30°C. Após a

incubação, as amostras foram centrifugadas (10.000g; 5 min, 25°C) e um gel SDS-PAGE foi realizado para verificar o perfil proteico das amostras (sedimento e sobrenadante). Uma amostra contendo apenas o conteúdo intestinal foi aplicada no mesmo gel SDS-PAGE.

4. RESULTADOS

4.1. Produção, purificação e quantificação da CfSerpina produzida em *E. coli* BL21

A proteína recombinante CfSerpina foi expressa pelo cultivo de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET24 α -CfSerpina a 37°C após a indução da expressão com 1mM de isopropil- β -D-thiogalactopiranoside (IPTG). A análise do gel SDS-PAGE mostra ao aumento da expressão (canaletas 1, 3, 5 e 7) ao longo das 4 horas de incubação utilizadas para a produção da proteína quando comparado com as canaletas controle sem a indução da expressão (2, 4, 6 e 8). A banda que corresponde a CfSerpina apresentou tamanho esperado de 47kDa (Figura 2).

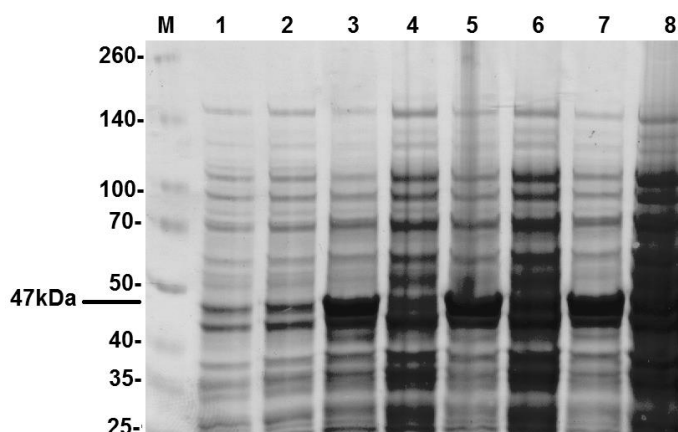


Figura 2. Gel SDS-PAGE 7,5% do conteúdo proteico total do cultivo de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET24 α -CfSerpina em amostras induzidas ou não induzidas para expressão com IPTG (1mM) em diferentes períodos de incubação a 37°C. M: Marcador de peso molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 1: Amostra em 0 h após indução da expressão (aie); 2: Amostra de cultivo não induzido em 0 h aie; 3: Amostra de cultivo em 1,5 h aie; 4: Amostra de cultivo não induzido em 1,5 h aie; 5: Amostra de cultivo em 3 h aie; 6: Amostra de cultivo não induzido em 3 h aie; 7: Amostra de cultivo em 4 h aie; 8: Amostra de cultivo não induzido em 4 h aie.

A purificação da *CfSerpina* em coluna de Níquel-Sepharose utilizando tampão de eluição contendo diferentes concentrações de imidazol (10, 25, 50, 75, 100mM) resultou na eliminação de bandas contaminantes de *E. coli* BL21 (Figuras 3A e 3B). A *CfSerpina* foi eluída pura e em sua forma solúvel na concentração mais alta do reagente imidazol (250mM) (Figura 3C).

O resultado do ensaio de *Western Blot* indicou que a *CfSerpina* obtida após o processo de purificação foi detectada pelos anticorpos específicos para a cauda de polihistidina (Figura 3D).

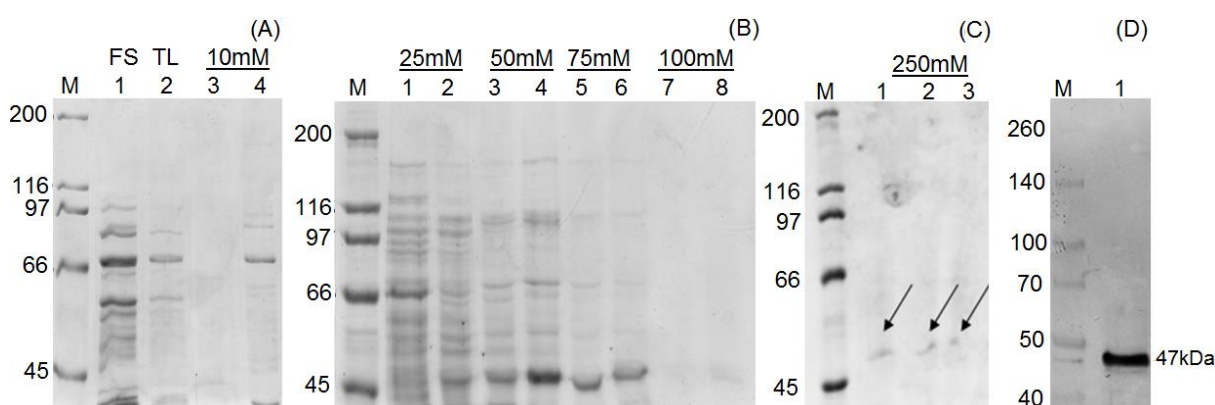


Figura 3. Produção e purificação de *CfSerpina* solúvel em *E. coli* BL21 com indução por IPTG 1 mM durante 4 horas a 37°C. **(A)** SDS-PAGE 7,5%. 1: Fração solúvel (FS); 2: Fração após aplicação de tampão de lavagem (TL); 3 e 4: Frações eluídas em tampão contendo imidazol 10 mM; **(B)** SDS-PAGE 7,5%. 1 e 2: Frações eluídas em tampão contendo imidazol 25 mM; 3 e 4: Fração eluídas em tampão contendo imidazol 50 mM; 5 e 6: Frações eluídas em tampão contendo imidazol 75 mM; 7 e 8: Frações eluídas em tampão contendo imidazol 100 mM; **(C)** SDS-PAGE 7,5%. 1, 2 e 3: Frações eluídas em tampão contendo 250 mM imidazol, as setas indicam a *CfSerpina* produzida em sua forma solúvel e purificada; **(D)** *Western Blot*. 1: Fração revelada da *CfSerpina* recombinante eluída em tampão contendo 250mM de imidazol com o anticorpo anti-6x histidina. Marcador de peso molecular (kDa) (A, B e C) “BioRad” Broad Range (kDa); **(D)** “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas).

A quantificação das amostras de *CfSerpina* purificadas (Figura 3C) resultou nas concentrações (5,2; 4,97 e 5,29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) respectivamente nas canaletas 1, 2 e 3. Essas amostras foram utilizadas para a realização de todos os bioensaios.

4.2. Avaliação da inibição da melanização na hemolinfa de *Diatraea saccharalis* utilizando CfSerpina solúvel

A melanização espontânea da hemolinfa de lagartas de *D. saccharalis* ocorreu de maneira menos acentuada em lagartas parasitadas (Figura 4G), um pouco mais intensa em lagartas não parasitadas (Figura 4A) e muito intensa em ambas condições (lagartas parasitadas e não parasitadas) quando laminarina foi adicionada (Figuras 4C-F).

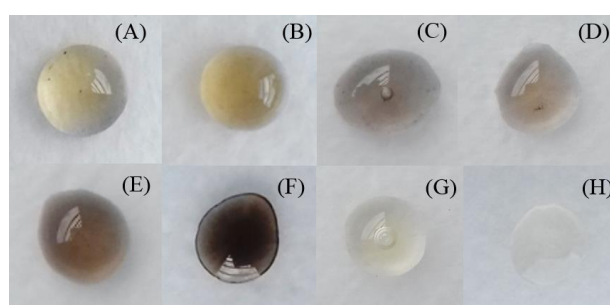


Figura 4. Melanização da hemolinfa de *Diatraea saccharalis* após a adição de CfSerpina, laminarina ou parasitismo por *Cotesia flavipes*. **(A)** 10 μ L de hemolinfa + 10 μ L de NaCl 0,8%. **(B)** 10 μ L de hemolinfa + 10 μ L de CfSerpina (24,34 μ g) em NaCl 0,8%. **(C)** 10 μ L de hemolinfa + 10 μ L de CfSerpina (24,34 μ g) em NaCl 0,8% e laminarina (Lam) 0,5%. **(D)** 10 μ L de hemolinfa + 10 μ L NaCl 0,8% e Lam 0,5%. **(E)** 10 μ L de hemolinfa + 10 μ L Lam 0,5%. **(F)** 10 μ L de hemolinfa de lagarta 24 h após parasitismo por *C. flavipes* + 10 μ L de Lam 0,5%. **(G)** 10 μ L de hemolinfa de lagarta 24 h após parasitismo + 10 μ L NaCl 0,8% **(H)** 10 μ L de hemolinfa de lagarta 24 h após parasitismo + 10 μ L de hemolinfa de lagarta não parasitada.

A presença de CfSerpina nas amostras não reduziu a melanização de forma aparente devido ao escurecimento mais intenso da gota (Figuras 4B e 4C). A hemolinfa de lagartas parasitadas inibiu a melanização da hemolinfa de lagartas não parasitadas (Figura 4H).

4.3. Avaliação da atividade da fenoloxidase na hemolinfa de *Diatraea saccharalis*

Em lagartas não parasitadas, as injeções de CfSerpina ou de laminarina isoladamente resultaram no aumento da atividade de fenoloxidasas em relação ao controle (NaCl 0,8%). Quando injetadas em conjunto, a atividade de fenoloxidasas

foi superior a todas as outras condições. A atividade de fenoloxidasas em lagartas parasitadas injetadas com NaCl foi inferior em relação à atividade de fenoloxidasas de lagartas não parasitadas injetadas com NaCl. Quando injetada laminarina em lagartas parasitadas, a atividade de fenoloxidasas foi aumentada em relação à atividade observada no controle (NaCl), mas inferior à atividade observada em lagartas não parasitadas injetadas com laminarina (Figura 5).

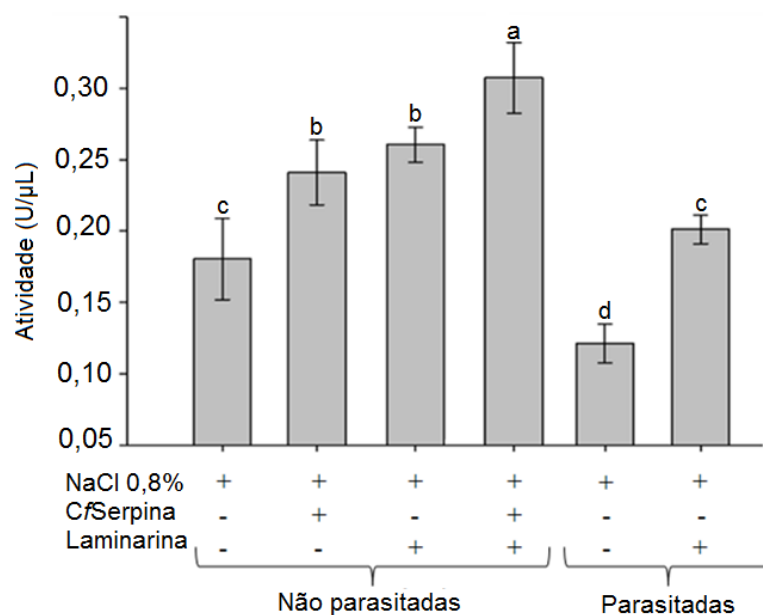


Figura 5. Atividade de fenoloxidase na hemolinfa de *Diatraea saccharalis* após a injeção de NaCl 0,8%, CfSerpina em NaCl 0,8% e laminarina 0,5% em NaCl 0,8% ou de combinações desses fatores em lagartas não parasitadas ou 24 horas após o parasitismo por *Cotesia flavipes*. (+) representa a presença do composto e (-) representa a ausência do composto. Colunas com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$).

4.4. Avaliação do desenvolvimento larval de *Diatraea saccharalis* após ingestão de CfSerpina

Não houve diferenças em relação ao ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta contendo 100 μg de CfSerpina em 10 ($F = 0,10$; $P = 0,752$), 15 ($F = 0,30$; $P = 0,861$) ou 20 dias ($F = 0,03$; $P = 0,84$) após o início da alimentação. Não foi observada mortalidade de lagartas alimentadas com CfSerpina ou no controle.

4.5. Avaliação da inibição da atividade de tripsina e proteases gerais intestinais de *Diatraea saccharalis* pela CfSerpina

Não foi verificada inibição de tripsinas intestinais com 5 µg ($F = 0,22$; $P = 0,8123$) ou proteases gerais intestinais em reações com 50 µg de CfSerpina como inibidor ($F = 0,26$; $p = 0,7768$). A concentração equivalente de BSA (5 µg e 50 µg) nos respectivos ensaios não interferiu na atividade de ambas proteases (Figura 6).

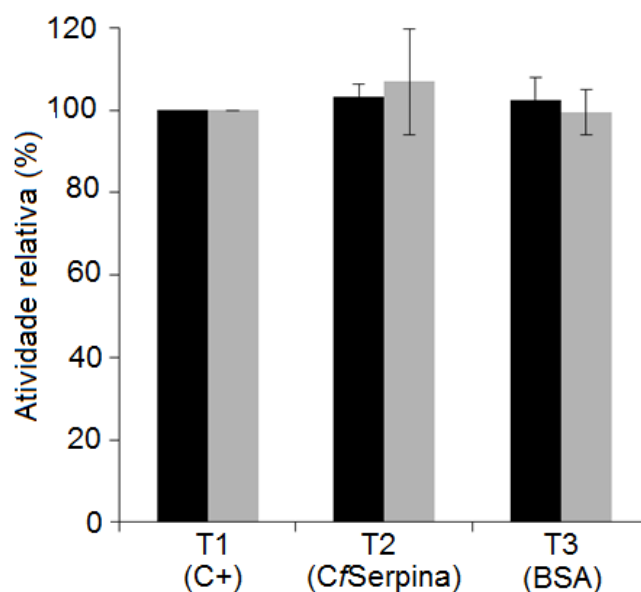


Figura 6: Atividade relativa (%) das proteases intestinais (tripsina e proteases gerais) de *Diatraea saccharalis* incubadas com água (C+), inibidor (CfSerpina) ou BSA (controle). Em preto, atividade de tripsinas; em cinza, atividade de proteases gerais.

4.6. Avaliação da estabilidade da CfSerpina no conteúdo intestinal de *Diatraea saccharalis*

A presença da CfSerpina produzida na forma de corpos de inclusão (Figura 7, canaleta 1) e o perfil proteico do extrato produzido a partir do intestino médio de *D. saccharalis* foram revelados em SDS-PAGE (7,5%) (Figura 7, canaleta 2). Após incubação da CfSerpina com o conteúdo intestinal de *D. saccharalis*, foi observado que a CfSerpina foi completamente solubilizada e hidrolisada, visto que a presença

de CfSerpina não pode ser detectada tanto no sedimento (Figura 7, canaleta 3) como no sobrenadante (Figura 7, canaleta 4).

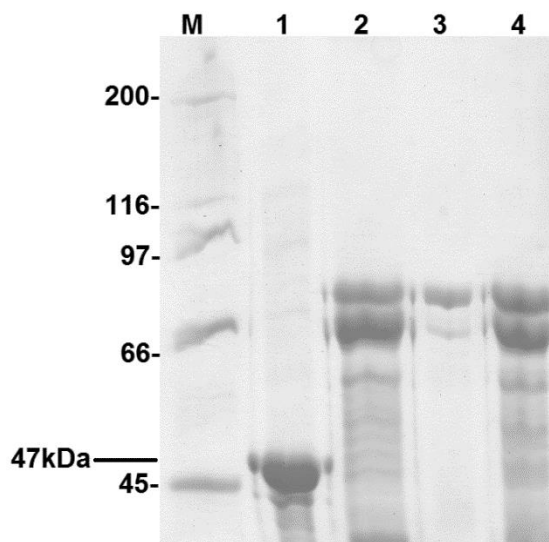


Figura 7: Estabilidade da CfSerpina incubada com o conteúdo do intestino médio de *Diatraea saccharalis* em gel SDS-PAGE 7,5%. M: Marcador de peso molecular BioRad Broad Range (kDa); 1: CfSerpina produzida na forma de corpos de inclusão; 2: Conteúdo do intestino de *D. saccharalis*; 3: Proteínas sedimentadas por centrifugação (10.000g; 5 min; 25°C) após incubação da CfSerpina com o conteúdo intestinal de *D. saccharalis*; 4: Proteínas solúveis da CfSerpina incubada com o conteúdo intestinal de *D. saccharalis*.

5. DISCUSSÃO

Após serem ovipositados na hemocele de seus hospedeiros, endoparasitoides encontram abrigo e um ambiente que suporta suas necessidades para aquisição de nutrientes. Porém, o sistema imunológico do hospedeiro é uma barreira que deve ser inativada pelo parasitoide para que o parasitismo ocorra com sucesso. Para inativar a defesa imunológica de seus hospedeiros, parasitoides usam recursos moleculares que reduzem, por exemplo, a capacidade de encapsulação e melanização de corpos estranhos de seus hospedeiros (TANAKA; MATSUMOTO; HAYAKAWA, 2002; BAE; KIM, 2004).

No caso de *C. flavipes*, sabe-se que as capacidades de encapsulação e melanização bem como a atividade de fenoloxidasas em determinados momentos após o parasitismo no hospedeiro *D. saccharalis* são reduzidas (MAHMOUD; DE

LUNA-SANTILLANA; RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2011; MAHMOUD et al., 2012). Diferente do observado por Mahmoud et al. (2011), no presente trabalho foi verificado que a atividade de fenoloxidasas em hospedeiros em 1 dia após o parasitismo foi reduzida em 30%. Neste período, *C. flavipes* ainda está em sua fase de ovo sem teratócitos em circulação (PINHEIRO et al., 2010) e pode utilizar-se de recursos presentes em outros fatores parasíticos como o veneno (COLINET et al., 2009; YAN et al., 2017) ou proteínas provenientes dos PDVs (Bracovírus) para reduzir a resposta de defesa humoral do hospedeiro como a redução da atividade de fenoloxidasas e da produção de peptídios antimicrobianos (BURKE; STRAND, 2014).

Além da regulação ativa da resposta humoral de *D. saccharalis*, *C. flavipes* também pode utilizar mecanismos passivos para manter seus ovos viáveis. Como exemplo, o endoparasitoide pode se desenvolver em locais inacessíveis aos hemócitos, em tecidos ou órgãos específicos como glânglios do sistema nervoso (SHAW; QUICKE, 2000) ou atrás dos epitélios intestinais (KLOMP; TEERINK, 1978). *Cotesia flavipes* apresenta o comportamento de ovipositar próximo a região da cabeça do hospedeiro (observação pessoal), o que pode indicar que seus ovos ficam protegidos próximo as glândulas salivares, assim como ocorre em parasitoides da família Ichneumonidae (KLOMP; TEERINK, 1978). O endoparasitoide *C. flavipes* pode ainda apresentar características superficiais em seus ovos que não possibilitam o reconhecimento desses como um corpo estranho pelo hospedeiro (STRAND; PECH, 1995; BECKAGE, 1998).

Ao terceiro dia após o parasitismo, os teratócitos de *C. flavipes* são liberados na hemocele do hospedeiro parasitado e novos recursos de regulação hospedeira podem ser produzidos por esse tipo celular (PINHEIRO et al., 2010). A cascata de ativação das profenoloxidasas em fenoloxidasas é regulada por serino proteases presentes na hemolinfa dos insetos (HARTZER et al., 2005; KANOST; GORMAN 2008). Essas proteases podem ser ativadas por laminarina (polissacarídeo presente na parede celular de microrganismos) o que resulta na ativação das PPO's em PO's (TAKAHASHI et al., 2014; TAKAHASHI; GARCIA; KANOST, 2015). Em condições naturais, a não ativação dessa cascata em condições sem estresses é mediada por serpinas do próprio organismo. Por exemplo, serpinas de *M. sexta* foram

identificadas na hemolinfa (serpina-1J, serpina-3 e serpina-6) e foram relacionadas com a manutenção das PPO's (WANG; JIANG, 2004). Para invadir a hemocele de seus hospedeiros sem ativar a cascata de ativação das PPO's, parasitoides podem empregar serpinas (COLINET et al., 2009; YAN et al., 2017).

A injeção de laminarina em lagartas parasitadas e não parasitadas induziu a ativação de PPO's. Esse fato sugere que o sistema imunológico de lagartas parasitadas pode responder a infecções por microrganismos de forma a manter a sanidade da hemocele do hospedeiro para o desenvolvimento do parasitoide (MAHMOUD; LUNA-SANTILLANA; RODRÍGUEZ-PEREZ, 2011).

As análises para avaliação do potencial biotecnológico de CfSerpina foram realizadas visto que serpinas e inibidores de proteases podem ser uma interessante forma para o manejo de insetos pragas (THOMAS et al., 1995; LAURENCE; KOUNDAL, 2002; ALVAREZ-ALFAGEME, 2011; JAMAL et al., 2013; JAMAL et al., 2015; JOHNSON et al., 2016; RUAN et al., 2017). A avaliação da CfSerpina como uma molécula tóxica (ou antinutritiva) após ingestão indicaram que a CfSerpina não resultou em alterações sobre a mortalidade e o ganho de peso larval de *D. saccharalis*.

Provavelmente, isso se deu pela falta de inibição *in vitro* de tripsinas e proteases gerais intestinais de *D. saccharalis* pela CfSerpina testada em condição de pH próxima à observada no intestino de insetos da ordem Lepidoptera (pH 9,0). Apesar do intestino dos lepidópteros imaturos apresentarem serino proteases fundamentais para o processo digestivo (TERRA; FERREIRA, 1994; HERRERO et al., 2005; CHOUGULE et al., 2008), existe a possibilidade da CfSerpina não ser ativa em pH alcalino. Além disso, a CfSerpina foi hidrolisada quando incubada com extratos proteicos do intestino *D. saccharalis*. A resistência de inibidores de proteases à degradação proteolítica no intestino é considerada como um pré-requisito para que esses inibidores exerçam seu potencial contra os insetos (da SILVA et al., 2014).

Por outro lado, um inibidor de serino proteases (AmPI) presente na hemolinfa de imaturos de *Antheraea mylitta* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Saturniidae) é ativo quando testado *in vitro* em uma faixa de pH entre 2,5 e 9,0 e apresenta poder de inibição sobre proteases do intestino médio desse lepidóptero e contra tripsina e

quimotripsina comerciais (RAI et al., 2010). Da mesma forma, uma oryctina do tipo Kazal presente na hemolinfa *Oryctes rhinocerus* (Linnaeus, 1958) (Coleoptera: Scarabaeidae) apresentou inibição sobre as serino proteases α -quimiotripsina, endopeptidase K, subtilisina e elastase de leucócitos em uma ampla faixa de pH (7,2-9,2) (HORITA et al., 2010).

Inibidores de proteases como as serpinas presentes na hemolinfa de lepidópteros também podem estar relacionados com o mecanismo de defesa dos insetos para inativar proteases de fungos entomopatogênicos como por exemplo *B. bassiana* e *M. anisoplie* (FROBIOUS et al., 2000), na regulação da atividade de proteases que digerem a cutícula dos insetos durante o processo de ecdise ou na inibição de proteases oriundas de tecidos em processo de histólise (EGUCHI, 1982).

Os mecanismos de regulação da interação parasitoide-hospedeiro ocorrem em momentos específicos do parasitismo. A CfSerpina caracterizada no presente estudo foi obtida dos teratócitos de lagartas de *D. saccharalis* em 5, 7 e 9 dias após o parasitismo (ROSSI, 2012). Diferente da hipótese testada (inibição da cascata de ativação das PPOs de *D. saccharalis*), é possível que a CfSerpina produzida pelos teratócitos neste período esteja associada com a inibição de outros processos mediados por serino proteases.

Apesar da diferença marcante entre o pH do intestino de lepidópteros e do local natural de ocorrência de moléculas derivadas de endoparasitoides (hemolinfa), moléculas produzidas por parasitoides da ordem Hymenoptera com atividade inseticida após ingestão já foram identificadas (MAITI et al., 2003, GILL et al., 2006; ROSSI et al., 2012; DI LELIO et al., 2014; WEI; PEREZ-RODRIGUEZ; RODRIGUEZ-PEREZ, 2016; KIM et al., 2016).

Novas investigações sobre as respectivas serino proteases alvo da CfSerpina necessitam ser conduzidos, tais como a determinação das proteases alvo e o pH ótimo da inibição de CfSerpina sobre essas proteases. A regulação hospedeira realizada por *C. flavipes* sobre *D. saccharalis* pode nos fornecer uma miríade de moléculas que desempenham papéis significativos em vários processos biológicos. A identificação e avaliação dessas moléculas reguladoras são necessárias para uma melhor compreensão de suas funções bioquímicas. Tais moléculas tem despertado grande interesse por possivelmente serem ativas sobre receptores

distintos dos observados nas moléculas inseticidas utilizadas atualmente no manejo de pragas e necessitam ser melhor investigadas (BECKAGE; GELMAN, 2004).

6. CONCLUSÕES

(i) O presente estudo resultou na produção de uma serpina putativa derivada dos teratócitos de *Cotesia flavipes* em sistema heterólogo.

(ii) A CfSerpina produzida não foi associada com a inibição da cascata de ativação da profenoloxidase na hemolinfa de *D. saccharalis*.

(iii) A CfSerpina produzida não causou alterações sobre desenvolvimento larval de *D. saccharalis* após ingestão e não resultou na inibição da atividade de proteases digestivas de *D. saccharalis*.

7. REFERÊNCIAS

ABRAM, P. K.; BRODEUR, J.; BURTE, V.; BOIVIN, G. Parasitoid-induced host egg abortion: An underappreciated component of biological control services provided by egg parasitoids. **Biological Control**, San Diego, v. 98, n. p. 52-60, 2016.

AL SALEH, I. A. Pesticides: a review article. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, Danbury, v. 13, n. 3, p. 151-161, 1994.

ALVAREZ-ALFAGEME, F.; MAHARRAMOV, J.; CARRILLO, L.; VANDENABEELE, S.; VERCAMMEN, D.; BREUSEGEM, F. V.; SMAGG, G. Potential use of a serpin from *Arabidopsis* for pest control. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 5, e20278, 2011.

ASGARI, S. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 61, n. 3, p. 146-156, 2006.

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

ASGARI, S.; ZHANG, G.; ZAREIE, R.; SCHMIDT, O. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 33, n. 10, p. 1017-1024, 2003.

BABU, S. R.; SUBRAHMANYAM, B. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98, p. 349-358, 2010.

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

BASIO, N. A.; KIM, Y. A short review of teratocytes and their characters in *Cotesia plutellae* (Braconidae: Hymenoptera). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 8, n. 2, p. 211-217, 2005.

BECKAGE, N. E. Modulation of immune responses to parasitoids by Polydnviruses. **Parasitology**, New York, v. 116, p. 57-64, 1998.

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

BERGAMASCO, V. B.; GONÇALVES J. F.; POLANCZYK, R. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. Expression of a new *Bacillus thuringiensis* cry1Ia gene in *Escherichia coli* with strong activity against cotton pests. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Jordan, v. 5, n. 12, p. 526-533, 2011.

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

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

BREUGELMANS, B.; SIMONET, G.; HOEF, V. V, SOEST, V. S.; BROECK, J. V. Pacifastin-related peptides: structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, New York, v. 30, n. 3, p. 622-632, 2009.

BROEHAN, G.; ZIMOCH, L.; WESSELS, A.; ERTAS, B.; MERZENDORFER, H. A chymotrypsin-like serine proteinase interacts with the chitin synthase from the midgut of the tobacco hornworm. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 210, p. 3636-3643, 2007.

BURKE, G. R.; STRAND, M. R. Polydnviruses of parasitic wasps: domestication of viruses to act as gene delivery vectors. **Insects**, Basel, v. 3, n.1, p. 91-119, 2012.

BURKE, G. R.; STRAND, M. R. Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 23, n. 4, p. 890-901, 2014.

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. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 50, n. 5, p. 315-322, 2004.

CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; SISTERSON, M.; ANTILLA L.; WHITLOW, M.; DENNEHY T. J.; TABASHNIK, B. E. Longterm regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 4, p. 1519-1523, 2003.

CEBOLLA, R.; VANACLOCHA, P.; URBANEJA, A.; TENA, A. Overstinging by hymenopteran parasitoids causes mutilation and surplus killing of hosts. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 91, n. 1, p. 327-339, 2018.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, Hoboken, v. 198, n. 1, p. 116-126, 2004.

CHAN, M. S.; GODFRAY, H. C. J. Host-feeding strategies of parasitoid wasps. **Evolutionary Ecology**, Dordrecht, v. 7, n. 6, p. 593-604, 1993.

CHOUGULE, N. P.; DOYLE, E.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 54, p. 563-572, 2008.

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 6, p. 302-308, 2006.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Human Genetics**, Hoboken v. 11, n.1, p. 47-52, 1941.

COLINET, D.; DUBUFFE, A.; CAZES, D.; MOREAU, S.; DREZEN, J-M.; POIRIÉ, M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 681-689, 2009.

CRESSWELL, J. E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 149-157, 2011.

DA SILVA, D. S.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 61, p. 1-7, 2014.

DAHLMAN, D. L.; RANA, R. L.; SCHEPERS, E. J.; SCHEPERS, T.; DILUNA, F. A.; WEBB, B. A. A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. **Insect Molecular Biology**, Hoboken, v. 12, n. 5, p. 257-534, 2003.

DANNEELS, E. L.; RIVERS, D. B.; DE GRAAF, D. C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 494-516, 2010.

DESNEUX, N.; BARTA, R. J.; HOELMER, K. A.; HOPPER, K. R.; HEIMPEL, G. E. Multifaceted determinants of host specificity in an aphid parasitoid. **Oecologia**, New York, v. 16, n. 2, p. 387-398, 2009.

DI LELIO, I.; CACCIA, S.; COPPOLA, M.; BUONANNO, M.; DI PRISCO, G.; VARRICCHIO, P.; FRANZETTI, E.; CORRADO, G.; MONTI, S. M.; RAO, R.; CASARTELLI, M.; PENNACHIO, F. A virulence factor encoded by a polydnavirus confers tolerance to transgenic tobacco plants against lepidopteran larvae, by impairing nutrient absorption. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, e113988, 2014.

DONG, K.; ZHANG, D.; DAHLMAN, D. L. Down-regulation of juvenile hormone esterase and arylphorin production in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Microplitis croceipes*. **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 32, n. 2, p. 237-248, 1996.

DUBOVSKIY, I. M.; KRYUKOVA, N. A.; GLUPOV, V. V. RATCLIFFE, N. A. Encapsulation and nodulation in insects. **Invertebrate Survival Journal**, Modena, v. 13, p. 229-246, 2016.

DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 34, p. 15016-15021, 2010.

DUTCHER, J. A review of resurgence and replacement causing pest outbreaks in IPM. In: Ciancio, A.; Mukerji, K. G. (Eds.). **General concepts in integrated pest and disease management**. Amsterdam: Springer, 2007. p. 27-43.

EGUCHI, M.; HANEDA, I.; IWAMOTO, A. Properties of protease inhibitors from the hemolymph of silkworms, *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* and *Philosamia Cynthia ricini*. **Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology**, New York, v. 71, n. 4, p. 569-576, 1982.

EJIGU, D.; MEKONNEN, Y. Pesticide use on agricultural fields and health problems in various activities. **East African Medical Journal**, Nairob, v. 82, n. 8, p. 427-432, 2005.

EL-LATIF, A. O. A. *In vivo* and *in vitro* inhibition of *Spodoptera littoralis* gut-serine protease by protease inhibitors isolated from maize and sorghum seeds. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 116, p. 40-48, 2014.

ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003.

FANG, Q.; WANG, L.; ZHU, J.; LI, Y.; SONG, Q.; STANLEY, D. W.; AKHTAR, Z. R.; YE, G. Expression of immune-response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 484, p. 2-17, 2010.

FANTKE, P.; FRIEDRICH, R.; JOLLIET, O. Health impact and damage cost assessment of pesticides in Europe. **Environment International**, Oxford, v. 49, p. 9-17, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERRER, A.; ARRÓ, M.; MANZANO, D.; ALTABELLA, T. **Strategies and methodologies for the co-expression of multiple proteins in plants**. In: VEJA, C. M. (Ed.). *Advanced technologies for protein complex production and characterization*. New York: Springer, 2016. p. 263-285.

FROBIOUS, A. C.; KANOST, M. R.; GOTZ, P; VILCINSKAS, A. Isolation and characterization of novel inducible serine inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria melonella*. **European Journal of Biochemistry**, Dublin, v. 267, p. 2046-2053, 2000.

GAO, F.; GU, Q. J.; PAN, J.; WANG, Z. H.; YIN, C. L.; LI, F.; SONG, Q. S.; STRAND, M. R.; CHEN, X. X.; SHI, M. *Cotesia vestalis* teratocytes express a diversity of genes and exhibit novel immune functions in parasitism. **Scientific Reports**, London, v. 6, 26967, 2016.

GATEHOUSE J. A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, p. 881-887, 2008.

GATEHOUSE J. A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah, v. 12, p. 409-416, 2011.

GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, n. 12, p. 4751-4804, 2002.

GILL, T. A.; FATH-GOODIN, A.; MAITI, I. I.; WEBB, B. A. Potential uses of cys-motif and other polydnavirus genes in biotechnology. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 68, p. 393-426, 2006.

GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; DESHPANDE, V. V.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P. K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 393-401, 1998.

GLUPOV, V. V.; KRYUKOVA, N. A. Physiological and biochemical aspects of interactions between insect parasitoids and their hosts. **Entomological Review**, New York, v. 96, n. 5, p. 513-524, 2016.

GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. New Jersey: Princeton University Press, 1994. p. 895.

GODFRAY, H. C. J.; SHIMATA, M. Parasitoids as model organism for ecologists. **Researches on Population Ecology**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 3-10, 1999.

GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 142, n. 1, p. 1-16, 2012.

GORDH, G.; LEGNER, E. F.; CALTAGIRONE, L. E. Biology of parasitic Hymenoptera. In: Bellows, T.S.; Fisher, T.W. (Eds.). **Handbook of biological control**. San Diego: Academic Press, 1999, p. 355-371.

HAMZA, R.; PÉREZ-HEDO, M.; URBANEJA, A.; RAMBLA, J. L.; GRANELL, A.; GADDOUR, K.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. Expression of two barley proteinase inhibitors in tomato promotes endogenous defensive response and enhances resistance to *Tuta absoluta*. **BMC Plant Biology**, London, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2018.

HARTZER, K. L.; ZHU, K. Y.; BAKER, J. E. Phenoloxidase in larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 59, n. 2, p. 67-79, 2005.

HARVEY, J. A.; KOS, M.; NAKAMATSU, Y.; TANAKA, T.; DICKE, M.; VET, L. E. M.; BRODEUR, J.; BEZEMER, T. M. Do parasitized caterpillars protect their parasitoids

from hyperparasitoids? A test of the “usurpation hypothesis”. **Animal Behavior**, London, v. 76, n. 3, p. 701-708, 2008.

HERNÁNDEZ, J.V V.; OSBORN, F.; HERRERA, B .; LIENDO-BARANDIARAN, C. V.; PEROZO, J.; VELÁSQUEZ, D. Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 243-250, 2009.

HERRERO, S.; COMBES, E.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M.; MAAGD, R. A.; BEEKWILDER, J. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 35, n. 10, p. 1073-1082, 2005.

HORITA, S.; ISHIBASHI, J.; NAGATA, K.; MIYAKAWA, T.; YAMAKAWA, M.; TANOKURA, M. Isolation, cDNA cloning, and structure-based functional characterization of oryctin, a hemolymph protein from the coconut Rhinoceros Beetle, *Oryctes rhinoceros*, as a novel serine protease inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 285, n. 39, p. 30150-30158, 2010.

HUNTINGTON, J. A.; RANDY, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature**, London, v. 407, p. 923-926, 2000.

IRVING, J. A.; PIKE, R. N.; DAI, W.; BRÖMME, D.; WORRALL, D. M.; SILVERMAN, G. A.; COETZER, T. H.; DENNISON, C.; BOTTOMLEY, S. P.; WHISSTOCK, J. C. Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha(1)-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. **Biochemistry**, Washington, v. 41, n. 15, p. 4998-5004, 2002.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; AHMED, W. A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 311-316, 2015.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; KHAN, M. Serine protease inhibitors in plants: nature’s arsenal crafted for insect predators. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 1-34, 2013.

JERVIS, M. A.; KIDD, N. A. C. Host-feeding strategies in Hymenoptera parasitoids. **Biological Reviews**, Hoboken, v. 61, n. 1, p. 395-434, 1986.

JIANG, H.; WANG, Y.; YU, X-Q.; ZHU, Y.; KANOST, M. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 33, n. 10, p. 1049-1060, 2003.

JOHNSON, E. T.; SKORY, C. D.; NAUMANN, T. A.; JAIRAJPURI, M. A.; DOWD, P. F. Three sorghum serpin recombinant proteins inhibit midgut trypsin activity and growth of corn earworm. **Agri Gene**, Oxford, v. 2, p. 11-16, 2016.

KAESLIN, M.; REINHARD, M.; BÜHLER, D.; ROTH, T.; PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* is a complex mixture and has multiple biological effects. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 56, n. 7, p. 686-694, 2010.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, Kidlington, v. 23, n. 4, p. 291-301, 1999.

KANOST, M. R.; GORMAN, M. I. Phenoloxidase in insect immunology. In: Beckage, N. E. (Ed.). **Insect Immunology**. San Diego, Academic Press, 2008. p. 69-96.

KARUNKER, I.; BENTING, J.; LUEKE, B.; PONGE, T.; NAUEN, R.; RODITAKIS, E.; VONTAS, J.; GORMAN, K.; DENHOLM, I.; MORIN, S. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 38, n. 6, p. 634-644, 2008.

KELLENBERGER, C.; ROUSSEL, A. Structure-activity relationship within the serine protease inhibitors of the pacifastin family. **Protein & Peptide Letters**, Sharjah, v. 12, n. 5, p. 409-414, 2005.

KHAN, M. S.; SINGH, P.; AZHAR, A.; NASEEM, A.; RASHID, Q.; KABIR, M. A.; JAIRAJPURI, M. A. Serpin inhibition mechanism: a delicate balance between native metastable state and polymerization. **Journal of Amino Acids**, Cairo, v. 2011, p. 1-10, 2011.

KIM, E.; KIM, Y. Translational control of host gene expression by a Cys-Motif protein encoded in a Bracovirus. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 9, e0161661, 2016.

KIM, E.; KIM, Y.; YEAM, I.; KIM, Y. Transgenic expression of a viral cystatin gene CpBV-CST1 in tobacco confers insect resistance. **Environmental Entomology**, Cary, v. 45, n. 5, p. 1322-1331, 2016.

KIM, J.; HEPAT, R.; LEE, D.; KIM, Y. Protein tyrosine phosphatase encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses a larva-to-pupa metamorphosis of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology**, New York, v. 166, n. 1, p. 60-69, 2013.

KIM, Y. Identification of host translation inhibitory factor of *Campoletis sonorensis* ichnovirus on the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 59, n. 4, p. 230-244, 2005.

KLOMP, H.; TEERINK, B. J. The epithelium of the gut as a barrier against encapsulation by blood cells in three species of parasitoids of *Bupalus piniarius* (Lep., Geometridae). **Netherlands Journal of Zoology**, Leiden, v. 28, n. 1, p. 132-138, 1978.

KROWARSCH, D.; CIERPICKI, T.; JELEN, F.; OTLEWSKI, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, n. 11, p. 2427-2444, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2002.

LI, J.; MA, LI.; LIN, Z.; ZOU, Z., LU, Z. Serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and antimicrobial peptide pathways in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 73, p. 27-37, 2016.

LOPES, C. S. **Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *D. saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)**. 2008. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MACEDO, M. L. R.; FILHO, E. B. S. D.; FREIRE, M. DAS G. M.; OLIVA, M. L. V.; SUMIKAWA, J. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. **The Protein Journal**, New York, v. 30, n. 1, p. 9-19, 2011.

MAHMOUD, A. M. A.; DE LUNA-SANTILLANA, E. J.; GUO, X. RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A. Parasitism by *Cotesia flavipes* alters the haemocyte population and phenoloxidase activity of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomological Society of Canada**, Ontario, v. 144, n. 4, p. 599-608, 2012.

MAHMOUD, A. M. A.; DE LUNA-SANTILLANA, E. J.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A. Parasitism by the endoparasitoid wasp *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances the susceptibility of *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Science**, Cary, v. 11, n. 119, p. 1-15, 2011.

MAITI, I. B.; DEY, N.; PATTANAIK, S.; DAHLMAN, D. L.; RANA, R.L.; WEBB, B. A. Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). **Plant Biotechnology Journal**, Hoboken, v. 1, n. 3, p. 209-219, 2003.

MANZOOR, A.; ULABDIN, Z.; WEBB, B. A.; ARIF, M. J.; JAMIL, A. De novo sequencing and transcriptome analysis of female venom glands of ectoparasitoid *Bracon hebetor* (Say.) (Hymenoptera: Braconidae). **Comparative Biochemistry and Physiology D: Genomics & Proteomics**, New York, v. 20, p. 101-110, 2016.

MARMARAS, V. J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, New York, v. 21, n. 2, p. 186-195, 2009.

MEEKINS, D. A.; KANOST, M. R.; MICHEL, K. Serpins in arthropod biology. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 62, p. 105-119, 2017.

MORALES, J.; CHIU, H.; THIRI, O.; PLAZA, R.; HOSKINS, S.; GOVIND, S. Biogenesis, structure, and immune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victorinae*. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 52, n. 2, p. 181-195, 2005.

MOREAU, S. J.; GUILLOT, S. Advances and prospects on biosynthesis structure and functions of venom from parasitic wasps. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 35, n. 11, p. 1209-1223, 2005.

MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. M.; GRAFIUS, E. J.; MOYER, D. D. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Management Science**, Hoboken, v. 62, n. 1, p. 30-37, 2006.

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

NAPPI, A.; POIRIÉ, M.; CARTON, Y. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps **Advances in Parasitology**, San Diego, v. 70, p. 99-121, 2009.

NAUEN, R.; DENHOLM, I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. **Archives of Insect Biochemistry Physiology**, Hoboken, v. 58, n. 4, p. 200-215, 2005.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, Kidlington, v. 23, n. 4, p. 275-285, 2004.

OERKE, E. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

OLIVEIRA, C. F. R de.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. The trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* seeds affects negatively the development of Mediterranean flour moth *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 108, p. 74-79, 2014.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, Oxford, v. 56, p. 50-54, 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A.; Strategies to improve the insecticidal activity of cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, New York, v. 30, n. 3, p. 589-595, 2009.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brasil: An overview. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 345-355, 2014.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: Fealq, 2001, 134 p.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle Biológico: Terminologia. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p.1-16.

PENNACCHIO, F.; CACCIA, S.; DIGILIO, M. C. Host regulation and nutritional exploitation by parasitic wasps. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 6, p. 74-79, 2014.

PENNACCHIO, F.; GIORDANA, B.; RAO, R. Applications of parasitoid virus and venom research in agriculture. In: BECKAGE, N. E.; DREZEN, J-M. (Eds.) **Parasitoid Viruses Symbionts and Pathogens**, San Diego, Academic Press, 2012. p. 269-283.

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

PIMENTEL, D.; ACQUAY, H.; BILTONEN, M.; RICE, P.; SILVA, M.; NELSON, J.; LIPNER, V.; GIORDANO, S.; HOROWITZ, A.; D'AMORE, M. Environmental and economic costs of pesticide use. **Bioscience**, Oxford, v. 42, n. 10, p. 750-760, 1992.

PINHEIRO, D. O.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, O. L. A. D.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; ALMEIDA, E.; CÔNSOLI, F. L. Inorganic elements in the fat bodies of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology**, New York, v. 156, n. 4, p. 273-278, 2010.

QUICKE, D. L. J. Overcoming host immune reaction and physiological interactions with host. In: _____ (Ed.) **The Braconid and Ichneumonid parasitoid wasps: biology, systematics, evolution and ecology**. Chichester West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2015. p. 138-162.

QUILIS, J.; LÓPEZ-GARCÍA, B.; MEYNARD, D.; GUIDERDONI, E.; SEGUNDO, B. S. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, Hoboken, v. 12, p. 367-337, 2014.

RAI, S., AGGARWAL, K. K., MITRA, B., DAS, T. K., BABU, C. R. Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Peptides**, New York, v. 31, n. 3, p. 474-481, 2010.

RAO, M. B.; TANKSAALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAU, J. C.; BEAULIEU, L. M.; HUNTINGTON, J. A.; CHURCH, F. C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Hoboken, v. 5, n. 1, p. 102-115, 2007.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, London, v. 378, p. 705-716, 2004a.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. 160-164, 2004b.

RAY, C. A.; BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; GREENSTREET, T. A.; SLEATH, P. R.; SALVESEN, G. S.; PICKUP, D. J. Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. **Cell**, Cambridge, v. 69, n. 4, p. 597-604, 1992.

ROSSI, G. D. **Explorando as interações hospedeiro-parasitoide para a identificação de moléculas com potencial biotecnológico**. 2012. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências-Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

ROSSI, G. D.; SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F. L. The parasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), influences food consumption and utilization by larval *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 87, n. 2, p. 85-94, 2014.

RUAN, J.; YAN, J.; CHEN, H.; JIANPING, C.; SUN, W.; ZHAO, G. Purification and properties of the chymotrypsin inhibitor from wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) of Israel and its toxic effect on beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 142, p. 141-147, 2017.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344p.

SCAGLIA, M.; CHAUD-NETTO, J.; ROCHETTO-BRAGA, M. R.; CEREGATO, S. A.; GOBBI, N., RODRIGUES, A. Oviposition sequence and offspring of mated and virgin females of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Diatraea saccharalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, London, v. 11, n. 3, p. 283-298, 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Hoboken, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 591-611, 1965.

SHAW, M. Parasitoid host ranges. In: Hawkins, B. A.; Sheehan, W. (Eds.). **Parasitoid Community Ecology**. Oxford: Oxford University Press, 1994. p. 111-114.

SHAW, M. R.; QUICKE, D. L. J. The biology and early stages of *Acamptis alternipes* (Nees), with comments on the relationships of the Sigalphinae (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Natural History**, Abingdon, v. 34, p. 611-628, 2000.

SHELBY, K. S.; CUI, L.; WEBB, B. A. Polydnavirus-mediated inhibition of lysozyme gene expression and the antibacterial response. **Insect Molecular Biology**, Hoboken, v. 7 n. 3, p. 265-272, 1998.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteinases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, London, v. 11, p. 132-154, 2006.

STATSOFT, INC. 2004. **Statistica** (data analysis software system), version 7. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em 14 dez. 2016.

STRAND, M. R. Teratocytes and their functions in parasitoids. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 6, p. 68-73, 2014.

STRAND, M. R.; BURKE, G. R. Polydnavirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function. **Current Opinion in Virology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 587-594, 2013.

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

STRAND, M. R.; WONG, E. A. The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 37, n. 7, p. 503-515, 1991.

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

TABASHNIK, E. B.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.

TABASHNIK, E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 7-79. 1994.

TAKAHASHI, D.; DAI, H.; HIROMASA, Y.; KRISHNAMOORTHY, R.; KANOST, M. R. Self-association of an insect β -1,3-glucan recognition protein upon binding laminarin stimulates prophenoloxidase activation as an innate immune response. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 289, n. 41, p. 28399-28410, 2014.

TAKAHASHI, D.; GARCIA, B. L.; KANOST, M. R. Initiating protease with modular domains interacts with β -glucan recognition protein to trigger innate immune response in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 112, n. 45, p. 13856-13861, 2015.

TANAKA, K.; MATSUMOTO, H.; HAYAKAWA, Y. Detailed characterization of polydnavirus immunoevasive proteins in an endoparasitoid wasp. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 269, n. 10, p. 2557-2566, 2002.

TANG, H.; KAMBRIS, Z.; LEMAITRE, B.; HASHIMOTO, C. A Serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 617-626, 2008.

TENG, Z. W.; XU, G.; GAN, S. Y.; CHEN, X.; FANG, Q.; YE, G. Y. Effects of the endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae) parasitism, venom, and calyx fluid on cellular and humoral immunity of its host *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 85, p. 46-56, 2016.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: GILBERT, L. I.; LATROU, K.; GILL, S. S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, Oxford, 2005. p. 171-224.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B: Comparative Biochemistry**, New York, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

THOMAS, J. C.; ADAMS, D. G.; KEPPE, V. D.; WASMANN, C. C.; BROWN, J. K.; KANOST, M. R.; BOHNERT, H. J. Proteinase inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, n. 12, p. 758-762, 1995.

TORRES, J. B.; RODRIGUES, A. R. S.; BARROS, E. M.; SANTOS, D. S. Lambda-cyhalothrin resistance in the lady beetle *Eriopis conexa* (Coleoptera: Coccinellidae) confers tolerance to other pyrethroids. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 108, n. 1, p. 60-68, 2015.

TOWBIN, H.; STAEHETIN, A.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J.; VET, L. E. M. How parasitic wasps find their hosts. **Scientific American**, New York, v. 268, p. 100-106, 1993.

VINSON, S. B.; PENNACCHIO, F.; CÔNSOLI, F. L. The parasitoid-host interaction from a nutritional perspective. In: Edwards, J. P.; Weaver, R. J. (Eds.). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Oxford Bios Scientific, 2001. p. 187-205.

VINSON, S. B.; SCOTT, J. R. Ultrastructure of teratocytes of *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Kidlington, v. 3, p. 293-304, 1974.

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

WANG, Y.; JIANG, H. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: A serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 34, n. 4, p. 387-395, 2004.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, London, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WEBB, B. A.; BECKAGE, N. E.; HAYAKAWA, Y.; KRELL, P. J.; LANZREIN, B.; STOLTZ, D. B.; STRAND, M. R.; SUMMERS, M. D. Polydnviridae. In: Van, R. M. H.; Fauquet, M. V. C.; Bishop, D. H. L.; Carstens, E. B.; Estes, M. K.; Lemon, S. M.; Maniloff, J.; Mayo, M. A.; Mcgeoch, D. J.; Pringle, C. R.; Wickner, R. B. (Eds.). **Virus taxonomy: seventh report of the international committee on taxonomy of viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 253-260.

WEBB, B. A.; STRAND, M. R. The biology and genomics of polydnviruses. In: Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. San Diego: Elsevier, 2005. p. 323-360.

WEI, L.; PEREZ-RODRIGUEZ, M. A.; RODRIGUEZ-PEREZ, M. A. Effect of recombinant baculovirus expressing CrV1 protein from *Cotesia rubecula* bracovirus against *Pieris rapae* in insecticidal toxicity. **Entomological Research**, Hoboken, v. 46, n. 3, p. 179-184, 2016.

WHITFIELD, J. B. Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera. **Advances in parasitology**, San Diego, v. 54, p. 69-100, 2003.

YAN, Z.; FANG, Q.; LIU, Y.; XIAO, S.; YANG, L.; WANG, F.; AN, C.; WERREN, J. H.; YE, G. A Venom serpin splicing isoform of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* suppresses host prophenoloxidase cascade by forming complexes with host hemolymph proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 292, n. 3, p. 1038-1051, 2017.

YAN, Z.; FANG, Q.; WANG, L.; LIU, J.; ZHU, Y.; WANG, F.; LI, F.; WERREN, J. H.; YE, G. Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses. **Scientific Reports**, London, v. 6:19604, 2016.

YEH, K. W.; LIN, M. I.; TUAN, S. J.; CHEN, Y. M.; LIN, C. Y.; KAO, S. S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 696-699, 1997.

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

ZHANG, D.; DAHLMAN, D. L.; GELMAN, D. B. Juvenile hormone esterase activity and ecdysteroid titer in *Heliothis virescens* larvae injected with *Microplitis croceipes* teratocytes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 20, n. 3, p. 231-242, 1992.

APÊNDICE

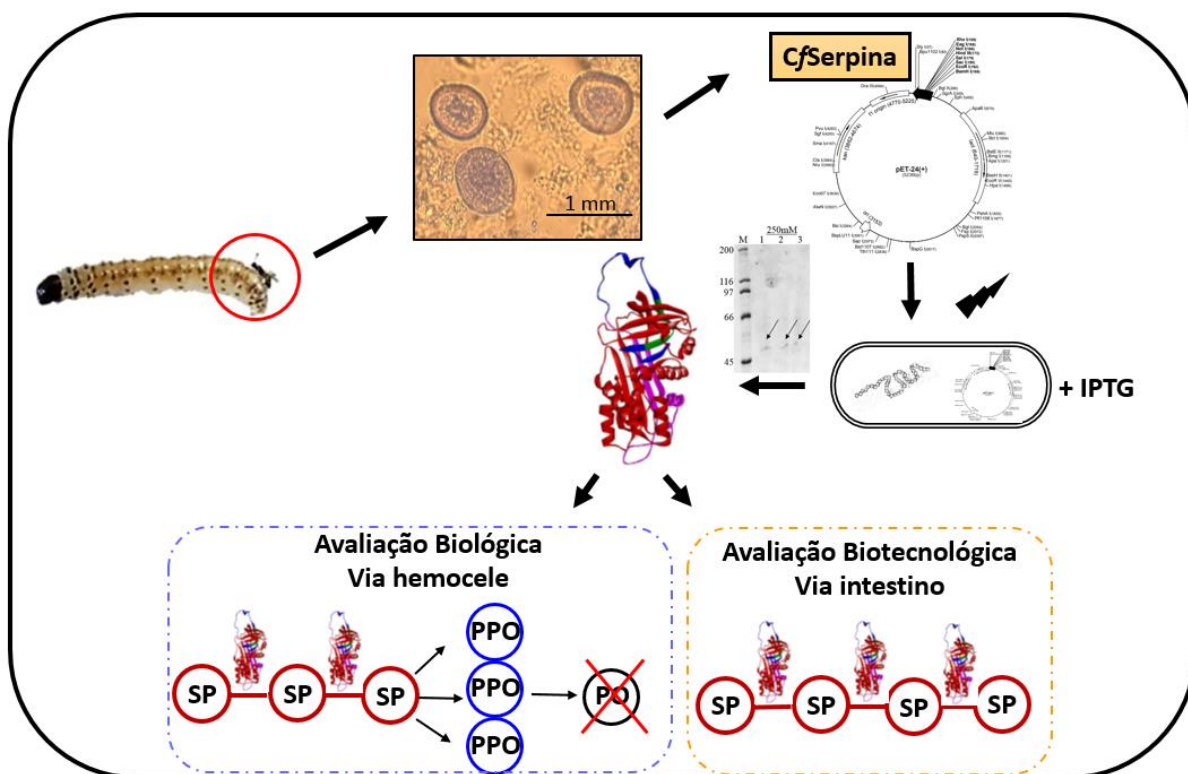


Figura 8: Resumo gráfico da avaliação biológica e biotecnológica da CfSerpina.