

EFEITO ANTIGONADOTRÓPICO DA ECDISONA E SUA INIBIÇÃO
PELO HORMÔNIO JUVENIL EM FÊMEAS DE *Rhodnius proli-*
xus Stal, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE)

T e s e

Apresentada à Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro para obtenção do grau de
"Magister Scientiae"

MARIA LUIZA MAUÉS GARCIA

Agosto 1979

À Ana Luiza

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária -Parasitologia Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal Fluminense através do PICD-CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

Ao CNPq pelos recursos proporcionados ao laboratório de Fisiologia de Insetos, propiciando a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Fernando Braga Ubatuba, por me haver iniciado no caminho da investigação científica.

Ao Prof. Eloi de Souza Garcia, do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal Fluminense, pela orientação precisa e constante desafio.

Ao Prof. Rubens Pinto de Mello, do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela orientação, estímulo e sugestões sempre oportunas.

Ao Prof. Gonzalo Efrain Moya y Borja, do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela orientação e críticas.

Ao Prof. Mário Ulisses Vianna Dias, Chefe do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal Fluminense, por todo apoio dado desde o meu ingresso nesta Universidade.

Ao Prof. Pedro Domingues Lanzieri, do Departamento

de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela participação através do desenvolvimento das técnicas histológicas, sugestões e críticas.

Ao Prof. Jorge de Paula Guimarães, do Departamento de Morfologia, Universidade Federal Fluminense, pelas sugestões e entusiasmo contagiante.

Ao Prof. José Jurberg, por haver gentilmente cedido insetos da colônia do Instituto Oswaldo Cruz, que muito contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Quero deixar também os meus agradecimentos aos senhores:

Waldir Jacintho da Silva, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela amizade e ajuda que me dispensei durante todo o curso;

Francisco Gomes, da Universidade Federal Fluminense, pela revelação e cópia das fotografias;

à senhorita Diva Monteiro da Silva, secretária do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela sua solicitude e trabalho de datilografia;

e também aquelas pessoas que contribuíram de diferentes maneiras para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARIA LUIZA MAUÉS GARCIA, filha de Roberto Antônio Maués e Dulce Calino Maués, nasceu em Piraí, Estado do Rio de Janeiro, em 3 de junho de 1948. Fez o curso primário no Colégio Nossa Senhora Aparecida, em São Paulo. Curso o secundário, 1º e 2º ciclos no Colégio Fernando Costa, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em 1968 prestou Exame Vestibular para a antiga Escola Nacional de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo o curso em 1971. Durante sua vida universitária foi monitora do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, colaborando na administração de aulas práticas e Bolsista da USAFARMA, no mesmo Departamento, para realizar trabalhos de pesquisa. De 1972 a 1974, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na categoria de Aperfeiçoamento, exercendo esta atividade no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal Fluminense. Em 1974,

passou à categoria de Pesquisador B deste mesmo Conselho, tendo, neste mesmo ano, sido contratada como Auxiliar de Ensino da disciplina de Bioquímica, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal Fluminense, havendo desde o seu ingresso nesta Universidade, publicado vários trabalhos.

Í N D I C E

I .	INTRODUÇÃO	1
II .	REVISÃO DE LITERATURA	3
	1. Posição Taxonômica	3
	2. Ciclo Biológico de <i>Rhodnius prolixus</i>	3
	2.1. Oviposição e duração da embriogênese	3
	2.2. Desenvolvimento Pós-Embrionário	6
	2.3. Imago	9
	3. Controle Hormonal de <i>Rhodnius prolixus</i>	10
	3.1. Ativação das Glândulas Protorácicas	11
	3.2. Ativação do <i>corpus allatum</i>	12
	3.3. Produção do Hormônio de Ativação	12
	4. Hormônio Juvenil	13
	5. Ecdisona (Hormônio da Muda)	17
	6. Sistema Reprodutor Feminino	18
	7. Oogênese	22
III .	MATERIAL E MÉTODOS	26

1.	Estabelecimento da Colônia de <i>Rhodnius prolixus</i>	26
2.	Administração de Hormônios	27
2.1.	Administração de Ecdisona	27
2.2.	Administração de Hormônio Juvenil	28
3.	Administração de Ecdisona e Ecdisona + Hormônio Juvenil e seus Efeitos na Produção de Ovos e no Tamanho dos Oócitos	28
IV.	RESULTADOS	33
1.	Influência de Ecdisona na Oviposição e Eclodibilidade	33
2.	Influência da Ecdisona na Vitelogênese	35
2.1.	Relação dos Oócitos Terminais (T) com os Oócitos mais Próximos (T1)	35
2.2.	Efeito da Ecdisona sobre o Desenvolvimento dos Oócitos	37
3.	Influência da Ecdisona e Hormônio Juvenil na Oogênese	44
3.1.	Hormônio Juvenil e sua Ação na Reversão da Inibição da Oogênese pela Ecdisona	44
3.2.	Hormônio Juvenil e sua Ação na Reversão da Inibição da Ovipostura pela Ecdisona	45
4.	Reversão do Efeito Inibitório da Ecdisona na Ovipostura por Subseqüentes Alimentações com Sangue sem Adição do Hormônio	51
5.	Teste com Azul de Evans para Aferição da Função Ovariana	53
V.	DISCUSSÃO	57
1.	Ação da Ecdisona na Ovipostura e Eclodibilidade	57

2. Oogênese em Insetos Controle e Tratados com Ecdisona	59
3. Ação do Hormônio Juvenil no Processo de Oogênese	63
VI. CONCLUSÕES	71
VII. RESUMO	73
VIII. ABSTRACT	74
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

I. INTRODUÇÃO

O *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, principal transmissor do *Trypanosoma cruzi* na Venezuela, apresenta distribuição geográfica do Equador até o México. A sua grande importância como vetor deste protozoário, agente etiológico da doença de Chagas, endemia que afeta a mais de 10.000.000 de pessoas no Brasil (DIAS & DIAS, 1978), reside no fato de ser um inseto muito bem adaptado às residências humanas, possuindo poucos ecótopes naturais (GOMES - NUÑES, 1964).

O papel do *Rhodnius prolixus* na patologia humana foi demonstrado por BRUMPT (1913), quando obteve infecção experimental com *Trypanosoma cruzi* em ninfas e adultos criados em laboratório, sendo ainda do mesmo autor os primeiros dados conhecidos sobre a biologia desta espécie, que dada à sua domesticidade e alta prolificidade, vem sendo usada como animal experimental há muitos anos, tendo proporcionado grandes avanços no conhecimento da fisiologia de insetos (WIGGLESWORTH, 1972).

O presente trabalho teve como objetivo estudar:

1) A ação da ecdisona (hormônio da muda) em fêmeas adultas acasaladas de *Rhodnius prolixus*, enfocando os seguintes aspectos:

- a. Efetividade da ecdisona quando administrada por via oral;
- b. Desenvolvimento oocitário;
- c. Produção e eclodibilidade dos ovos.

2) Avaliação dos efeitos do hormônio juvenil quando administrado juntamente com a ecdisona.

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Insetos, no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal Fluminense e no Laboratório de Entomologia, Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. POSIÇÃO TAXONÔMICA

O *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, espécie tipo do gênero, encontra-se monografada, sob os pontos de vista morfológico e taxonômico, nos trabalhos de LENT (1948) e LENT & JURBERG (1969). Pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae.

2. CICLO BIOLÓGICO DE *Rhodnius prolixus*

O *Rhodnius prolixus*, sob o ponto de vista ontogênico, possui 3 fases: ovo, ninfa e adulto.

2.1. Oviposição e duração da embriogênese:

Vários trabalhos foram realizados sobre a postura e

duração da embriogênese em *Rhodnius prolixus* por URIBE (1927); BUXTON (1930) e GALLIARD (1935). Há uma certa variação entre os dados dos diferentes autores, pois as observações não foram feitas sob as mesmas condições de temperatura, umidade relativa, alimentação e fotoperiodismo, não podendo ser feita, assim, uma comparação entre estes resultados.

Segundo URIBE (1927), o número total de ovos varia de 200 a 300 por uma única fêmea, postos em 30 a 50 lotes, dos quais os primeiros são mais abundantes, variando de 8 a 11 ovos para cada lote.

Foi observado que o número de ciclos de oviposição, assim como o número de ovos em cada ciclo varia com o número de repastos e volume de sangue ingerido. A quantidade de alimento necessária para a produção de 1 ovo é em média de 8,2 mg (FRIEND et al., 1965).

Os ovos são operculados, com tamanho médio de 2,2 mm x 0,8 mm (URIBE, 1927). Estes aderem-se ao substrato por uma secreção da glândula acessória do aparelho genital feminino (GALLIARD, 1935) e o tempo de incubação é bastante variável: à 25°C a eclosão ocorre entre 15 a 20 dias após a postura (LARROUSSE, 1927); a 34°C entre 10 a 11 dias. A 37°C o desenvolvimento embrionário é inibido, havendo morte dos embriões, na maioria dos casos no terceiro e quarto dia após a sua postura (URIBE, 1927). Quando se mantém a temperatura a 25°C e a umidade relativa a 50-60%, o índice médio de eclosão é de 85% (GARCIA et al., 1975).

2.2. Desenvolvimento pós-embriológico:

A duração do período ninfal, que compreende 5 estádios, varia bastante com as condições a que as ninfas estão submetidas. Este período é de, no mínimo, 99 dias à 24°C, 83 dias à 28°C, 72 dias à 30°C (URIBE, 1927). A 36°C o desenvolvimento ninfal é retardado (WIGGLESWORTH, 1955a; OKASHA, 1964).

Tanto as ninfas recém nascidas quanto as recém mudadas são de coloração rósea, escurecendo gradualmente, até atingir a sua cor natural, o que ocorre dentro de 30-60 minutos (URIBE, 1927). Este escurecimento deve-se à ação de uma fenol-oxidase sobre os polifenóis que compõem a quitina (KARLSON & SCHWEIGER, 1961).

O tempo para que os insetos aceitem o alimento após a muda, varia em cada estágio bem como o período que leva para que ocorra a ecdise, aumentando à medida que os estádios vão evoluindo (Tabela 1, GARCIA et al., 1975). A quantidade de sangue ingerido também aumenta progressivamente com a evolução dos estádios ninfais (Tabela 2, GARCIA et al., 1975).

As modificações fisiológicas relacionadas com a muda são induzidas pelo repasto sanguíneo, sendo a distensão abdominal responsável pelo estímulo dos tensio-receptores presentes na parede do abdômem, que irão dar início ao ciclo hormonal relacionado com a ecdise (BECKEL & FRIEND, 1964). Insetos que não se alimentam ou que se alimentam de maneira insuficiente são incapazes de efetuar ecdise (WIGGLESWORTH, 1934, 1972).

TABELA 1. Evolução dos cinco estágios ninfais de *Rhodnius prolixus*; lotes iniciais de 300 insetos (ninfa 1) alimentados em pombos.

Estádio ninfal	Dia da alimentação	Período de muda após eclosão (dias)	Porcentagem de insetos que mudaram
1	7	16 - 19	90,7
2	26	37 - 44	95,6
3	50	62 - 74	86,6
4	79	95 - 99	75,5
5	104	120 - 124	92,8

TABELA 2. Quantidade de sangue ingerido por ninfas de *Rhodnius prolixus*; lotes alimentados em pombos*.

Estádio evolutivo	Peso médio dos insetos (mg)		Quantidade média de sangue ingerido por inseto (mg)	Aumento médio de peso (mg) x peso corporal
	antes da alim.	após alim.		
1	0,5	3,6	3,1	7,2
2	1,8	10,6	8,8	5,9
3	4,9	26,5	21,6	5,4
4	11,8	63,4	51,6	5,4
5	32,1	185,3	153,2	5,8

* Estes dados referem-se aos mesmos insetos da Tabela 1.

O comportamento alimentar, tanto das ninfas quanto dos adultos compreende duas etapas: a) A procura do hospedeiro e o mecanismo de picada. Neste caso foi demonstrado que ambos os processos são realizados devido a um termotropismo positivo, onde as antenas funcionam como órgãos termosensíveis (WIGGLESWORTH & GILLETT, 1934; NICOLLE & MATHIS, 1941).

b) A sucção de sangue, que é estimulada por fosfatos de alta energia, principalmente o ATP (Adenosina-tri-fosfato) (FRIEND & SMITH, 1971).

2.3. Imago:

A muda imaginal ou metamorfose (última muda do desenvolvimento pós-embrionário) acarreta transformações tanto do ponto de vista morfológico, quanto fisiológico, que são extremamente marcantes.

As modificações mais visíveis são caracterizadas pelo surgimento das asas, pois os insetos, nas fases anteriores são ápteros e tornam-se potencialmente maduros em termos reprodutivos. Esta maturidade, principalmente nas fêmeas, atinge o máximo após a primeira alimentação e acasalamento, quando então iniciam a fase de oviposição. As fêmeas acasaladas começam a postura em torno do oitavo dia após a alimentação, sendo 12 o número médio de ovos postos por fêmea. A quantidade média de sangue ingerida por inseto é de 120 mg (GARCIA *et al.*, 1975).

3. CONTROLE HORMONAL DE *Rhodnius prolixus*

Os hormônios mais bem conhecidos em insetos são aqueles que influenciam o desenvolvimento pós-embriônico e oogenese.

Atualmente são conhecidos três hormônios relacionados com a ecdise, que seria o processo fisiológico mais importante para o inseto, pois dele depende o seu crescimento, desenvolvimento e maturidade:

- a. O hormônio da ativação (H.A.), produzido pelas células neuro-secretoras da região medial do cérebro (CNS). Esse hormônio condiciona a reativação do organismo do inseto após cada muda e estimula a produção de outros hormônios morfogênicos.
- b. A ecdisona ou hormônio da muda (HM) é produzido pelas glândulas protorácicas (GPT). Esse hormônio condiciona o processo da muda e assim, indiretamente, o crescimento e morfogênese.
- c. O hormônio juvenil (HJ) é produzido pelo *corpus allatum* (CA), que condiciona o crescimento e manutenção das características ninfais. Esse hormônio também é o responsável pela função, dentre várias estruturas do organismo, dos folículos ovarianos de fêmeas adultas que são incapazes de se desenvolver em sua ausência.

O hormônio de ativação tem ação típica de um neuro-hormônio e os outros dois são reconhecidamente hormônios.

Existe entre eles uma interdependência, tanto com relação a sua produção, como a sua função (WIGGLESWORTH, 1972).

3.1. Ativação das glândulas protorácicas:

Os primeiros trabalhos de KOPEC (1922) e WIGGLESWORTH (1934, 1940) demonstraram a necessidade do cérebro para a muda, pupação (em insetos holometabólicos) e metamorfose. FUKUDA (1940) trabalhando com glândulas protorácicas de larvas e pupas de *Bombix mori*, demonstrou que a participação do cérebro no mecanismo da muda era indireto e que dependia da ativação das glândulas protorácicas.

Em *Rhodnius prolixus*, WIGGLESWORTH (1952) demonstrou a existência de um "fator de ativação", produzido pelas células neuro-secretoras do cérebro e um "fator de muda", produzido pela glândula protorácica.

De acordo com RAABE (1959), a maneira pela qual as glândulas protorácicas são ativadas pelo cérebro, através do hormônio de ativação, ainda não está suficientemente esclarecido. Uma possível explicação foi sugerida por WIGGLESWORTH (1952) que considera que esteja relacionado diretamente com a síntese de hormônio da muda. Achados de THOMSEN & MOLLER (1963) sobre a influência do hormônio de ativação na atividade proteásica intestinal em *Calliphora erythrocephala* sugerem uma ação muito mais geral. Para o caso específico do *Rhodnius prolixus* parece que o hormônio de ativação não tem um papel no mecanismo da produção de protease intestinal, sendo esta dependente

de um mecanismo do tipo secretagogo, estimulado por proteínas ingeridas com a alimentação (GARCIA *et al.*, 1975; GARCIA e GARCIA, 1977). Por outro lado, observações experimentais sugerem que os hemócitos, particularmente os amebócitos, são necessários para o funcionamento normal das glândulas protorácicas, pois são eles os carreadores da ecdisona (WIGGLESWORTH, 1955a, 1956).

3.2. Ativação do *corpus allatum*:

O efeito do hormônio de ativação na função do *Corpus allatum* ainda não está claramente demonstrado. Este hormônio parece ser necessário para a reativação do *corpus allatum* de maneira semelhante à que ocorre as glândulas protorácicas (NOVAK, 1975). JOHANSSON (1958) observou que uma completa extirpação das células tipo A, do cérebro, resultava na diminuição do volume do *corpus allatum*. BAKER (1973) demonstrou que o entendimento do mecanismo de ativação destas glândulas torna-se difícil por duas razões: a) A ação do *corpus allatum* parece depender de estímulo nervoso direto; b) O hormônio de ativação atinge o *corpus allatum* não somente através da hemolinfa, mas também diretamente do cérebro, em forma de grânulos, via nervos dos *corpora cardiaca* (CC) e nervos *allatum*.

3.3. Produção do hormônio de ativação:

No momento sabe-se que a produção do hormônio de ativação, em *Rhodnius prolixus*, é desencadeada pela alimentação.

É sabido que este inseto ingere, somente de uma vez, grandes quantidades de sangue, fazendo com que a parede abdominal seja distendida. Os receptores existentes nesta parede são estimulados pela distensão e via cordão nervoso estimulam as células neuro-secretoras mediais do cérebro, durante um certo período após a alimentação. Estas células neuro-secretoras secretam o hormônio de ativação que, via *corpora cardíaca* é liberado na hemolinfa e vai estimular os tecidos alvo (WIGGLESWORTH, 1972). Sua presença é necessária por 3 a 7 dias após a dilatação do abdômem, para assegurar o seu efeito, sendo este espaço de tempo conhecido como período crítico. A remoção do cérebro durante este período provoca a falha da ecdise, porém a decaptação após esta época não a inibe (WIGGLESWORTH, 1972). Provavelmente, quando outros estudos forem realizados, novos processos de produção do hormônio de ativação serão conhecidos e então alguns mecanismos de secreção deste hormônio poderão ficar suficientemente esclarecidos. A figura 1 mostra esquematicamente os principais aspectos relacionados com o controle hormonal discutido anteriormente.

4. HORMÔNIO JUVENIL

O fator inibidor da metamorfose, um isoprenóide produzido pelo *corpus allatum* foi inicialmente demonstrado por WIGGLESWORTH (1935) em suas clássicas experiências com *Rhodnius prolixus*, além de ter sido o primeiro a demonstrar sua atividade glandular endócrina. O termo original "hormônio ini-

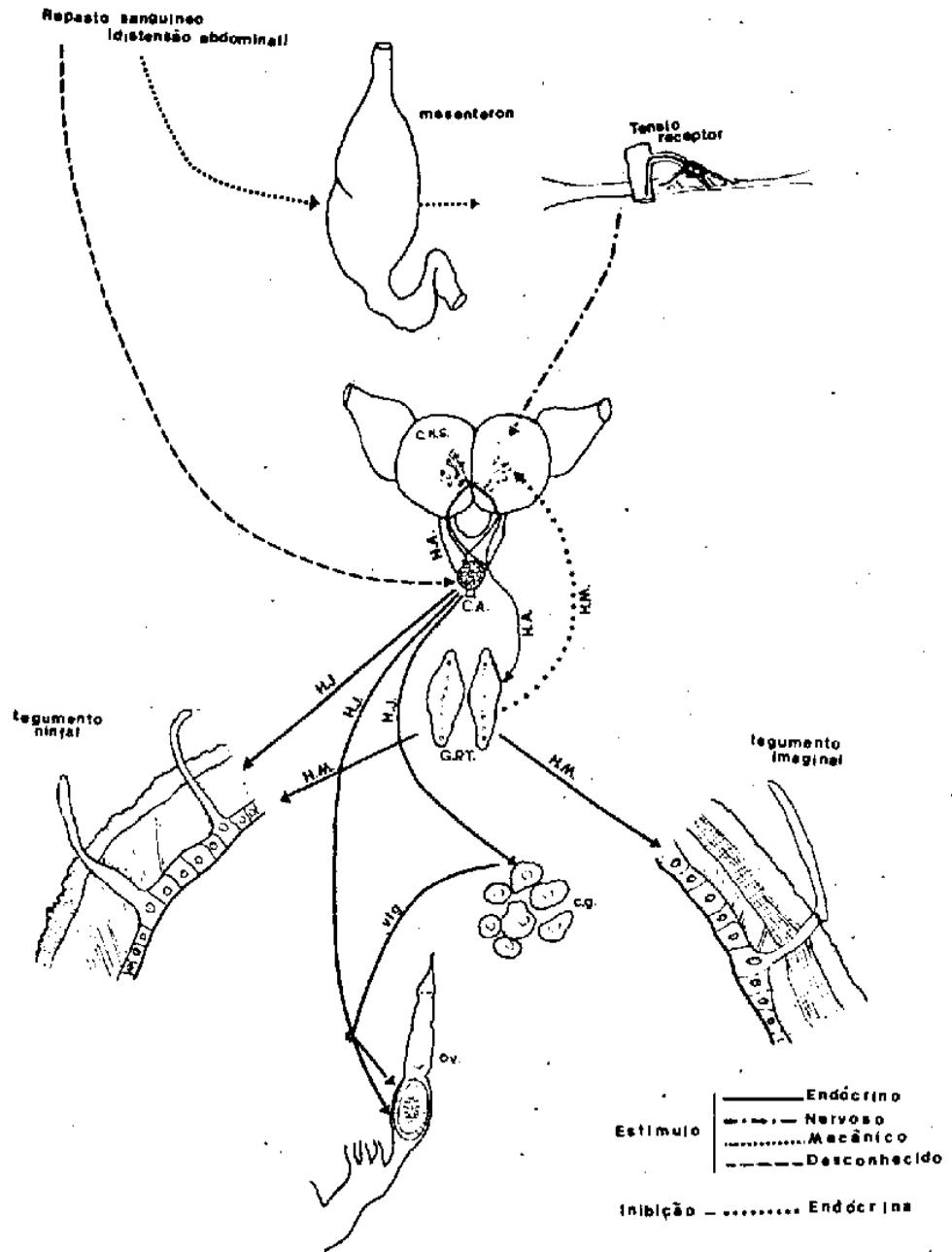


Figura 1. Esquema dos fatores estimulantes e inibitórios em *Rhodnius prolixus*, dando enfoque aos eventos hormonais relacionados com a oogênese e ecdise.

CNS - células neuro-secretoras; HA - Hormônio de ativação;
 HM - hormônio da muda; CA - *Corpus allatum*;
 HJ - Hormônio Juvenil; G.P.T. - Glândulas protorácicas;
 vtg - vitelogenina; Cg - corpo gorduroso; ov - ovaríolo.
 (Adaptado de vários autores).

bidor" foi posteriormente alterado para hormônio juvenil, após o reconhecimento de sua importância na produção e manutenção das características ninfais (WIGGLESWORTH, 1940). Na mesma época, WIGGLESWORTH (1956) também descobriu o efeito do hormônio dos *corpora allata* no desenvolvimento ovariano.

Os efeitos mais comuns deste hormônio, além da inibição da metamorfose, são sobre o crescimento e morfogênese dos órgãos internos, vários tipos de polimorfismo e na regeneração (WIGGLESWORTH, 1972). Além dos efeitos descritos anteriormente, foram atribuídos ao hormônio juvenil ou a seus análogos estruturais, outras funções no organismo do inseto; a maioria dos processos fisiológicos, estruturais e bioquímicos parece depender do hormônio juvenil (NOVAK, 1975).

Especial atenção será dada à influência do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento de oócitos nos ovários o que foi verificado inicialmente por WIGGLESWORTH (1936). Este autor demonstrou que o *corpus allatum* é absolutamente indispensável para o amadurecimento dos oócitos em *Rhodnius prolixus*, após um certo estágio de desenvolvimento, quando as células foliculares tornam-se ativas. Se o hormônio for suprimido no momento em que o folículo ovariano diferenciado estiver apto à receber vitelogenina, a sua maturação é interrompida, o oócito degenera, as células foliculares proliferam de maneira desorganizada, invadem e absorvem o oócito morto (WIGGLESWORTH, 1936, 1972).

A atividade endócrina do hormônio juvenil relacionada

com a oogênese se processa em duas fases: morfogênese das gônadas e vitelogênese.

A oogênese em fêmeas adultas consiste no desenvolvimento dos oócitos e diferenciação dos folículos ovarianos, sendo um fato bem conhecido que ela ocorre somente na ausência do hormônio juvenil. Contudo a deposição da vitelogenina (vitelogênese) nos oócitos, depende da ação daquele hormônio (NOVAK, 1975).

A ação do hormônio juvenil traduz-se pelo aumento dos espaços intercelulares do epitélio folicular que circundam os oócitos, permitindo a passagem de vitelogenina da hemolinfa para o oócito (PRATT & DAVEY, 1972).

O papel fundamental do hormônio juvenil na oogênese é dependente de outros fatores. Foi demonstrado por BUXTON (1930), FRIEND *et al.*, (1965), que a quantidade de oócitos maduros e de ovos depositados pela fêmea dependem primordialmente da quantidade de alimento ingerido, digerido e absorvido pelo inseto.

O hormônio juvenil é necessário para o funcionamento das glândulas acessórias em machos de *Rhodnius prolixus* (WIGGLESWORTH, 1936). Desde então sabe-se que há dependência das glândulas acessórias com relação ao hormônio juvenil em algumas espécies, tanto nos machos como nas fêmeas (NOVAK, 1975).

5. ECDISONA (HORMÔNIO DA MUDA)

Inicialmente pensava-se que a muda fosse desencadeada por algum fator hormonal proveniente do cérebro (KOPEC, 1922). A ecdisona era confundida então com o hormônio de ativação.

Hoje já está esclarecido este equívoco e sabe-se que as glândulas protorácicas, estimuladas pelo hormônio de ativação, possuem ciclos de atividade secretora mostrando um aumento de volume durante essa fase (WIGGLESWORTH, 1955). As observações citológicas (aumento de volume nuclear e citoplasmático) e experimentais (resultados obtidos através de transplantes ou parabioses) mostram que as glândulas protorácicas são mais ativas após o período crítico (WIGGLESWORTH, 1952, 1972; STEEL, 1975). A ecdisona parece ser secretada em ciclos, como foi demonstrado em *Panstrogylus megistus* (FURTADO *et al.*, 1976). Este ciclo é repetido à cada muda até o inseto tornar-se adulto; então, as células das glândulas protorácicas degeneram e desaparecem, tornando-se assim o inseto incapaz de mudar novamente (WIGGLESWORTH, 1955b).

A ecdisona, um composto de natureza esteróide, provavelmente derivado do colesterol, tem seus principais efeitos sobre a diapausa (NOVAK, 1975).

Este hormônio inicia as alterações na epiderme que levará a renovação e deposição de nova cutícula. Embora esteja relacionado com a muda, a ecdisona pode ser responsável, quando presente em pequenas quantidades, por alterações es-

truturais e funcionais nos testículos e ovários precedendo à muda em certas espécies de insetos (WIGGLESWORTH, 1972; NOVAK, 1975).

Recentemente, foi demonstrado em *Aedes aegypti* que o desenvolvimento de ovos (SPIELMAN et al., 1971) bem como a indução da síntese de vitelogenina (FALLON et al., 1974) podem ser desencadeados pela ecdisona.

6. SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

Em *Rhodnius prolixus* o sistema reprodutor feminino é constituído de um par de ovários, cada um formado por 7 ovariólos do tipo telotrófico, conectando-se cada ovário com um oviduto lateral. Estes ovidutos se unem para formar um oviduto mediano, abrindo-se posteriormente na vagina (*bursa copulatrix*). Nesta região abrem-se dorsalmente as espermatecas constituída por um fino duto, onde são armazenados os espermatozóides (Figura 2). A glândula acessória abre-se na porção distal da vagina, sendo freqüentemente chamada de glândula coletérica, pelo fato de produzir um cimento adesivo para fixação dos ovos do substrato (WIGGLESWORTH, 1972).

O ovariolo (Figura 3), a unidade funcional do ovário, está suspenso no hemocele por um longo filamento terminal. Posterior a este filamento existe o *germarium* contendo os trofócitos (células nutritivas); seguindo a esta região, existe o *vitellarium* que contém o tecido pré-folicular, o te-

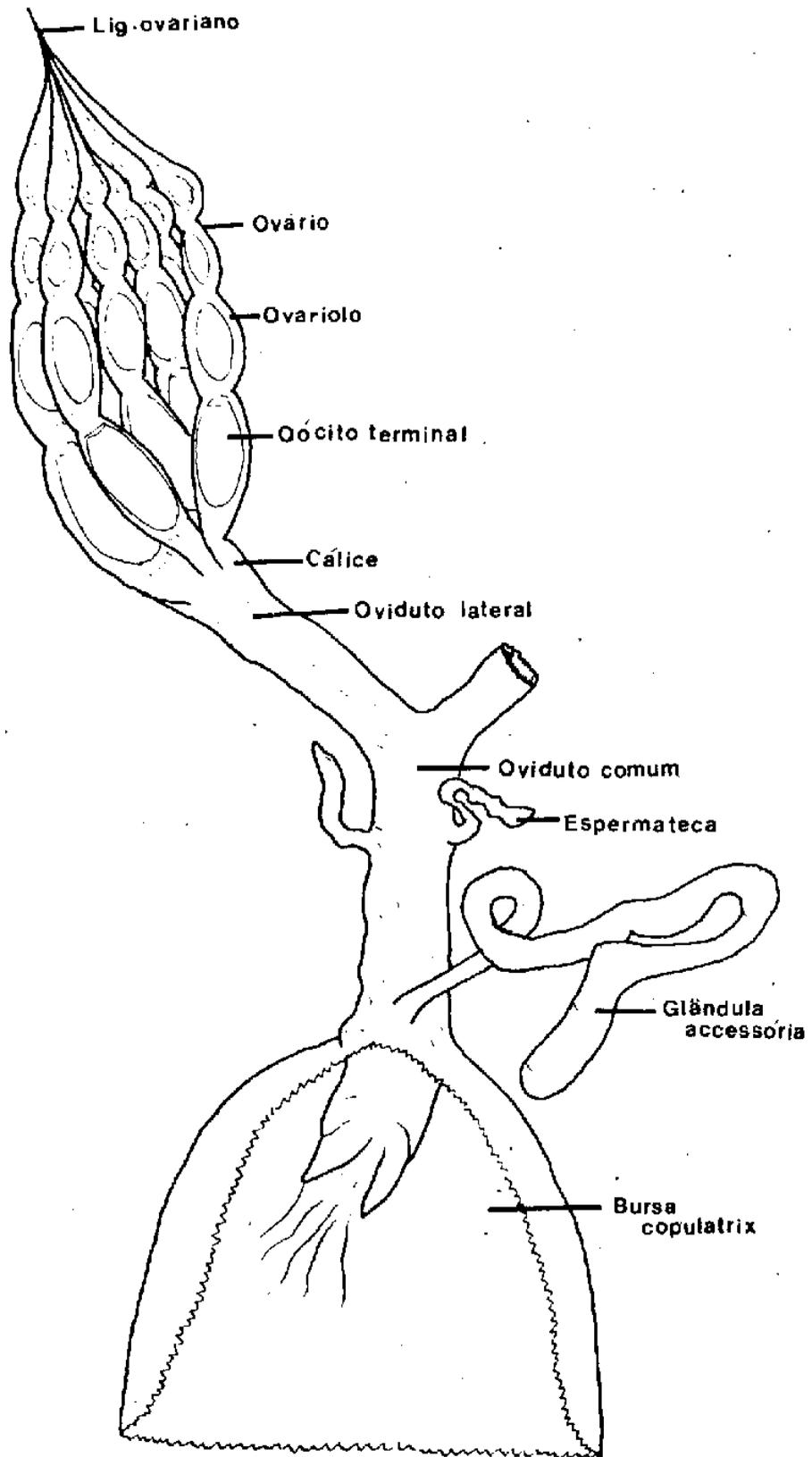


Figura 2. Diagrama do aparelho reprodutor feminino de *Rhodnius prolixus*.
Adaptação de DAVEY (1965).

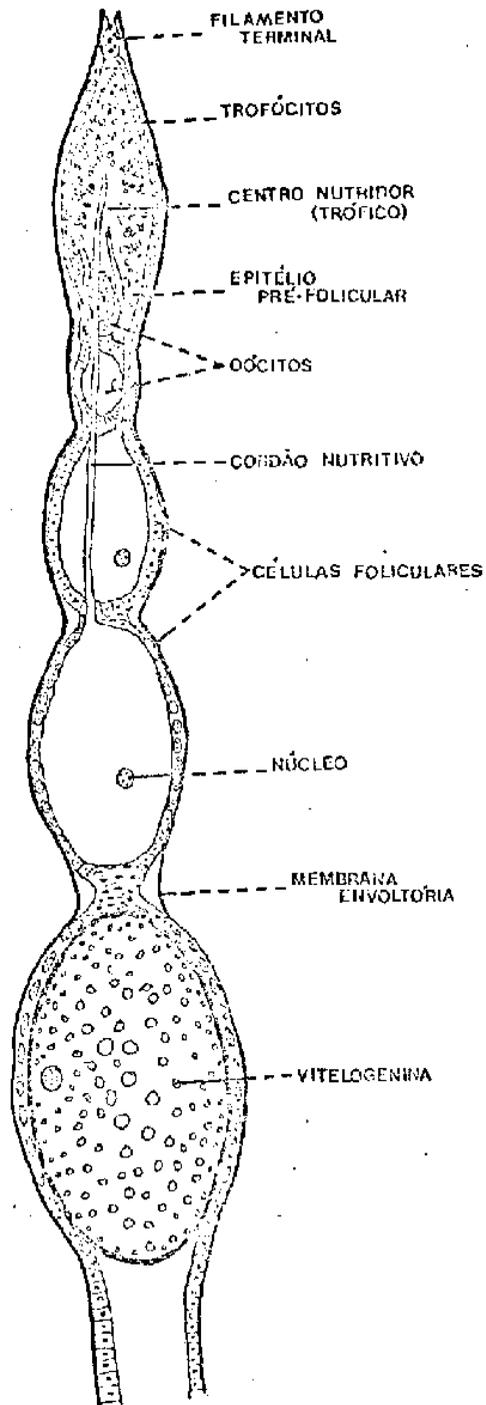


Figura 3. Esquema de um ovaríolo do tipo telotrófico, mostrando suas principais estruturas.
Adaptação de DAVEY (1965)

cido folicular e os oócitos em desenvolvimento (WIGGLESWORTH, 1972).

Funcionalmente, no *germarium* a atividade mitótica dá origem aos oócitos, que entram no *vitelarium*, junto com as suas células foliculares. Ao longo deste, os oócitos crescem como resultado da deposição da gema (vitelogênese). Na parte posterior (terminal) o oócito maduro entra no pedicelo do ovaríolo e penetra no oviduto lateral (DAVEY, 1965).

De acordo com o tipo de ovaríolo depende a maneira como se processa a vitelogênese. Em Hemiptera os ovários são do tipo telotrófico, que possuem grandes células nutritivas, importantes na produção da gema (HUEBNER & ANDERSON, 1972a). Neste tipo de ovário, a parte anterior do *germarium* contém células indiferenciadas em processo de proliferação. Segue-se, imediatamente, zonas onde as mitoses estão ausentes, os limites celulares desaparecem, os núcleos se fundem, havendo um progressivo aumento do tamanho do núcleo (HUEBNER & ANDERSON, 1972a). No final do *germarium*, os núcleos tróficos situam-se em torno de um ponto central conhecido como centro nutritivo. Neste centro há um contínuo movimento destes núcleos gigantes que posteriormente são desintegrados (HUEBNER & ANDERSON, 1972a). Os núcleos que sofrem este processo são substituídos por outros, através de mitoses que ocorrem na parte anterior do *germarium*, seguido pela fusão do núcleo, repetindo-se continuamente o processo.

Os cordões nutritivos, estendem-se desde o centro

nutritivo até ao oócito em desenvolvimento; cada um destes cordões permanece ligado ao oócito correspondente, durante o seu desenvolvimento (HUEBNER & ANDERSON, 1972b).

7. OOGÊNESE

Os oócitos são originados pela oogonia em discos de células germinativas, logo após ao centro trófico. Os oócitos jovens, produzidos por atividade mitótica da oogonia começam a ser circundados por tecido pré-folicular, que é bastante abundante perto do final posterior do *germarium* (HUEBNER & ANDERSON, 1972b). Estes oócitos que estão ligados ao centro trófico pelo cordão nutritivo, penetram no *vitellarium*, onde ocorre a vitelogênese (HUEBNER & ANDERSON, 1972b).

Cada um dos ovaríolos de *Rhodnius prolixus* pode conter oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (PATCHIN & DAVEY, 1968).

Os oócitos, no *vitellarium*, segundo classificação de PRATT & DAVEY (1972), são em número de 4, separados basicamente por seu tamanho e características das células foliculares que os cercam. Os oócitos T3 (oócito terminal 3) são os mais jovens e estão cercados por tecido pré-folicular. Imediatamente abaixo da região pré-folicular ocorre T2 que é ligeiramente maior. A seguir vem o oócito T1 o qual já se encontra em vitelogênese. O oócito seguinte, T (terminal), o mais desenvolvido encontra-se em máxima atividade vitelogênica.

Os oócitos T e T1 aumentam rapidamente de tamanho. Finalmente, quando o oócito T está completamente desenvolvido as células foliculares produzem o córion (PATCHIN & DAVEY, 1968), passando então o T à fase de oócito maduro.

Existem dois mecanismos possíveis para a transferência de vitelogenina em *Rhodnius prolixus*: a) Via centro nutritivo e cordão nutritivo nos oócitos T3 e T2; b) Via epitélio folicular nos oócitos T1 e T (PATCHIN & DAVEY, 1968). Estes dois processos podem também ocorrer simultaneamente. A transferência de proteína (vitelogenina) da hemolinfa para o oócito, via epitélio folicular é chamada de vitelogênese. Em oócitos que não entraram em vitelogênese, nenhum espaço intercelular, na camada folicular é evidenciado, enquanto o folículo em vitelogênese ativa apresenta abundantes espaços intercelulares (PRATT & DAVEY, 1972; DAVEY & HUEBNER, 1974).

Existe dentro do ovaríolo uma coordenação de crescimento dos oócitos, sendo quase impossível haver mais de um oócito em vitelogênese ativa em cada ovaríolo. O oócito T1 entra em vitelogênese, apenas, quando o T começa a ser envolvido pelo corion (PRATT & DAVEY, 1972). Uma coordenação no desenvolvimento ocorre também entre os oócitos T1 e T2 (PRATT & DAVEY, 1972).

8. CONTROLE ENDÓCRINO DA VITELOGÊNESE

O crescimento dos oócitos possui duas etapas: uma fase de pequeno crescimento (folículos T2 e T3) e uma fase de

grande crescimento (folículos T1 e T), as quais estão reguladas segundo um controle endócrino. Como vimos anteriormente, o *corpus allatum* de fêmeas adultas sofrem importantes modificações de tamanho e forma, durante o ciclo de reprodução e em insetos privados de *corpus allatum* a vitelogênese não corre (WIGGLESWORTH, 1936, 1948). Trabalhos de VANDENBERG (1963) confirmam a importância do hormônio juvenil sobre a vitelogênese.

A ação deste hormônio sobre o processo vitelogênico ocorre de duas maneiras:

- a) Ação do hormônio juvenil sobre a síntese de vitelogeninas. As vitelogeninas são de origem extra-ovariana; elas são sintetizadas pelo corpo gorduroso e circulam na hemolinfa. O teor de vitelogeninas não é modificado durante a vitelogênese, mas encontra-se aumentado após ovariectomia. Quando o *corpus allatum* é removido, as vitelogeninas tornam-se pouco concentradas na hemolinfa e ficam ausentes no corpo gorduroso (COLES, 1965). Em insetos que sofreram ablação do *corpus allatum*, a síntese de RNA é significativamente diminuída nos ovários (VANDENBERG, 1963), e a taxa de vitelogenina na hemolinfa decresce de $4,79 \pm 0,38$ mg/ml em fêmeas normais, para $2,71 \pm 0,64$ mg/ml em fêmeas privadas de *corpus allatum* (PRATT & DAVEY, 1972). Apesar de ser fato bem conhecido que a alatectomia previne a vitelogênese (WIGGLESWORTH, 1936, 1972), dados ligeiramente contraditórios, entretanto, foram mostrados pelo grupo de DAVEY. Este grupo demons-

trou que a remoção do *corpus allatum* não previne totalmente a maturação de ovos nos ovários (DAVEY, 1967; PATCHIN & DAVEY, 1968; PRATT & DAVEY, 1972).

- b) Ação do hormônio juvenil sobre o epitélio folicular. A allatectomia provoca um acúmulo de oócitos na fase final da pré-vitelogênese (WIGGLESWORTH, 1936; PRATT & DAVEY, 1972). No entanto, a inibição da vitelogênese não é consequência de um bloqueio da fase pré-vitelogênica (PRATT & DAVEY, 1972). O hormônio juvenil aumenta "in vivo" e "in vitro" os espaços intercelulares do epitélio folicular, permitindo a passagem da vitelogenina para o oócito, propiciando assim a vitelogênese. Na ausência deste hormônio, estes espaços não estão aumentados, havendo assim o bloqueio na fase de vitelogênese (DAVEY & HUEBNER, 1974; PRATT & DAVEY, 1972).

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE *Rhodnius prolixus*

No desenvolvimento deste trabalho foram usados insetos, machos e fêmeas, adultos de *Rhodnius prolixus*, provenientes da colônia criada e mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos, Departamento de Fisiologia da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Estado do Rio. Essa colônia está sob os cuidados do grupo há quatorze anos, tendo os primeiros exemplares sido gentilmente cedidos pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

A sua manutenção foi feita segundo condições previamente descritas por GARCIA *et al.* (1975) e GARCIA & GARCIA (1977), segundo os quais os insetos eram mantidos em lotes de 150 a 250 exemplares, numa sala de criação com umidade relativa de 50-60% e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A alimentação foi feita através de um sistema artificial descrito por GARCIA *et al.* (1975). Neste sistema, sangue hu-

mano heparinado era contido no aparelho por uma membrana de látex, através da qual se alimentaram.

Os insetos utilizados nos experimentos eram separados ao acaso, logo após as ninfas mudarem para o estágio adulto (muda imaginal) (antes que ocorresse a cópula) e mantidos isolados por sexo. Esses insetos permaneciam em jejum por um período de 20 dias, quando então eram alimentados, ocorrendo a alimentação no 20º dia após a metamorfose. Logo após terem sido alimentados, eram colocados juntos, fêmeas e machos numa proporção de 1:1, para que ocorresse o acasalamento.

2. ADMINISTRAÇÃO DE HORMÔNIOS

Os insetos que participaram da experiência receberam dois diferentes hormônios: Ecdisona e Hormônio Juvenil.

2.1. Administração da Ecdisona:

Para a administração da Ecdisona (*Simes, Milão*) procedeu-se à preparação de uma solução concentrada deste hormônio dissolvendo-o em etanol - NaCl 0,15 M (1:4) de maneira a dar uma concentração final de 1 mg/ml. Aliquotas desta solução eram misturadas ao sangue alimentar (humano heparinado contendo 10 U heparina/ml de sangue, sendo a heparina proveniente da *Sigma Chemical Company*), de modo a ter-se uma concentração final de 0,2 a 1,5 µg de ecdisona/ml de sangue, de tal maneira que tivéssemos lotes que recebessem as seguintes doses: 1 ng de

ecdisona/mg de peso corporal do inseto, 4 ng/mg inseto e 8 ng/mg inseto.

Insetos que ingeriram de 180 a 200 mg de sangue eram utilizados nas experiências. Aqueles que ingeriram níveis inferiores ou superiores àquela quantidade de alimento estipulada para que pertencessem ao lote experimental, foram descartados da experiência.

2.2. Administração de Hormônio Juvenil:

Quanto ao hormônio juvenil (epoxigeraniol metil ester), cedido pelo Dr. B. Gilbert da U.F.R.J., era diluído diretamente em heptana (da *Matheson Coleman & Bell*). Imediatamente após a alimentação e pesagem, 5 microlitros da solução, contendo 0,1 µg do hormônio, eram aplicados topicamente nos esternitos abdominais das fêmeas, usando para isto uma microseringa (da *Hamilton Company*).

Os lotes de insetos tratados, eram sempre comparados a um lote controle que não recebia hormônio algum, sendo alimentados com o mesmo tipo de sangue e selecionados dentro do mesmo critério, com relação ao volume de sangue ingerido. Este controle era o mesmo utilizado para os lotes tratados com ecdisona.

3. ADMINISTRAÇÃO DA ECDISONA E ECDISONA + HORMÔNIO JUVENIL E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO DE OVOS E NO TAMANHO DOS OÓCITOS

Aqui serão enfocados os métodos utilizados para afe-

rição da produção de ovos e mensuração dos oócitos.

- a. Produção de ovos - Após a alimentação e/ou tratamento e acasalamento, o número de ovos era computado diariamente em cada lote; estes ovos eram guardados para que se fizesse a estimativa da fertilidade.
- b. Mensuração dos oócitos - O estudo do crescimento oocitário era feito em insetos provenientes dos lotes experimentais, em dias pré-estabelecidos conforme o planejamento de cada experimento. Fêmeas anestesiadas com CO₂ tinham o conexivo cortado tangencialmente e, os tergitos abdominais levantados e removidos, ficando à mostra toda a cavidade abdominal. Os ovários eram então removidos, e imediatamente colocados em lâmina com uma gota de solução de NaCl 0,15 M e logo após à dissecação e remoção da membrana envoltória dos ovariolos, os oócitos foram medidos. Estas etapas se processaram com auxílio de microscópio estereoscópico Wild M5.

Estas medidas foram realizadas usando microscópio óptico Wild M11, dotado de uma ocular micrométrica.

Os desenhos dos ovários foram feitos em câmara clara adaptada a um microscópio estereoscópico Wild M5. As fotografias dos ovários foram feitas em microscópio estereoscópico Wild M7 com dispositivo para fotografia.

Quanto à classificação atribuída aos oócitos, esses foram agrupados em 3 classes baseando-se em critérios pré-estabelecidos:

1. Pré-vitelogênicos - os oócitos mais jovens de cada ovaríolo, medindo menos de 0,5 mm de comprimento.
2. Vitelogênicos - os oócitos posteriores aos descritos acima, medindo mais de 0,5 mm de comprimento, porém ainda não corionados.
3. Maduros - os oócitos terminais, medindo acima de 1,7 mm de comprimento, já envoltos pelo corion.

Neste trabalho foi usada a nomenclatura de PRATT & DAVEY (1972) para identificação dos oócitos.

Os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com o método de SNEDECOR (1956).

Para caracterizar a diferença de desenvolvimento de oócitos e ovaríolos de *Rhodnius prolixus*, foram realizados estudos histológicos.

Os ovários que se destinavam ao estudo histológico foram removidos de exemplares anestesiados com CO₂ e dissecados em microscópio estereoscópico Wild M5. Após a remoção dos tergitos abdominais, tiveram a cavidade abdominal preenchida com líquido de Bowin (MARTOJA & MARTOJA-PIERSON (1970) que foi o fixador utilizado. Os ovários foram retirados, com auxílio de pinça e tesoura oftalmológica, seccionando-se ao nível do filamento terminal e abaixo do pedicelo. Durante a retirada do ovário do interior do abdome do inseto, foram tomados todos os cuidados para evitar estiramentos, que poderiam causar alterações na sua estrutura.

Na fixação foi utilizado líquido de Bowin por um período de 24 horas.

Após a fixação e durante três dias, o material foi conservado em álcool a 70° GL, trocado várias vezes, com a finalidade de remover o ácido pícrico do fixador. A inclusão foi feita em parafina, seguindo o processamento usual e os cortes em série, obtidos em micrótomo, tinham a espessura de 6 micrômetros. Na coloração foi utilizada a hematoxilina-eosina. A montagem dos ovários sobre as lâminas foi feita em bálsamo do Canadá.

Com a finalidade de verificar o grau de abertura dos espaços intercelulares do epitélio folicular ovariano foi realizado um teste para aferição da função ovariana (traduzida pela penetração da vitelogenina por estes espaços). Este teste baseava-se na detecção da penetração de Azul de Evans (*Sigma Chemical Company*) nos espaços intercelulares dos folículos ovarianos de insetos tratados ou não com ecdisona e/ou hormônio juvenil.

Ovários recém removidos e dissecados foram colocados em uma solução do corante a 0,5% por 30 segundos e em seguida lavados em salina (15") para retirada de excesso do Azul de Evans. Posteriormente eram homogeneizados em homogeneizador manual e o volume final completado para 3 ml, dando uma proporção de 2 ovários/ml.

Após centrifugação do homogenato à 3.000 r.p.m., durante um período de 10 minutos (em centrífuga Janestzki, refri-

gerada, do tipo K 24) uma alíquota do sobrenadante era usada para a leitura espectrofotométrica à 600 nm em espectrofotômetro da Specol do tipo Ausjena.

Para facilitar a visualização dos resultados, estes foram estipulados em unidades colorimétricas, sendo uma unidade colorimétrica, neste caso, definida como a quantidade de Azul de Evans presente no homogenato, que origina uma absorbância de 0,100 A_{600 nm} nas condições descritas.

IV. RESULTADOS

1. INFLUÊNCIA DA ECDISONA NA OVIPOSIÇÃO E ECLODIBILIDADE

A produção de ovos, computada diariamente, durante o primeiro ciclo de postura (ciclo que segue-se a primeira alimentação da fase adulta) está demonstrada na figura 4. Observou-se que nas três concentrações de ecdisona houve diminuição da postura, até mesmo naqueles que receberam a menor dose (B), não atingindo o mesmo nível de produção de ovos obtido no grupo controle (A). Durante o período de 20 dias de observação, o grupo controle produziu uma média de 30 ovos, o que significa 2,1 ovos para cada ovariolo, enquanto os grupos tratados com ecdisona produziram 1,4 ovos por ovariolo (B), 0,93 ovos por ovariolo (C) e 0,71 ovos por ovariolo (D).

Os ovos postos pelo grupo controle e pelos grupos tratados, mesmo as fêmeas que receberam doses mais elevadas de ecdisona, não tiveram sua fertilidade alterada, tendo sido

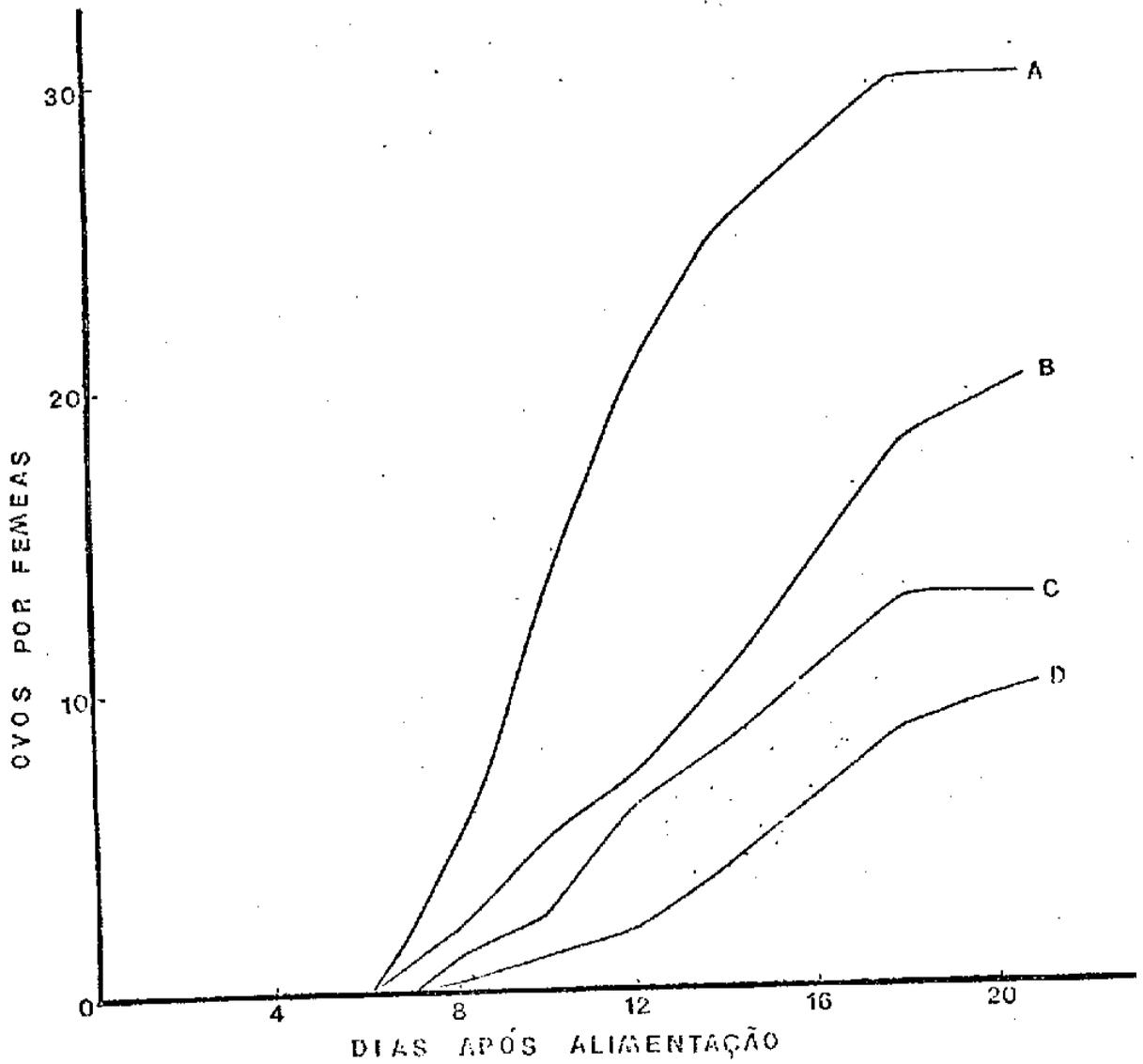


Figura 4. Número acumulado de ovos por fêmea, durante o primeiro ciclo de postura. A - Controle; B - 1,0 ng ecdisona/mg inseto; C - 4,0 ng ecdisona/mg inseto; D - 8,0 ng ecdisona/mg inseto.

observado para todos os quatro grupos acima de 85% de eclodibilidade.

2. INFLUÊNCIA DA ECDISONA NA VITELOGÊNESE

Os estudos da vitelogenese foram inicialmente realizados para abordar o efeito da ecdisona no desenvolvimento dos oócitos de *Rhodnius prolixus*. Estes estudos foram feitos visando principalmente dois aspectos: a) O modo como os oócitos desenvolvem-se nos ovaríolos; b) Os efeitos da ecdisona sobre este desenvolvimento.

2.1. Relação dos oócitos terminais (T) com os oócitos mais próximos (T1)

Sabe-se que cada um dos ovários de *Rhodnius prolixus* possui sete ovaríolos contendo oócitos em diferentes fases de desenvolvimento. Assim, independente do dia considerado, pode-se fazer uma relação entre os comprimentos do oócito terminal (T) e o oócito anterior a este (T1) e representá-la em forma gráfica (Figura 5). Esta figura mostra que apenas uma parte dos oócitos está em vitelogenese (no máximo um por ovaríolo) em um determinado tempo; isto é, somente após o córion do oócito T haver sido depositado (o que normalmente ocorre quando o oócito T mede cerca de 1,70 mm de comprimento), o oócito T1 inicia o processo de deposição de vitelogenina, assumindo, depois da saída do T para o oviduto comum, a posição

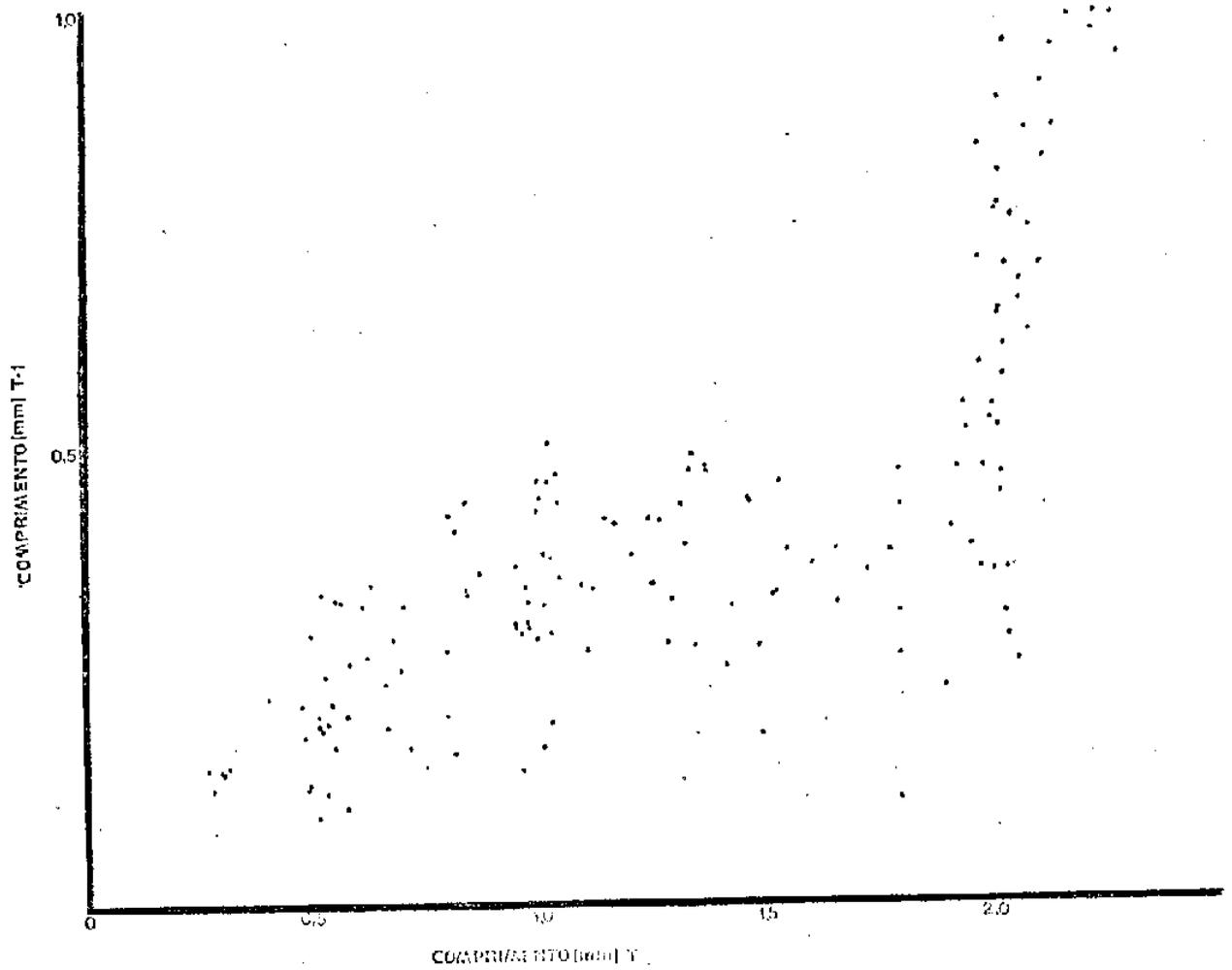


Figura 5. Relação entre os oócitos T e T-1 encontrados em ovariolos do lote controle, sendo cada ponto o encontro das medidas de T e T-1 de um mesmo ovariolo de *Rhodnius prolixus*.

terminal no ovariolo. Na figura 5, que corresponde à relação de comprimento dos oócitos T e T1 no 6º dia após a alimentação (cada ponto do gráfico representa o comprimento de 2 oócitos, T e T1, em cada ovariolo), observa-se que 7,33% dos oócitos T estão na fase pré-vitelogênica, 50,66% na fase vitelogênica e 42,01% na fase de oócito maduro. Quanto aos oócitos T1 nota-se que 75,86% estão na fase pré-vitelogênica enquanto apenas 24,14% atingiram a fase vitelogênica, inexistindo oócitos na fase madura. Uma sincronia também é observada quando se relaciona os oócitos T1 e T2.

Em insetos tratados com ecdisona esta sincronia também ocorre (Figura 6), embora haja um retardo no desenvolvimento dos oócitos, que se acumulam na fase pré-vitelogênica durante os seis primeiros dias de experiência, sendo observado, percentualmente que, dos oócitos T, 35,30% estão na fase pré-vitelogênica, 61,13% na vitelogênica e 3,57% na de oócito maduro. Quanto a T1, 98,23% se encontram na fase pré-vitelogênica e 1,77% na vitelogênica, não havendo oócitos maduros. Estes dados encontram-se representados na Tabela 3.

2.2. Efeito da ecdisona sobre o desenvolvimento dos oócitos

Após a alimentação e o acasalamento, a deposição de vitelogenina promove o crescimento do oócito T. No entanto, este desenvolvimento pode ser modificado pela ação da ecdisona, efeito este que está demonstrado na Tabela 4 e Figura 7.

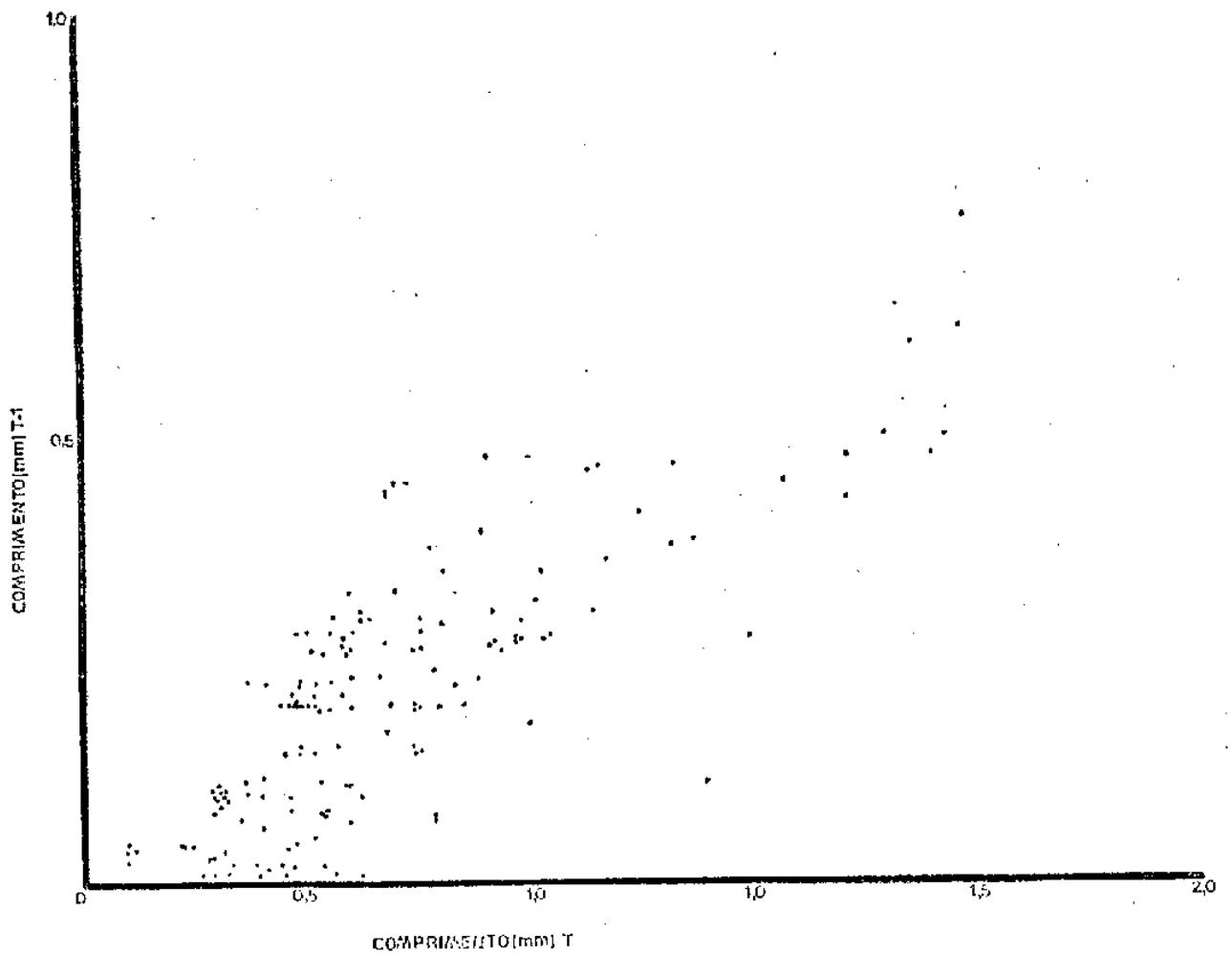


Figura 6. Relação entre óocitos T e T-1 encontrados em ovariolos do lote tratado com ecdisona, sendo cada ponto o encontro das medidas de T e T-1 de um mesmo ovariolo de *Rhodnius prolixus*.

TABELA 3. Ação da ecdisona no desenvolvimento oocitário, considerando-se os oócitos T e T1, submetidos a dose de 4 ng de ecdisona/ng inseto, comparado com lote controle.

Fase de desenvolvimento oocitário	Controle (%)		4 ng ecdisona/ng inseto (%)	
	T	T1	T	T1
Pré-vitelogênica	7,33	75,86	35,30	98,23
Vitelogênica	50,66	24,14	61,13	1,77
Oócito maduro	42,01	0	3,57	0

Tabela 4. Efeito da ecdisona no comprimento dos oócitos T e T1, de zero a 6 dias após a alimentação.

Tratamento	Dias após a alimentação	Média de comprimento de oócito (mm)*		Oócitos presentes (%)	
		T	T1	T	T1
Controle	0**	0,40 ± 0,06	0,20 ± 0,01	100,0	95,0
	2	0,70 ± 0,08	0,26 ± 0,02	100,0	100,0
	4	1,00 ± 0,05	0,31 ± 0,04	100,0	96,5
	6	1,40 ± 0,08	0,36 ± 0,06	100,0	95,5
1,0 ng ecdisona/mg inseto	2	0,40 ± 0,04	0,10 ± 0,01	100,0	60,0
	4	0,45 ± 0,04	0,13 ± 0,01	100,0	52,0
	6	0,50 ± 0,07	0,18 ± 0,02	95,5	58,0
4,0 ng ecdisona/mg inseto	2	0,27 ± 0,02	0,05 ± 0,01	100,0	25,0
	4	0,36 ± 0,01	0,06 ± 0,01	93,0	1,0
	6	0,40 ± 0,01	0,06 ± 0,02	80,0	15,0

* Cada valor representa a média de ambos os ovários de, pelo menos, 20 fêmeas (cada fêmea com 14 ovaríolos)

** Vinte dias após a metamorfose

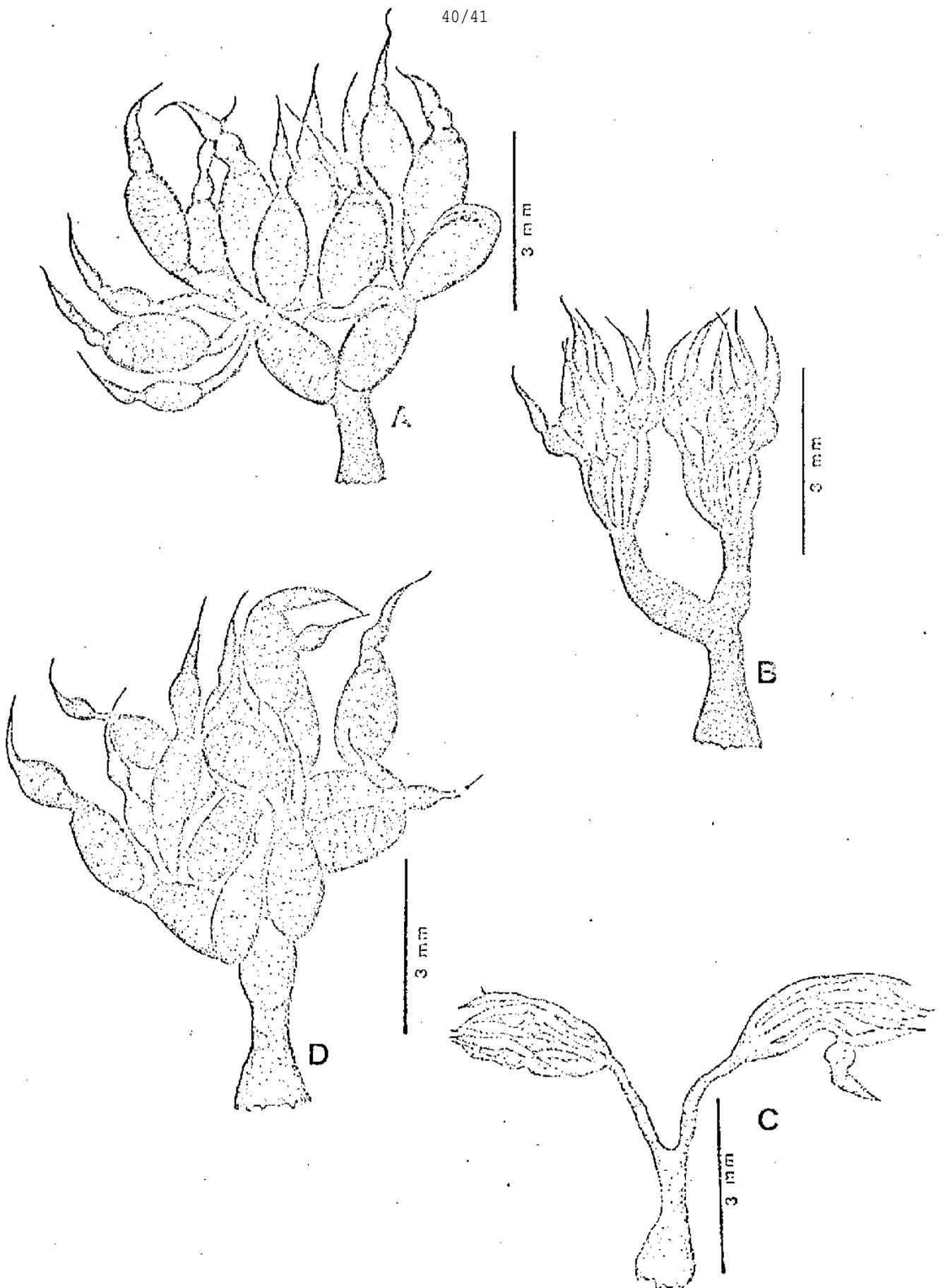


Figura 7. Ovários no 7º dia após a alimentação e administração do(s) hormônio(s): A - Controle; B - 4 ng ecdisona/mg inseto; C - 8 ng ecdisona/mg inseto; D-4 ng ecdisona/mg inseto + 0,1 µg de hormônio juvenil/inseto (Desenho em câmara clara).

Vinte dias após a metamorfose (passagem do quinto e último estágio ninfal para adulto) e logo após os insetos terem recebido a primeira alimentação da fase adulta, a média de comprimento dos oócitos T nas fêmeas controle é de $0,40 + 0,06$ mm, 4 a 6 dias após o comprimento médio dos oócitos T é de $1,00 + 0,05$ mm e $1,40 + 0,08$ mm, respectivamente (Tabela 4). Durante os 6 dias que se seguiram à alimentação e administração de ecdisona, o lote que recebeu tratamento de $1,0$ ng ecdisona/mg inseto apresentou um ligeiro aumento de tamanho do oócito T e o que recebeu $4,0$ ng ecdisona/mg inseto sofreu uma redução de tamanho. Considerando o oócito T1 houve redução nos lotes tratados com ambas as doses. Enquanto era verificada esta redução, os oócitos do lote controle aumentaram durante estes seis dias uma média de $1,00$ mm (T) e $0,16$ mm (T1).

A tabela 4 mostra também o efeito negativo da ecdisona na formação de oócitos. Este efeito é extremamente marcante com relação a T1 e está expresso em percentagem de oócitos presentes.

Os dados percentuais de vitelogênese e o número de oócitos maduros observados no 7º dia após a alimentação dos grupos controle e tratados com ecdisona, estão representados na tabela 5. Observa-se que existe 98% de oócitos T vitelogênicos (acima de $0,50$ mm de comprimento) e $6,5 + 0,6$ oócitos maduros (acima de $1,70$ mm de comprimento) por fêmea controle. No entanto, as fêmeas tratadas com $4,0$ ng ecdiso-

TABELA 5. Efeito da ecdisona na vitelogênese no 7º dia após a alimentação.

Tratamento	Porcentagem de oocitos vitelogênicos*	Número médio de oocitos maduros por fêmea
Controle	98	6,5 ± 0,6
1,0 ng ecdisona/mg	65	3,5 ± 1,0
4,0 ng ecdisona/mg	45	1,5 ± 0,7

* Cada valor representa a média de, no mínimo, 15 fêmeas.

na/mg inseto 45% de oócitos T vitelogênicos e com um número de oócitos maduros de $1,5 \pm 0,7$ por fêmea.

3. INFLUÊNCIA DA ECDISONA E HORMÔNIO JUVENIL NA OOGÊNESE

O achado de que a ecdisona inibia a produção de ovos pela sua ação interferindo no desenvolvimento dos oócitos, sugeriu-nos que tal hormônio teria a sua importância para a reprodução do inseto. Assim, alguns experimentos foram planejados visando obter informações sobre a questão básica desta ação hormonal. Seria a ecdisona um hormônio que agiria diretamente nos ovários? Ou seria a ação da ecdisona indireta, inibindo, de alguma maneira, a ação do hormônio juvenil? Para isto foram realizadas experiências considerando estas duas possibilidades.

3.1. Hormônio juvenil e sua ação na reversão da inibição, da oogênese pela ecdisona.

Para testar se o hormônio juvenil possui um efeito antagônico à ação da ecdisona, foi realizada a seguinte experiência: três grupos de fêmeas receberam os seguintes tratamentos: 4,0 ng ecdisona/mg; 4,0 ng ecdisona/mg + 0,1 µg de hormônio juvenil/inseto; e um grupo controle que recebeu somente os solventes dos respectivos hormônios.

A ação destes hormônios na oogênese, traduzida em

termos de desenvolvimento dos oócitos T e T1 pode ser observada através dos dados da Tabela 6. Estes dados foram obtidos de medidas realizadas no 4° e 8° dias após à alimentação e à administração dos dois hormônios e indicam que o hormônio juvenil incrementou o desenvolvimento dos oócitos inibidos pela ação da ecdisona, bem como aumentou a percentagem de presença dos oócitos T e T1. Estes efeitos estão bem demonstrados nas figuras 9 e 10. Também, histologicamente, foi observado que havia uma inibição do desenvolvimento oocitário causada pela ecdisona e que o grau desta inibição estava relacionado com a dose de hormônio recebida por cada lote de insetos. Observou-se também (Figura 11) que os ovários do lote em jejum (20° dia após a metamorfose) encontravam-se num estágio de desenvolvimento ligeiramente superior ao dos insetos que receberam 8 ng/ecdisona/mg de inseto e que o grupo que recebeu 4 ng ecdisona/mg de inseto + 0,1 µg de hormônio juvenil, apresentava um desenvolvimento oocitário bastante semelhante ao do lote controle.

A verificação de que o lote que recebeu 8 ng ecdisona/mg de inseto se encontrava com os oócitos mais reduzidos do que o grupo em jejum poderia ser justificada por uma reabsorção de nutrientes ovarianos, que seriam desviados para uma outra função metabólica.

3.2. Hormônio juvenil e sua ação sobre o efeito inibitório da ovipostura pela ecdisona

Para este estudo foi feito o seguinte experimento:

Tabela 6. Efeito do hormônio juvenil sobre o efeito inibitório da ecdisona na oogênese, no 4º e 8º dias após a alimentação.

Tratamento	Dias após a alimentação	Média de comprimento de oócito (mm)*		Porcentagem de ausência de oócitos	
		T	T1	T	T1
Controle	4	0,95 ± 0,05	0,28 ± 0,02	0	5,0
	8	1,60 ± 0,07	0,38 ± 0,06	0	2,5
4,0 ng ecdisona/mg inseto	4	0,49 ± 0,04	0,16 ± 0,01	5,0	42,0
	8	0,57 ± 0,04	0,18 ± 0,02	18,0	2,0
4,0 ng ecdisona/mg + 0,1 µg HJ/inseto	4	0,95 ± 0,05	0,28 ± 0,07	2,5	19,0
	8	1,44 ± 0,06	0,36 ± 0,06	0	7,0

* Cada valor representa a média de oócitos de ambos os ovários de, pelo menos, 20 fêmeas (cada fêmea com 14 ovaríolos).

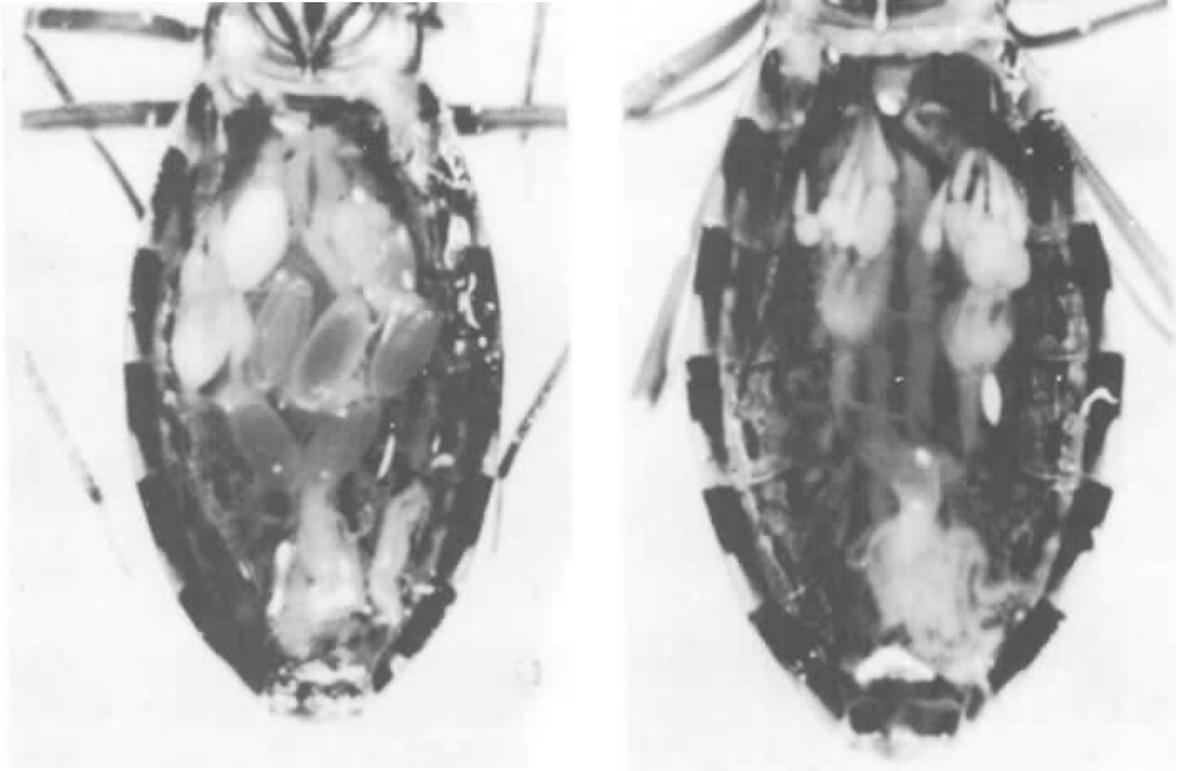


Figura 9. Fotografias mostrando ovários de um inseto do lote controle (A) e do lote tratado com 4 ng ecdisona/mg inseto (B), ambos no 7º dia de desenvolvimento oocitário. Aumento 6X.

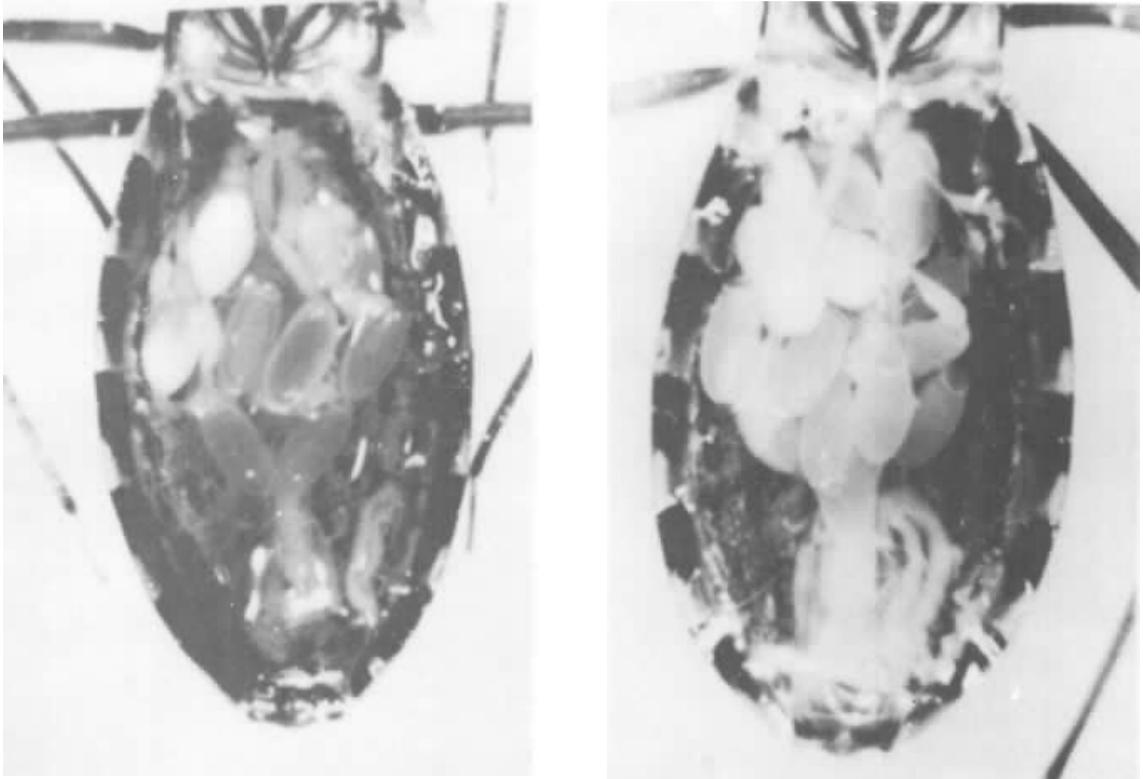


Figura 10. Fotografias mostrando ovários de um inseto do lote controle (A) e do lote tratado com 4 ng ecdisona + 0,1 ug de hormônio juvenil inseto (C), ambos no 7° dia de desenvolvimento oocitário. Aumento 6X.



Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários de *Rhodnius prolixus*. Aumento 12 X : 7 dias após alimentação e tratamento: A - Controle; B- Ecdisona 4 ng/mg inseto; C - Ecdisona 4 ng/mg inseto + 0,1 ng hormônio juvenil/inseto; D - 8 ng ecdisona/mg inseto; E - jejum. Setas indicando: 1- Oócito maduro; 2- Oócito imaturo.

três grupos de fêmeas (A, B e C), receberam, de uma só vez, sangue total ou sangue contendo ecdisona com ou sem aplicação tópica de hormônio juvenil. Estas doses foram de 4,0 ng ecdisona/mg (B); 4,0 ng ecdisona/mg + 0,1 µg de hormônio juvenil/inseto; e um lote controle que recebeu os solventes dos respectivos hormônios. A produção de ovos destes três grupos está demonstrada na Tabela 7. Nesta tabela observa-se o efeito inibitório da oviposição provocado pela ecdisona quando comparada com o lote controle: $1,52 \pm 0,15$ ovos/fêmea/dia para o lote controle (A) e $0,71 \pm 0,18$ ovos/fêmea/dia para o grupo tratado com ecdisona (B). Observa-se ainda, nitidamente o efeito do hormônio juvenil impedindo a inibição causada pela ecdisona: $1,38 \pm 0,16$ ovos/fêmea/dia (C).

4. REVERSÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA ECDISONA NA OVIPOSTURA POR SUBSEQUENTES ALIMENTAÇÕES COM SANGUE SEM ADIÇÃO DO HORMÔNIO.

Este experimento foi realizado numa tentativa de obter um esclarecimento com relação à importância da ação da ecdisona sobre a fisiologia de *Rhodnius prolixus*. Seria a ecdisona um fator que inibiria irreversivelmente a oogênese e a oviposição? Com este objetivo foi realizado o seguinte experimento: quatro grupos de 20 insetos receberam ou não ecdisona na alimentação. As doses estimadas foram de 1,0 ng ecdisona/mg; 4,0 ng/mg; 8,0 ng/mg; e um lote controle. A produção média de ovos/fêmea/dia dos três primeiros ciclos está

TABELA 7. Efeito do hormônio juvenil sobre a ação inibitória da ecdisona na ovipostura.

Tratamento	Ovos postos/fêmea/dia *
Controle	1,52 \pm 0,15
4 ng ecdisona/mg inseto	0,71 \pm 0,18
4 ng ecdisona/mg inseto + 0,1 μ g HJ/inseto	1,38 \pm 0,16

* Cada número representa a média de postura de 20 fêmeas.

representada na tabela 8. Os dados indicam que a inibição da produção de ovos no primeiro ciclo é proporcional à dose de ecdisona administrada, como já foi observado na figura 4. Nas alimentações responsáveis pelo segundo e terceiro ciclos de postura não foi administrada ecdisona aos lotes em observação. Verificou-se assim que o efeito da ecdisona era reversível, tendo-se em vista que aumentou, do segundo para o terceiro ciclo, a produção de ovos nos lotes de insetos que haviam recebido ecdisona na primeira alimentação (Tabela 4). No terceiro ciclo de postura, após as fêmeas terem recebido duas alimentações às quais não foi adicionada ecdisona, o efeito deste hormônio, mesmo no grupo que recebeu a maior dose (8,0 ng ecdisona/mg), não mais se fazia notar (Tabela 7).

5. TESTE COM AZUL DE EVANS PARA AFERIÇÃO DA FUNÇÃO OVARIANA

Esta experiência foi realizada para estudar o efeito da ecdisona e ecdisona + hormônio juvenil sobre os espaços intercelulares dos folículos ovarianos. Foi verificado colorimetricamente em ovários controle e tratados, no 2° e 4° dias após a alimentação, que a penetração da solução do corante nos espaços intercelulares encontrava-se bastante reduzida nos insetos que receberam apenas ecdisona, quando estes foram comparados aos insetos controle. Todavia, no grupo tratado com ecdisona + hormônio juvenil a coloração obtida nos homogenatos ovarianos era próxima àquela observada no

TABELA 8. Produção média de ovos nos três primeiros ciclos de ovipostura, em fêmeas que receberam diferentes doses de ecdisona na primeira alimentação (após a última ecdise), seguida por duas alimentações sem a ecdisona ser adicionada ao sangue.

Tratamento	Ovos postos/fêmea/dia *		
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo
Controle	1,61 ± 0,15	1,47 ± 0,10	1,71 ± 0,12
1 ng ecdisona/mg inseto	0,96 ± 0,25	1,49 ± 0,18	1,76 ± 0,15
4 ng ecdisona/mg inseto	0,67 ± 0,20	1,26 ± 0,14	1,67 ± 0,10
8 ng ecdisona/mg inseto	0,32 ± 0,22	0,97 ± 0,28	1,45 ± 0,25

* Cada número representa a média de 20 fêmeas

TABELA 9. Penetração da solução de Azul de Evans nos espaços intercelulares dos folículos ovarianos dos lotes controle tratados com ecdisona e ecdisona + hormônio juvenil.

Tratamento	Unidades*	
	Dias após o tratamento	
	2	4
Controle	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,3
1 ng ecdisona/mg	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2
4 ng ecdisona/mg	1,5 ± 0,3	2,0 ± 0,1
4 ng ecdisona/mg + 0,1 µg IJ/inseto	3,0 ± 0,1	3,4 ± 0,3

* Uma unidade é definida como a quantidade de Azul de Evans no homogenato ovariano que origina uma absorbância de 0,100
A 600 nm

lote controle. Os resultados da penetração do Azul de Evans encontram-se traduzidos em unidades de absorbância, são apresentados na Tabela 9.

V. DISCUSSÃO

1. AÇÃO DA ECDISONA NA OVIPOSTURA E ECLODIBILIDADE

Como ficou demonstrado claramente, através dos resultados obtidos e apresentados, as fêmeas adultas e acasaladas de *Rhodnius prolixus*, tiveram a oviposição inibida durante o 1º ciclo de postura, que se seguiu à administração do hormônio. Esta inibição foi verificada ser temporária e reversível, já que este efeito desapareceu, retornando a reprodução ao normal nos ciclos subseqüentes, quando os insetos foram alimentados com sangue sem adição do hormônio.

Para a reversão do efeito, quando se considera o lote que recebeu a menor dose de ecdisona (1,0 ng/mg inseto) foi necessária apenas uma alimentação, tendo sido normal a postura do segundo ciclo. Para as doses mais elevadas (4,0 e 8,0 ng/mg) foram necessárias duas alimentações sem adição do hormônio, para que fosse alcançada a média de postura do

lote controle.

Foi também notado que não houve alteração na percentagem de eclosão dos ovos de fêmeas tratados com ecdisona, tendo esta sido semelhante ao lote controle. Esta observação sugere que o efeito do hormônio da muda não se faz sentir de maneira negativa sobre o embrião e que uma vez o ovo haja sido formado e depositado, o desenvolvimento embrionário ocorre sem qualquer anormalidade.

Sabe-se que fêmeas não acasaladas de *Rhodnius prolixus* apresentam um retardo sensível da postura, sendo o número final de ovos postos cerca de um terço do normal (BUXTON, 1930; DAVEY, 1967 e COLES, 1965) ou menos ainda (UBATUBA *et al.*, 1969), quando comparado com postura de fêmeas acasaladas.

Por outro lado, DAVEY (1967) demonstrou que a allatectomia diminui ainda mais o número de oócitos completamente maduros em fêmeas não acasaladas quando comparadas às fêmeas acasaladas que também sofreram ablação do *corpus allatum*. Esta comparação é feita considerando a maturação de ovos em fêmeas virgens e acasaladas, não allatectomizadas.

Este autor, no mesmo trabalho, atribui a maior produção de ovos das fêmeas acasaladas a um fator miotrópico, secretado pelas células neurosecretoras medianas do cérebro, estimuladas pelo acasalamento. Verificou ainda que quando as células neurosecretoras de fêmeas não acasaladas eram removidas, a postura das mesmas era aumentada, provavelmente de-

vido à alguma liberação do fator secretado por estas células, causada mecanicamente, durante a sua remoção.

A verdade é que ainda não se encontra suficientemente esclarecido o controle da produção de ovos neste inseto, quando se considera diretamente o papel do acasalamento. DAVEY (1967) atribui este controle à secreção de um fator miotrópico e UBATUBA *et al.* (1969) o atribui à secreção de hormônio juvenil.

Nas experiências executadas e cujos resultados foram relatados, os insetos tratados com ecdisona foram acasalados (o que foi evidenciado pela observação das espermatóforas 24 horas após a alimentação e pela fertilidade dos ovos) e a inibição da postura parece ocorrer à custa de um bloqueio da ação do hormônio juvenil. Esta hipótese tem como suporte o fato de que a aplicação de hormônio juvenil determina a reversão da inibição da oviposição, verificada nos insetos tratados com ecdisona por via oral.

O fato da percentagem de eclodibilidade dos ovos haver permanecido inalterada, sugere que a diminuição do número de ovos postos por fêmeas tratadas não seria devido à inibição do fator miotrópico, já que foi verificado por DAVEY (1967) que a remoção das células neurosecretoras promove uma redução bastante acentuada na eclodibilidade dos ovos.

2. OOGÊNESE EM INSETOS CONTROLE E TRATADOS COM ECDISONA

A constatação de que a administração de ecdiso-

na interferia na oviposição dos insetos e que o hormônio juvenil revertia o processo inibitório, sugeriu-nos verificar a ação do hormônio da muda à nível ovariano. Para isto tornava-se importante observar a oogênese, tomando em consideração duas possibilidades:

- a) Ação direta da ecdisona sobre o ovário;
- b) Ação da ecdisona inibindo direta ou indiretamente, o efeito do hormônio neste inseto.

Seguindo-se à metamorfose, a fêmea virgem de *Rhodnius prolixus* apresenta um breve período de atividade reprodutiva, durante o qual alguns poucos oócitos entram em vitelogênese; entretanto esta cessa aproximadamente no 15° dia após a muda (GARCIA, E.S., 1978, informação pessoal). Esta observação explica o fato de que no dia da alimentação e tratamento (20° dia após a ecdise), os oócitos terminais estivessem em fase pré-vitelogênica.

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam àqueles encontrados por PRATT & DAVEY (1972) em *Rhodnius prolixus* e por MUNDALL & ENGELMAN (1977) em *Triatoma proctata*, de que o desenvolvimento oocitário é um processo altamente organizado, coordenado e sincronizado, com lotes de oócitos amadurecendo à medida que ocorre a oviposição. Somente o oócito terminal (T) em ovariolos individuais atinge a maturidade em tempos aproximados. Isto implica no fato do penúltimo oócito (T1) ficar estacionário até o T completar a maturação. Também neste experimento foi observado que cada

ovariolo apresentava apenas um oócito sofrendo ativa vitelogenese em um determinado tempo, isto é, sendo sempre necessário que o oócito terminal adquirisse córion para que o oócito seguinte, mais próximo e mais jovem, entrasse em vitelogenese.

Em insetos tratados com ecdisona esta sincronia também foi observada, embora houvesse já uma fase mais prolongada antes que os oócitos entrassem em vitelogenese.

Os achados apresentados neste trabalho demonstram, sem dúvida, que a ecdisona aplicada por via oral também inibe a oogênese. A conseqüência deste efeito inibitório poderia facilitar o entendimento ou a associação de outros eventos fisiológicos e fornecer dados para uma apreciação do significado funcional deste hormônio para o inseto adulto.

A análise destes resultados revelou que o efeito da ecdisona sobre a oogênese era dependente da quantidade de hormônio ingerido e que o desenvolvimento oocitário encontrava-se fortemente inibido durante a primeira semana de experiência; esse efeito podendo ser revertido por subseqüentes alimentações sem adição do hormônio, da mesma maneira que ocorria quando se considerava a oviposição.

Apesar das glândulas protorácicas, consideradas como o principal local de síntese da ecdisona em insetos adultos, se degenerarem dois dias após a muda (WIGGLESWORTH, 1955b, 1972), este hormônio já foi encontrado na hemolinfa e em diversos tecidos de insetos adultos (STAM, 1958; SHAYA e

KARLSON, 1965; HAGEDORN *et al.*, 1975; LAGUEUX *et al.*, 1977).

A inibição do processo da oogênese determinada pela ecdisona poderia ser explicada exclusivamente devido à sua ação sobre os ovários. A ação assim entendida poderia limitar a vitelogênese e como consequência a maturação dos oócitos e diminuição da oviposição. Apesar desta hipótese poder ser considerada, ela não explica, no entanto, o fato já conhecido da ecdisona não afetar *in vitro* as células foliculares ovarianas, como foi demonstrado por ABU-HAKIMA & DAVEY (1977).

Assim, tornou-se interessante verificar a ação gonadotrófica do hormônio juvenil em insetos que receberam ecdisona. É possível que o efeito anti-hormônio juvenil da ecdisona, inibindo a secreção do *corpus allatum* por uma ação direta sobre as glândulas ou por um efeito indireto, mediando de alguma maneira um outro centro regulador (cérebro, corpora cardíaca?), seja revertido pela administração do hormônio juvenil.

É conhecido que insetos allatectomizados apresentam uma série de alterações ovarianas estruturais e funcionais (PATCHIN & DAVEY, 1968; PRATT & DAVEY, 1972; MUNDALL & ENGELMANN, 1977) também encontradas por nós em insetos que receberam ecdisona. Estas modificações, comuns aos insetos allatectomizados e aos tratados com ecdisona são principalmente: ausência de maturação de ovos, acúmulo de oócitos T na fase pré-vitelogênica e diminuição dos espaços entre as células foliculares dos ovários.

Um suporte para a hipótese formulada acima é a demonstração de que a aplicação do hormônio juvenil causa a reversão das três alterações anteriormente citadas para os insetos que receberam ecdisona, havendo restauração da atividade funcional ovariana.

3. AÇÃO DO HORMÔNIO JUVENIL NO PROCESSO DE OOGÊNESE

WIGGLESWORTH (1936), em um de seus primeiros trabalhos com *Rhodnius prolixus*, mostrou que o desenvolvimento dos ovos é dependente do *corpus allatum*. O hormônio juvenil age de duas maneiras no ovário já apto para iniciar a oogênese:

- a. Induzindo a síntese de vitelogenina (COLES, 1964; 1965).
- b. Produzindo a abertura de espaços entre as células foliculares (PRATT & DAVEY, 1972; DAVEY & HUEBNER, 1974; ABU-HAKIMA & DAVEY, 1975).

Este segundo modo de ação pode ser induzido *in vitro*, dando oportunidade para examinar como se processa o mecanismo da resposta dos ovários mantidos em meio de cultura (DAVEY & HUEBNER, 1974). A allatectomia realizada 24 horas após a alimentação inibe a vitelogênese (WIGGLESWORTH, 1936); entretanto, a parabiose de insetos allactomizados e insetos com *corpus allatum* ativo, ou implante destas glândulas ativas, normaliza a oogênese daqueles insetos que tiveram o cor-

pus allatum removido (WIGGLESWORTH, 1948), o mesmo ocorrendo através de aplicação do hormônio juvenil (WIGGLESWORTH, 1963).

A necessidade do *corpus allatum* para a vitelogênese foi confirmada em *Rhodnius prolixus* por VANDERBERG (1963) e BAEHR (1973), apesar da observação de outros pesquisadores, que demonstraram que a allatectomia não inibia totalmente a maturação dos oócitos (DAVEY, 1967; PATCHIN & DAVEY, 1968; PRATT & DAVEY, 1972). Deste modo, em *Rhodnius prolixus*, a vitelogênese está sob controle do *corpus allatum* através do hormônio juvenil, que promove, como já foi visto, a abertura dos espaços existentes entre as células foliculares, formando na superfície dos oócitos acessos que facilitam a penetração da vitelogenina (que também tem a sua indução estimulada pelo hormônio juvenil) que se encontra circulante na hemolinfa.

Em fêmeas controle acasaladas a vitelogênese ocorre rapidamente, enquanto em fêmeas allatectomizadas e acasaladas a vitelogênese se processa mais lentamente devido à não abertura dos espaços intercelulares (PRATT & DAVEY, 1972a). Em fêmeas virgens os ovos são retidos no pedicelo do ovário, que fica repleto de ovos maduros. Nestas fêmeas a vitelogênese é inibida de maneira semelhante à allatectomia (DAVEY, 1967), embora este autor não haja conseguido reverter a inibição através da aplicação de doses fisiológicas de hormônio juvenil.

Estes resultados contradizem os dados de UBATUBA

et al., (1969), que verificaram que a administração tópica de hormônio juvenil promovia a normalização da postura. Estes resultados contrastantes talvez possam ser explicados devido ao fato dos autores haverem usado dois análogos diferentes do hormônio juvenil.

As observações de que havia acúmulo de ovos maduros em fêmeas não acasaladas e que nestas a vitelogênese era retardada sugeriram a existência de uma antigonadotropina com uma ação antagônica ao hormônio juvenil, que seria secretada pelas células foliculares (PRATT & DAVEY, 1972b).

Posteriormente, HUEBNER & DAVEY (1973) obtiveram evidências mais diretas da existência deste fator antigonadotrópico, através da implantação de ovários contendo ovos maduros, em fêmeas virgens. Os autores verificaram que a oogênese encontrava-se diminuída nos insetos que receberam o implante e que esta inibição estava relacionada com o número de ovos presentes nos ovários enxertados. Estes achados sugeriram, então, que estes oócitos promoveriam a liberação de algum fator cuja ação seria impedir a abertura dos espaços intercelulares, evento mediado pelo hormônio juvenil. Quando o mesmo método foi testado com fêmeas acasaladas, os resultados não foram significantes.

REGIS (1977) trabalhando com *Triatoma infestans*, demonstrou que a retenção de ovos no pedicelo de fêmeas acasaladas não retardava o desenvolvimento oocitário.

A contradição existente entre os resultados obtidos

pelos dois autores levanta a possibilidade da existência de uma diferença entre as duas espécies de insetos estudadas ou que este tipo de antigonadotropina seria produzida apenas por fêmeas virgens. Entretanto, a ação inibitória da ecdisona não provoca acúmulo de ovos e a inibição se processa em insetos acasalados tratados com este hormônio, excluindo assim a ecdisona como a antigonadotropina descrita por HUEBNER & DAVEY (1973).

Em vários insetos parece que o cérebro exerce influência estimulatória e inibitória sobre o *corpus allatum* (BAEHR, 1973; JOHANSON, 1958; NOVAK, 1975).

BAHER (1973) demonstrou que as células neurosecretoras são necessárias pelo menos uma hora após a alimentação para o *corpus allatum* tornarem-se ativos e que haveria uma influência nervosa inibindo continuamente esta glândula.

Por outro lado, foi descrita por STEEL (1973, 1975) a possibilidade da ecdisona inibir por "feed-back" negativo, no ciclo da muda de *Rhodnius prolixus*, a produção de grânulos nas células neurosecretoras, sendo provável que tal mecanismo possa ocorrer também em insetos adultos, tratados com ecdisona.

Como já foi citado, recentes estudos sugerem que o papel do *corpus allatum* como fator gonadotrópico, esteja na indução da síntese de vitelogenina e na abertura dos espaços intercelulares nos folículos ovarianos. Embora após a emergência, em *Rhodnius prolixus*, o hormônio da muda esteja vir-

tualmente ausente na hemolinfa, devido principalmente ao desaparecimento das glândulas protorácicas (WIGGLESWORTH, 1972), em outros insetos adultos há vários dados mostrando a presença de ecdisteróides na hemolinfa (KARLSON & STAM, 1956; SCHLAEGER *et al.*, 1974; HAGEDORN *et al.*, 1975; HOFFHANN *et al.*, 1975; BORDERAU *et al.*, 1976).

Recentemente tem sido demonstrado que no final do ciclo de maturação dos oócitos, em torno do período da formação do córion, em *Locusta migratória*, uma rápida e intensa produção de ecdisona ocorre nos ovários (LAGEREUX *et al.*, 1977). Esta pronunciada síntese de ecdisona é totalmente independente das glândulas protorácicas e ocorre normalmente nos ovários.

LAGEREUX *et al.* (1977), através de experimentos *in vivo* e *in vitro* mostraram que as células foliculares são o local de produção deste hormônio em fêmeas adultas e ao contrário do que se esperava, uma grande quantidade de ecdisona é depositada nos oócitos e somente uma pequena percentagem é lançada na hemolinfa. A produção ovariana de ecdisona em *L. migratória* não está relacionada com a vitelogênese, já que esta ocorre quando a vitelogênese no oócito terminal está virtualmente completada.

Se um processo semelhante ocorresse em *Rhodnius prolixus*, poder-se-ia pensar na possibilidade de um controle por "feed-back" entre ecdisona e hormônio juvenil. Esta hipótese tem como suporte os seguintes fatos:

- a. O *Rhodnius prolixus* apresenta ciclos de oviposição relacionados com o repasto sanguíneo.
- b. A alimentação, como já foi visto, desencadeia todo o processo hormonal responsável pelo desenvolvimento oocitário.
- c. A ecdisona inibe claramente o desenvolvimento dos oócitos.
- d. O hormônio juvenil restabelece a vitelogênese em insetos que receberam ecdisona.

Em caráter puramente especulativo, poderíamos supor então que o controle da oogênese em *Rhodnius prolixus* acasalado, representava variações cíclicas hormonais no inseto, cuja finalidade seria a de preparar, durante cada período, o organismo da fêmea. O ciclo inicia-se com a alimentação, que provoca a dilatação abdominal, que vai estimular diretamente a secreção do hormônio juvenil pelo *corpus allatum*. Este promove a síntese de vitelogenina pelo corpo gorduroso e a abertura entre as células foliculares ovarianas, desencadeando assim a vitelogênese. Após o desenvolvimento dos oócitos, as células foliculares depositam o córion e sintetizam a ecdisona, que alcançando a hemolinfa, através de um mecanismo de inibição direta ou indireta, por "feed-back" suprime a produção de hormônio juvenil. Ocorre, então, a regressão da vitelogênese com a conseqüente parada da oviposição, finalizando este ciclo. Seguindo-se a um novo repasto sanguíneo, o nível de hormônio juvenil começaria a aumentar

novamente, dando início a um novo ciclo de oviposição.

Desta maneira, observa-se através das experiências de reversão realizadas, que a ecdisona diminui o nível de hormônio juvenil ativo.

Embora não esteja ainda elucidado o modo de ação da ecdisona nesse processo, vários mecanismos podem ser considerados:

- a. Interferência no processo biossintético do hormônio juvenil pelo *corpus allatum*.
- b. Interferência na regulação cerebral do *corpus allatum*.
- c. Influência na indução das enzimas responsáveis pelo metabolismo do hormônio juvenil ou qualquer substrato necessário como precursor biossintético.
- d. Interferência ou competição na ligação do hormônio juvenil com proteínas carreadoras.
- e. Interferência por analogia estrutural com o(s) metabolito(s) responsável(eis) pelo controle de "feed-back", na biossíntese ou secreção do hormônio juvenil pelo *corpus allatum*.
- f. Competição da ecdisona com o hormônio juvenil pelo receptor celular deste último.
- g. Ação inibitória sobre a síntese da vitelogenina pelo corpo gorduroso.

Outras hipóteses poderão indubitavelmente ser adi-

cionadas como modo de ação da ecdisona na oogênese, ficando certo, porém, que ela atua como fator antigonadotrópico e tem este seu mecanismo de ação restaurado pelo hormônio juvenil.

VI . CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados observados neste trabalho, conclui-se que:

1. A ecdisona, administrada por via oral nas doses de 1,0 ng/mg inseto, 4,0 ng/mg inseto e 8,0 ng/mg inseto, teve uma ação antigonadotrópica, inibindo o desenvolvimento oocitário e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ovos.
2. O hormônio juvenil, administrado topicamente na dose de 0,1 μ g/inseto, juntamente com a ecdisona na dose de 4 ng/mg inseto, não permitiu que a ação antigonadotrópica deste último fosse notada. Observou-se então uma inibição da ação da ecdisona pelo hormônio juvenil.
3. A ecdisona não permitiu que houvesse o aumento de permeabilidade do epitélio folicular ovariano, permeabilidade esta que ocorre em insetos não tratados, permitindo a passagem de vitelogenina para os oócitos. Este evento

é mediado fisiologicamente pelo hormônio juvenil.

4. A eclodibilidade dos ovos postos por insetos tratados com ecdisona não foi alterada.

VII. RESUMO

A oogênese e oviposição podem ser inibidas em *Rhodnius prolixus* através da administração de ecdisona por via oral.

A inibição é dependente da dose e quando supera 4,0 ng ecdisona/mg de peso inseto, os ovários têm o seu tamanho bastante reduzido.

Em insetos tratados com ecdisona a oogênese e oviposição podem ser restabelecidas através de subseqüentes administrações de alimento sem adição de ecdisona.

Quando o inseto recebe 0,1 µg de hormônio juvenil, logo após a administração da ecdisona, o efeito inibitório deste hormônio não se faz notar.

Estes resultados mostram que a ecdisona em *Rhodnius prolixus* atua como fator antigonadotrópico e este seu mecanismo de ação pode ser revertido pelo hormônio juvenil.

VIII. ABSTRACT

Oviposition and oogenesis can be inhibited in *Rhodnius prolixus* female by ecdysone given by oral route. The inhibition is dose-dependent, and doses higher than 4,0 ng ecdysone/mg body weight, drastically reduces the size of the ovaries. In ecdysone-treated insects normal oviposition and oogenesis can be reestablished by the subsequent blood meal without ecdysone.

When the insect receives 0,1 μg of juvenile hormone, immediately after the administration of ecdysone, the inhibitory effect of this hormone can not be noted.

This results show that ecdysone in *Rhodnius prolixus*, acts as a antigonadotropic factor and this action mechanism can be reverted by juvenile hormone.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-HAKIMA, R. & DAVEY, K.G. (1977), Effects of hormones and inhibitors of the follicle cells of *Rhodnius*. *J. Insect Physiol.*, 23:913-937.
- BAEHR, J.C. (1973), Controle neuroendocrine du fonctionnement du *corpus allatum* chez *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 19:1041-1056.
- BECKEL, W.E. & FRIEND, W.G. (1964), The relation of abdominal distension to molting in *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.*, 42:71-78.
- BORDEREAU, C., HIRN, M., DELBECQUE, J. & REGGI, M. (1976), Présence d'ecdysones chez un insect adulte: la reine de Termitte. *CR Acads ci Paris*, 282:885-888.
- BRUMPT, E. (1913), Précis de Parasitologie, 2^{ème} ed. XXVII + 1011 pp, Masson & Cie, Paris.
- BUXTON, P.A. (1930), The biology of blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans. Ent. Soc. London*, 78:227-236.

- COLES, G.C. (1965), Studies on the hormonal control of metabolism in *Rhodnius prolixus* Stal. I. The adult female insect. *J. Insect Physiol.*, 11: 1321-1330.
- DAVEY, K.G. (1965), Reproduction in the Insects. 1^{rst} ed. 96 pp, Oliver & Boyd, London.
- DAVEY, K.G. (1967), Some consequences of copulation in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 13: 1629-1636.
- DAVEY, K.G. & HUEBNER, E. (1974), The response of the follicle cells of *Rhodnius prolixus* to juvenil hormone and antigonadotropin *in vitro*. *Can. J. Zool.*, 52: 1407-1412.
- DIAS, J.C.P. & DIAS, R.B. (1978), Aspectos sociais da doença de Chagas, in *Pesquisa Básica em Doença de Chagas*, V Reunião anual (mesa redonda): 17-26.
- ENGELMANN, F. (1968), Endocrine control of reproduction in insects. *An. Rev. Entomol.*, 13: 1026.
- FALLON, A.M., HAGEDORN, H.H., WYATT, G.R. & LAUFER, H. (1974), Activation of vitelogenin synthesis in mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. *J. Insect. Physiol.*, 20:1815-1823.
- FRIEND, W.G., CHOY, C.T.H. & CARTWRIGHT, E. (1965), The effect of nutriente intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.*, 43: 891-904.

- GOMES-NUÑES, J.C. (1964), Mass rearing of *Rhodnius prolixus*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 31: 565-567.
- HAGEDORN, H.H., O'CONNOR, J.D., FUCHS, M.S., SAGE, B., SCHLAEGER, D.A. & BOHM, M.K. (1975), The ovary as a source of α ecdysone in adult mosquito. *Proc. nat. Acad. Sci., USA*, 72: 3255-3259.
- HOFFMANN, J.A., LAGUEUX, M., HIRN, M., DEREGGI, M., GOLTZENE, F. & FEYEREISEN, R. (1975), Evolution du taux des ecdysteroïdes chez les imagos mâles et femelles de *Locusta migratoria*. *Coll. int. CNRS Lille*, 359-365.
- HUEBNER, E. & ANDERSON, E. (1972a), A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. *J. Morph.*, 136:459-494.
- HUEBNER, E. & ANDERSON, E. (1972b), A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. II. Oocyte differentiation. *J. Morph.*, 137: 385-416.
- JOHANSSON, A.S. (1958), Relation of nutrition to endocrine-reproductive functions in the milk-weed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Nytt. Mag. Zool.*, 7:1-132.
- KARLSON, A. & SCHWEIGER, A. (1961), Zur tyrosinstoffwechsellagerung in Insekten. IV. Das phenolxydasesystem von *Calliphora vicina* und seine Beeinflussung durch das Hormon Ecdyson. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.*, 323: 199-210.

- FRIEND, W.G. & SMITH, J.J.B. (1971), Feeding in *Rodnius prolixus*: potencies of nucleoside phosphates in initiating gorging. *J. Insect. Physiol.*, 17: 1315-1320,
- FUKUDA, S. (1940), Induction of pupation in silkworm by transplanting the prothoracic gland. *Proc. imp. Acad. Japan.*, 16: 417-420.
- FURTADO, A. (1977), Control endocrine des mitoses goniales et du déclenchement de la méiose chez la femelle de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera-Reduviidae). *These Université Pierre et Marie Curie*. Paris, 179 pp.
- FURTADO, A., PORCHEROW, P. & DRAY, F. (1976), Évolution du taux des ecdysones au cours des deux dernières intermnes de *Panstrongylus megistus* (Heteroptera: Reduviidae). *Comptes rendus, serie D*, 283: 1077-1080.
- GALLIARD, H. (1935), Recherches morphologiques et biologiques sur la reproduction des Reduides hematophages (*Rhodnius* et *Triatoma*) *These Fac. Sci. Univ. Paris*. Masson & Cie, Paris 160 pp.
- GARCIA, E.S. & GARCIA, M.L.M. (1977), Control of protease secretion in the intestine of 5th instar larvae of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol*, 23: 247-252.
- GARCIA, E.S., MACARINI, J.D., GARCIA, M.L.M. & UBATUBA, F.B. (1975), Alimentação de *Rhodnius prolixus* em laboratório. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 47 (3):537-545.

- KARLSON, P. & STAM, D. (1956), Notizüberden Natchureis von Metamorphose hormon in den Imagines von *Bombyx mori* Hoppe -Senler's *N. physiol. Chem.*, 306: 109-111.
- KOPEC, S. (1922), Studies on the necessity of the brain for the insepction of insect metamorphosis. *Biol. Bull. Woods Hole*, 42: 322-342.
- LAGUEUX, M., HIRN, M. & HOFFMANN, J.A. (1977), Ecdysone during ovarian development in *Locusta migratoria*. *J. Insect physiol*, 23: 109-119.
- LARROUSSE, F. (1927), Étude biologique et systematique du gene *Rhodnius* Stal (Hemiptères-Reduviidae) *Ann. Parasitol.*, 5: 63-88.
- LENT, H. (1948), O gênero *Rhodnius* Stal (Hemiptera-Reduviidae) *Rev. Bras. Biol.*, 8 (3): 297-339.
- LENT, H. & JURBERG, J. (1969), O *Rhodnius* Stal, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera-Reduviidae, Triatominae). *Rev. Bras. Biol.*, 29 (4): 487-560.
- MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M. (1970). Técnicas de Histo-
logia Animal. Toray-Masson, S.A. Barcelona.
- MUNDAL, E. & ENGELMAN, F. (1977), Endocrine control of vitelogenin synthesis and vitellogenesis in *Triatoma proctata*. *J. Insect. Physiol.*, 23:825-836.

- NICOLLE, P. & MATINS, M (1941), Le thermotropisme, facteur déterminant primordial por la piqûre des Réduvidés Hémato-phages. *C.R. Soc. Biol.*, 135:25-27.
- NOVAK, V.J.A. (1975), *Insect Hormones*, 2nd ed, 600 pp, Chapman & Hall, London.
- OKASHA, A.Y.K. (1964), Effects of high temperature in *Rhodnius prolixus* (Stal). *Nature Lond.*, 204: 1221-1222.
- PATCHIN, S. & DAVEY, K.G. (1968), The histology of vitellogenesis in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 12: 1815-1820.
- PRATT, G.E. & DAVEY, K.G. (1972), The *corpus allatum* and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal).I. The effects of allatectomy. *J. exp. Biol.*, 56: 201-215.
- RAABE, M. (1959), Neurohormones chez les insects. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 84: 272-316.
- REGIS L. (1977), Functional compensatory hypertrophy resulting from spontaneous or induced atrophy disconnecting one of the ovaries of *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 17(6): 961-969.
- SCHLAEGER, D.A., FUCHS, M.S. and KANG, S.H. (1974) Ecdysone-mediated stimulation of Dopadecarboxilase activity and its relation ships to ovarian development in *Aedes aegypti*. *J. Cell. Biol.*, 61: 454-465.

- SHAAYA, E. & KARLSON, P. (1965), Der ecdysontiter während der insectenentwicklung- IV- Die Entwicklung der lepidopteren *Bombyx mori* L. und *Cenura vinula* L. *Devel. Biol.*, 11: 424-432.
- SNEDECOR, G.W. (1956), *Statistical Methods*, 5th Ed. Iowa State University Press, Ames.
- STAMM, D. (1958), Isolement d'hormones de metamorphose dans l'orthoptere *Dociostaurus maroccanus*. *R. esp. Fisiol.*, 14: 263-268.
- SPIELMAN, A., GWADZ, R.V. & ANDERSON, W.A. (1971), Ecdysone initiated ovarian development in mosquitoes. *J. Insect. Physiol.*, 17: 1807-1814.
- STEEL, C.G.H. (1973), Humoral regulation of the cerebral neurosecretory system of *Rhodnius prolixus* (Stal) during growth and moulting. *J. exp. Biol.*, 58: 177-187.
- STEEL, C.G.H. (1975), A neuroendocrine feedbacks mechanism in the moulting cycle. *Nature Lond.*, 253: 267-269.
- THOMSEN, E. & MOLLER, J. (1963), Influence of neurosecretory cells and the *corpus allatum* on intestinal protease activity in the adult *Calliphora erythrocephala* Meig. *J. exp. Biol.*, 40:301-321.

- UBATUBA, F.B., MOUSSATCHÉ, H. & GARCIA, E.S. (1969), Postura de ovos por fêmeas virgens de *Rhodnius prolixus* como teste da atividade de hormônio juvenil em insetos. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 41: 650-652.
- URIBE, C. (1927), On the biology and life history of *Rhodnius prolixus* Stal. *J. Parasitol.*, 13 (2): 129-136.
- VANDERBERG, J.P. (1963), The role of the gonadotropic hormone in the synthesis of protein and RNA in *Rhodnius prolixus*. *Biol. Bull. Woods Hole*, 125: 576-581.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1934), The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and "metamorphosis". *Quart. J. microsc. Sci.*, 77: 191-220.
- WIGGLESWORTH V.B. (1935), Function of the *corpus allatum* in insects. *Nature, Lond.*, 136: 338.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1936), The function of the *corpus allatum* in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera): *Quart. J. microsc. Sci.*, 79: 91-121.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1940), The determination of characteres at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. exp. Biol.*, 17:201-222.

- WIGGLESWORTH, V.B. (1948), The function of the *corpus allatum* in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. exp. Biol.*, 25: 1-14.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1952), The toracic gland in *Rhodnius* and its role in moulting. *J. exp. Biol.*, 29: 561-570.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1955a), The role of haemocytes in the growth and moulting of a insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. exp. Biol.*, 32 (4): 649-663.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1955b), The breakdown of the toracic gland in the adult insect *Rhodnius prolixus*. *J. exp. Biol.* 32: 485-491.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1956), The haemocytes and connective tissue formation in an insect, *Rhodnius prolixus*. *Quart. J. microsc. Sci.*, 97: 89-98.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1972), *The Principles of insect Physiology*. 7th ed. VII + 827 p, London, Chapman & Hall.
- WIGGLESWORTH, V.B. & GILLETT, J.D. (1934), The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation of the host. *J. exp. Biol.*, 11: 120-139.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1963), The juvenile hormone effect of farnesol and some related compounds: quantitative experiments. *J. Insect. Physiol.*, 9:105-120.