

EFEITOS DA ECDISONA E DE UM ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE NINFAS DE *Rhodnius prolixus*  
STAL, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) TRATADAS COM PRECO-  
CENO II.

T e s e

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

PATRICIA DE AZAMBUJA MONTERA

Janeiro 1981

A meu pai

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

Ao CNPq, pela bolsa de estudo e recursos proporcionados ao Laboratório de Fisiologia de Insetos (Plano Doenças Endêmicas), propiciando a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Homero Coutinho Salazar, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela iniciação na Entomologia;

Ao Prof. Eloi de Souza Garcia, da Universidade Federal Fluminense, pela orientação e por ter-me ensinado em seu exemplo o espírito crítico e o caminhar lento e seguro da pesquisa científica;

Ao Prof. José Marcos C. Ribeiro, da Universidade Federal Fluminense, pela orientação e sugestões sempre oportunas;

Ao Prof. Gonzalo Efrain Moya y Borja, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela orientação e pelo apoio ao meu ingresso no laboratório de Fisiologia de Insetos na Universidade Federal Fluminense;

Ao Prof. Hugo Edison B. de Rezende, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela confiança e oportuni-

dade concedida no desenvolvimento da tese;

Ao Prof. André F. Furtado, da Universidade de Pernambuco, pela assistência e colaboração na etapa final da tese;

Ao Prof. Jorge Almeida Guimarães, da Universidade Federal Fluminense, pelo incentivo no campo da investigação científica;

J.J. Sarkis, colega de laboratório, pela dedicada atenção e auxílio na redação da tese.

Francisco Gomes, da Universidade Federal Fluminense, pelo trabalho de fotografias;

Aos demais colegas do Laboratório de Fisiologia de Insetos pelo convívio produtivo e agradável durante a realização da tese;

Ao Prof. Oswaldo Duarte Gonçalves, da Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela minuciosa revisão geral do escrito.

## BIOGRAFIA

PATRICIA DE AZAMBUJA MONTERA, filha de Fernando Adolpho Garcia Penna e Tais de Azambuja Penna, nasceu na cidade do Rio de Janeiro em 15 de julho de 1954. Fez o curso primário na Escola Minas Gerais, o primeiro ciclo, do secundário no Colégio Jacobina e segundo ciclo no Colégio Brasil-América, no Rio de Janeiro.

Em 1975 ingressou na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, concluindo o Curso de Ciências Biológicas, Modalidade Biomédica, em 1978. Durante sua vida universitária foi monitora da disciplina de Parasitologia e estagiou, nesta disciplina, a fim de desenvolver uma monografia de caráter experimental para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

## ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	REVISÃO DE LITERATURA	4
A.	Posição taxonômica	4
B.	Ciclo biológico de <i>Rhodnius prolixus</i>	4
1.	Oviposição e duração da embriogênese	4
2.	Desenvolvimento pós-embrionário	5
3.	Comportamento alimentar	
4.	Muda imaginal	
C.	Sistema neurosecretor de <i>Rhodnius prolixus</i>	
1.	Tipos e características das células neurosecretoras	8
2.	<i>Corpus allatum</i>	10
3.	<i>Corpora cardiaca</i>	11
D.	Glândulas protorácicas	11
E.	Controle hormonal do desenvolvimento de <i>Rhodnius prolixus</i>	12
1.	Hormônio protoracicotrópico e hormônio de muda	14
2.	Hormônio juvenil	15
F.	Precoceno	22
1.	Precoceno como "antifeedant"	23
2.	Atividade anti-allatotrópica do precoceno	24
3.	Atividade do precoceno sobre a metamorfose e a reprodução	25

III. MATERIAL E MÉTODOS	27
A. Estabelecimento da colônia de <i>Rhodnius prolixus</i>	27
B. Administração de precoceno II, ecdisona e análogo de hormônio juvenil	27
1. Administração de precoceno II	28
2. Administração de ecdisona	28
3. Administração de hormônio juvenil	29
C. Contagem de pontos do grau de protetelia	29
D. Técnicas histológicas	30
IV. RESULTADOS	31
A. Efeito do precoceno II sobre a alimentação	31
B. Efeito tóxico do precoceno II	31
C. Efeito do precoceno II sobre a prevenção da ecdise	34
D. Relação entre a duração da intermuda e o grau e metamorfose das ninfas tratados com precoceno II	36
E. Efeito da ecdisona na prevenção da ecdise provocada pelo precoceno II	39
F. Efeito do análogo de hormônio juvenil sobre a prevenção de ecdise e indução de metamorfose precoce	41
G. Efeito do precoceno II sobre as glândulas pro-torácicas e as células neurosecretoras	47
H. Efeito do precoceno II sobre o <i>corpus allatum</i>	49

V.	DISCUSSÃO	52
	A. Efeitos "antifeedant" e tóxico do precoce- no II	52
	B. Efeito morfogênico do precoceno II	53
	C. A reversão dos efeitos do precoceno II pela ecdisona e análogo de hormônio juvenil	55
VI.	CONCLUSÕES	62
VII.	RESUMO	64
VIII.	ABSTRACT	66
IX.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

## I. INTRODUÇÃO

O programa de controle dos vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, têm sido realizados com o uso de inseticidas convencionais de largo espectro. Entretanto, devido ao aumento do custo de aplicação destas substâncias e dos riscos que elas representam para o meio ambiente e o homem, somado ao desenvolvimento de resistência em algumas espécies (VALDIVIESO *et al.*, 1971; COCKBURN, 1972; NOCERINO, 1976), foram desviadas as atenções para procedimentos de controle alternativos.

Tem sido estudado o controle de populações de Triatominae com quimioesterilizantes (FELICIANGELI, 1970) ou parasitas e predadores (UNDIANO, 1968; BARRETT, 1976), mas os resultados alcançados são limitados. Recentemente, o isolamento e identificação de compostos obtidos de vegetais com propriedades similares aos hormônios, despertou o interesse dos pesquisadores da área pelo uso de produtos naturais no controle de populações de insetos (MARINI-BETTÓLO, 1976). As-

sim, experiências feitas com aplicação de hormônio juvenil (HJ) e seus análogos químicos em Triatominae tem demonstrado que a efetividade destas substâncias é restrita a um curto período do ciclo de vida destes insetos, interferindo somente durante a metamorfose, quando o HJ natural deve ter baixo título. Assim, por exemplo, em *Panstrongylus megistus*, a atividade é limitada ao tratamento do HJ aplicado pelo menos 17 dias antes da muda para adulto (GILBERT, 1976), enquanto o período de susceptibilidade a HJ exógeno em *Rhodnius prolixus* é restrita a Cerca de 10 dias após a alimentação do último estágio de ninfa (WIGGLESWORTH, 1969).

Um método mais efetivo para o controle da proliferação de insetos poderia ser o uso de anti-hormônio juvenil, desde que durante os estádios imaturos ou adulto o HJ é continuamente secretado (WIGGLESWORTH, 1970). Baseado neste fato, BOWERS *et al.* (1976) testaram o Ageratocromeno (substância isolada da planta *Ageratum sp* por ALERTSEN, 1955) em algumas espécies de insetos e demonstraram atividades biológicas de anti-hormônio juvenil, tais como prevenção do desenvolvimento dos ovários, indução da diapausa e principalmente um efeito de indução da metamorfose precoce, sendo que este último fato levou os autores a denominar o Ageratocromeno de precoceno.

Com o objetivo de verificar os efeitos do precoceno II (6,7-dimetoxi-2,2-dimetil cromeno) sobre a regulação neurendócrina responsável pelo desenvolvimento dos estádios

imaturos de *R. prolixus*, foi realizado este estudo, dando-se especial atenção a: a) efetividade do precoceno II, quando administrado por via oral; b) alterações das células neurosecretoras localizadas na *pars intercerebralis*, das glândulas protorácicas e do *corpus allatum*; c) avaliação dos efeitos do HJ e ecdisona em tratamento simultâneo com precoceno II.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### A. POSIÇÃO TAXONÔMICA

O *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, espécie tipo do gênero, pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LENT, 1948; LENT & JURBERG, 1969).

### B. CICLO BIOLÓGICO DE *Rhodnius prolixus*

O *R. prolixus*, inseto hemimetabólico de hábito hematófago, apresenta sob o ponto de vista ontogênico três fases distintas: ovo, ninfa e adulto.

#### 1. Oviposição e duração da embriogênese

URIBE (1927), BUXTON (1930) e GALLIARD (1935) realizaram estudos sobre a postura de ovos e duração da embriogênese

se em *R. prolixus*. Segundo URIBE (1927), o número total de ovos varia de 200 a 400 por uma única fêmea, postos em 30 a 50 lotes, dos quais os primeiros são mais abundantes, variando de 8 a 14 por lote. Foi observado que o número de ciclos de postura bem como o número de ovos depositados varia com o número de repastos e quantidade de sangue ingerido (FRIEND *et al.*, 1965).

O tempo de incubação e a viabilidade dos ovos variam de acordo com as condições de temperatura: a 25°C a eclosão ocorre entre 15 a 20 dias (LARROUSSE, 1927), com índice médio de eclosão de 85% (GARCIA *et al.*, 1975); a 34°C a eclosão ocorre entre 10 e 11 dias (GALLIARD, 1935). Temperaturas altas tais como 37°C têm efeito letal (URIBE, 1927).

## 2. Desenvolvimento pós-embrionário

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

Os trabalhos de BUXTON (1930), GALLIARD (1935), CLARK (1935), HARINGTON (1960), FRIEND *et al.*, (1965), LAKE & FRIEND (1968), GARCIA *et al.* (1975) e LENT & VALDERRAMA (1977) destacam a importância da alimentação de sangue para que se processem as ecdises das cinco fases de ninfa, bem como para a

reprodução do inseto adulto. Para cada muda ou ciclo de postura, um único e grande repasto de sangue é suficiente, e nele o inseto pode ter aumentado em até 12 vezes seu próprio peso em curto espaço de tempo (BUXTON, 1930; GARCIA *et al.*, 1975; LENT & VALDERRAMA, 1977).

O tempo para que os insetos aceitem o alimento após a ecdise, bem como o tempo para que ocorra a muda, é variável para cada estágio e aumenta à medida que os estágios vão evoluindo (GARCIA *et al.*, 1975). A quantidade de sangue ingerido também aumenta progressivamente com a evolução dos estágios niniais (GARCIA *et al.*, 1975).

### 3. Comportamento alimentar

A alimentação é coordenada através de uma série de padrões comportamentais, os quais, embora relacionados e talvez interdependentes, podem ser considerados não somente parte de um único ato, mas também como um fenômeno separado, cada um dos quais controlado por um conjunto particular de condições físicas e químicas (LINDSTEDT, 1971). GALUN (1975) propõe a seguinte sequência de eventos para alimentação em insetos hematófagos: fase I: orientação; fase II: início da alimentação (picada e degustação); fase III: continuação do repasto (ingestão); fase IV: término do repasto. Uma revisão detalhada do assunto foi realizada por FRIEND & SMITH (1977) e HOCKING (1971).

Fase I: Orientação. WIGGLESWORTH & GILLET (1934), trabalhando com o *Rhodnius*, mostraram que as antenas são responsáveis pela percepção de gradientes de temperatura no ar. O CO<sub>2</sub>, que induz uma variedade de respostas em dípteros hematófagos (HOCKING, 1971), não parece ter papel fisiológico significativo na orientação dos triatomídeos, apesar de algumas sugestões neste sentido (FRIEND & SMITH, 1977).

Fase II: Início da alimentação. Uma vez sobre o hospedeiro, e possivelmente desencadeado pelo contato da antena com a superfície aquecida da pele, o *R. prolixus* inicia então o reflexo da picada (WIGGLESWORTH & GILLET, 1934), para em seguida iniciar a fase de degustação.

Fase III: Continuação do repasto (ingestão). FRIEND (1965), experimentando em *Rhodnius* os diversos nucleotídeos com possível ação fagoestimulante, observou que praticamente todos os tri e di-fosfatados, em concentração de 1mM, induzem a sucção de uma solução de 0,15M de NaCl.

Fase IV: Finalização do repasto. Em *R. prolixus*, esta etapa foi elucidada por MADDRELL (1963) que, seccionando os cordões nervosos ventrais de ninfas de 5º estágio, observou que estas se alimentavam de uma quantidade de sangue muito superior à observada para o controle não operado. Foi concluído que o processo de ingestão é normalmente terminado por informação nervosa proveniente de receptores de estiramento na cutícula abdominal.

#### 4. Muda imaginal (muda de ninfa para adulto)

A muda imaginal ou metamorfose acarreta transformações morfológicas caracterizadas, principalmente, pelo desenvolvimento das asas e da genitália (WIGGLESWORTH, 1970). Nesta fase os insetos tornam-se potencialmente maduros para a reprodução. Esta maturidade, principalmente nas fêmeas, é estimulada pela alimentação e pelo acasalamento (GARCIA *et al.*, 1975; SANTOS & GARCIA, 1980).

### C. SISTEMA NEUROSSECRETOR DE *Rhodnius prolixus*

A morfologia geral do sistema neurosecretor de *R. prolixus* consiste em um grupo de células neurosecretoras (CNS) situadas na *pars interocerebralis* (PI, região mediana dorsal do protocerebro), um par de *corpora cardiaca* (CC) e o *corpus allatum* (CA) (Fig. 1) (DOGRA, 1973).

#### 1. Tipos e características das células neurosecretoras

A unidade básica do sistema neurosecretor é a célula neurosecretora, que é representada como um neurônio modificado caracterizado por possuir traços de uma célula endócrina capaz de produzir secreção. Em contraste com o neurônio típico, as células neurosecretoras não estabelecem contato sináptico com outros neurônios. Entretanto, elas for-

mam estruturas vesiculares no axônio terminal, as quais se assemelham a estruturas pré-sinápticas e são responsáveis pela liberação do material neurosecretor (SLÁMA *et al.*, 1974).

Segundo BAEHR (1968), é possível distinguir quatro tipos de células que diferem por suas formas e afinidades tintoriais. São as células do tipo A, A', a e C.

Celulas do tipo A. Estas células se situam na região anterior e dorsal da PI. Elas medem de 30 a 40  $\mu$ m e se apresentam em número de 8 a 10. São facilmente visíveis em morfologia externa quando observadas ao estereoscópio. A forma é variável, piriforme ou poligonal. A neurosecreção, repartida em glânulos, enche o citoplasma que aparece percorrido de trabéculas claras. O núcleo volumoso, geralmente central, mostra aglomerado de cromatina na periferia e um grande nucléolo na região central (BAEHR, 1968).

Este tipo de célula fixa o Azul Vitória (AV) (BAEHR, 1968) e em coloração pela Fucsina Paraldeídica (FP) aparece com forte tonalidade púrpura (DOGRA, 1973).

Celulas do tipo A'. Situadas na PI, as células do tipo A' podem ser confundidas com as células do tipo A devido à semelhança do tamanho e forma (BAEHR, 1968). As células A' apresentam grânulos de neurosecreção finos, o que resulta na característica uniformidade do citoplasma (BAEHR, 1969). Quando coradas pela FP aparecem pouco pigmentadas (DOGRA, 1973; FURTADO, 1976), e não apresentam afi-

nidades tintoriais pelo AV (FURTADO, 1976).

Células do tipo a. Estas células se situam entre as células do tipo A, isto é, na região mediana interior do Protocérebro. Medem de 15 a 20  $\mu\text{m}$  e aparecem em número de 5 de cada lado do sulco mediano. Devido ao seu tamanho, forma (arredondada ou oval) e localização, podem ser confundidas com as células do tipo C. Entretanto, elas se distinguem destas por sua coloração em Orange G (BAEHR, 1967).

Células do tipo C. As células do tipo C se coram pelo azocarmin e são de dois tipos que diferem notavelmente pelo tamanho (8  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ ).

Elas estão distribuídas na PI, nos lobos laterais do protocérebro e no tritocérebro. As células C constituem o grupo mais numeroso dos tipos celulares encontrados em *Rhodnius* (BAEHR, 1968).

Os axônios das células dos tipos A e A' convergem de cada lobo cerebral para a região posterior do lobo protocerebral cruzando no sulco mediano e seguindo a direção do tritocérebro (Fig.1). Nesta região deixa o cérebro com *nervus corporis cardiacum* (NCC). Este nervo penetra na parte apical do *corpus cardiacum* passando intacto para a região posterior do órgão, onde os dois lobos *cardiacum* se fundem. Nesta região, a maioria das células neurosecretoras termina seu trajeto (DOGRA, 1973).

## 2. *Corpus allatum* (CA)

O CA situa-se ventralmente à aorta, estando a região anterior da glândula em justaposição com a CC (Fig.1). Dependendo do espaço de tempo da última alimentação, existe considerável diferença no tamanho desta glândula (WIGGLESWORTH, 1936). Histologicamente aparece como uma única camada periférica de pequenas células e o resto do corpo é preenchido por células circulares grandes, (células parenquimatosas), responsáveis pela secreção hormonal (DOGRA, 1973), Ambos os tipos de células se coram pelo AV (BAEHR, 1973).

### 3. *Corpora cardiaca* (CC)

A parte anterior dos CC é desprovida de material neurosecretor, exceto na passagem do NCC. A parte posterior fusionada da glândula contém grande quantidade de matéria neurosecretor estocado (SLÁMA *et al.*, 1974). A maioria dos axônios do NCC termina nesta região. Da parte fusionada, um estreito nervo se estende ao longo da superfície ventral da aorta (AO) (DOGRA, 1973) (Fig. 1).

### D. GLÂNDULAS PROTORÁDICAS (GP)

As GP do *Rhodnius* estão situadas no lobo interno do corpo gorduroso torácico (WIGGLESWORTH, 1952). Em colo-

ração pela hematoxilina de Hansen observa-se que há uma malha de células com núcleos largos dispersas sobre o lobo. Diferentes formas são observadas dependendo do grau de atividade destas células. WIGGLESWORTH (1952) reportou que ninfas de 4° e 5° estádios de *Rhodnius* não alimentadas apresentavam estas células atrofiadas, de coloração pálida, os núcleos alongados e de contorno regular. Após a alimentação, o citoplasma destas células aumenta de tamanho e toma uma coloração mais intensa. O núcleo torna-se alargado e lobulado. Nesta fase, um grande número de hemócitos aparece na superfície da glândula. Estas mudanças atingem seu pico durante um período crítico, que varia de 7 a 12 dias após a alimentação, quando as células diminuem de tamanho (WIGGLESWORTH, 1952).

Na metamorfose, o baixo nível de hormônio juvenil durante a intermuda promove a degeneração das GP, tornando assim o inseto adulto incapaz de mudar novamente (WIGGLESWORTH, 1955). WIGGLESWORTH (1952) observou que no 19 dia após a muda imaginal é iniciado o processo de degeneração das GP e já no 39 dia não mais aparece nenhum vestígio das glândulas.

#### E. CONTROLE HORMONAL DO DESENVOLVIMENTO DE *Rhodnius prolixus*.

O processo cíclico de crescimento e a ecdise nos

insetos são realizados por dois hormônios: um produzido pelas células neurosecretoras (WIGGLESWORTH, 1972, GILBERT *et al.*, 1980) e outro pelas glândulas pareadas no protórax, as GP. O produto destas células neurosecretoras, o hormônio protoracicotrópico (HPTT), é liberado periodicamente em resposta a estímulos condicionados a fatores nutricionais, indo ativar as GP. A ativação das GP resulta no aumento de síntese do hormônio de muda, a ecdisona, que será convertida no tecido periférico a ecdisterona (20-hidroxiecdisona), que é a forma ativa do hormônio (SVOBODA *et al.*, 1975). A ação deste hormônio sobre as células epidermais resulta na iniciação do processo da muda: retração da epiderme da cutícula velha (apolise) e deposição da nova cutícula, culminando com a liberação do material que restou da cutícula velha (ecdise) (WIGGLESWORTH, 1970).

Um terceiro hormônio, o hormônio juvenil (HJ), é secretado pelo CA. Este hormônio é responsável pela determinação do caráter da muda iniciado pelo HM. Um alto nível de HJ determina muda de ninfa para ninfa, enquanto que um nível não detectável ou baixo de HJ leva à metamorfose do inseto (BAEHR *et al.*, 1978). Em *R. prolixus* HJ é novamente sintetizado em níveis mais altos na fase adulta do inseto para exercer uma função gonadotrópica (WIGGLESWORTH, 1970; 1972). Sabe-se que uma quantidade precisa destes três hormônios deve ser secretada em estádios definidos e os títulos hormonais mantidos por um período determinado de tempo para que se processe um desenvolvimento normal (GILBERT *et al.*,

1980). Assim, por exemplo, em *Rhodnius* é necessária a presença no HPTT por alguns dias (variável como estágio de ninfa) após o repasto sanguíneo para que um nível de ecdisona seja alcançado e possa se completar a muda (WIGGLESWORTH, 1972). Este espaço de tempo é conhecido como período crítico.

#### 1. Hormônio protorácicotrópico (HPTT) e hormônio de muda (HM)

O HPTT, sintetizado no pericário das células neurosecretoras (CNS); é transportado pelo axônio e estocado principalmente no axônio terminal do órgão neuro-hemal, a CC, que lançará este neuro-hormônio na hemolinfa. Dependendo da espécie do inseto, diferentes células podem estar implicadas na produção deste hormônio. Em *Rhodnius*, O grupo posterior das CNS foi citado como responsável pela produção do HPTT (MORRIS & STEEL, 1977; STEEL, 1978). FURTADO (1979), em *Panstrongylus megistus*, por métodos de cauterização e implantação, sugeriu serem as células do tipo A' as responsáveis pela síntese deste neuro-hormônio. Já em 1971, STEEL & HARMSEN, em *Rhodnius*, haviam relacionado a dinâmica de libertação de neurosecreção das CNS ao perto do crítico. Estes tipos celulares localizados na PI foram denominados de tipos 1, 2 e 3 e correspondem às células A' descritas por BAEHR (1968) e FURTADO (1976) Sabe-se que as CNS são ativadas pelos tensorreceptores que se encon-

tram presentes na paredes abdominal. Estes receptores são estimulados pela dilatação do abdômen induzida pela alimentação (BECKEL & FRIEND, 1964). Foi demonstrado por STEEL & HARMSSEN (1971) que, em *Rhodnius*, este estímulo nervoso promove uma rápida e contínua liberação do material neurosecretado durante todo o período crítico. FURTADO (1977) observou que em 4º estágio de *P. megistus* as CNS descarregam o HPTT durante os primeiros dias da intermuda, isto é, 3 dias após o repasto. Este estado se mantém até o 10º dia, quando novamente as células secretam e estocam seus produtos aguardando a próxima muda.

O HPTT tem tropismo pelas GP (GOLDSWORTHY & MORDUE, 1974), já tendo sido demonstrada a ativação direta destas glândulas pelo HPTT *in vitro* (BOLLENBACHER *et al.*, 1979). A ativação das GP resulta num aumento do nível basal da síntese de ecdisona (GILBERT *et al.*, 1980).

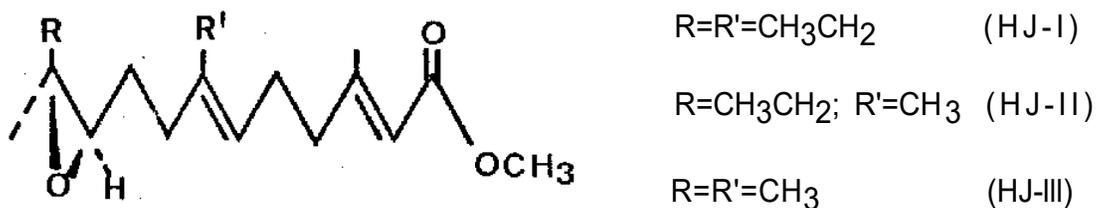
O mecanismo pelo qual finaliza a liberação do HPTT para a preparação do próximo ciclo da muda varia entre as espécies (GILBERT *et al.*, 1980). Em *Rhodnius* há evidência de um possível fator humoral que seria responsável pela mediação do mecanismo de "feedback" negativo contralador da neurosecreção (STEEL, 1973). Mais recentemente, STEEL (1975), baseado em observações dos efeitos de ecdisona injetada, demonstrou que este hormônio poderia inibir a atividade secretora das CNS.

## 2. Hormônio juvenil

O mecanismo de ativação da glândula *corpus allatum* (CA) foi melhor esclarecido por BAEHR (1976) quando observou que, em *R. prolixus*, o protocérebro tem ação allatotrópica, desde que a cauterização da *pars intercerebralis* (PI) afetou o estímulo do CA para produção de hormônio juvenil (HJ). Os resultados obtidos desta experiência foram semelhantes a allatectomia, quando a parsectomia foi realizada durante um período de até 20 horas após a alimentação. BAEHR (1973) demonstrou que o hormônio de ativação atinge o CA não somente através da hemolinfa, mas também diretamente do cérebro, em forma de grânulos, via *nervus corporis cardiacum* (NCC) e *nervus allatum* (NA).

Em *Rhodnius*, o estímulo secretório da glândula CA é relacionado ao repasto sanguíneo, resultando na maior atividade desta glândula para produção de HJ (BAHER. *et al.*, 1978). O HJ não é estocado no CA e sua síntese é seguida imediatamente pela liberação (TOBE & PRATT, 1974).

Atualmente são identificados três tipos de HJ (I, II e III) diferenciados pela presença de radical etil e/ou metil na sua molécula (CASSIER, 1979)



O HJ I e HJ II demonstram maior atividade morfogenética e o HJ III atividade gonadotrópica (GILBERT *et al.*, 1980).

Embora em muitas espécies de insetos estes hormôni-

os ainda estejam por serem evidenciados, BAEHR et al. (1978), por radioimuno ensaio, observaram a presença destes tipos hormonais nos dois últimos estádios de ninfas de *R. prolixus*. Estes autores constataram que no 4° estágio o HJ I é abundante durante a intermuda enquanto que no 5° estágio, 24 horas após o repasto, sua taxa decresce e se mantém em níveis próximos de zero até a ecdise. O HJ II e HJ III, embora em concentrações inferiores à do HJ I, foram também observados durante a intermuda dos dois estádios. A atividade do CA de 5° estágio de *Rhodnius* já havia sido demonstrada por WIGGLESWORTH (1936), quando observou que as células da glândula se tornavam inchadas e o citoplasma uniformemente denso após a alimentação.

Algumas evidências sugerem que o decréscimo da atividade do CA de 5° estágio de *Rhodnius* se deve a uma inibição promovida por um controle nervoso cerebral (WIGGLESWORTH, 1970). Sabe-se que a de, conexão cerebral do CA (BAEHR, 1973) ou implantação do CA de outro estágio ninfal no abdômen de 5° estágio (WIGGLESWORTH, 1970) leva à secreção contínua de HJ resultando em ninfas extranumerária (6° estágio).

Assim, as investigações enfatizam que o papel do cérebro no controle do CA é um processo complexo que integra fatores neurais e humorais (GILBERT et al., 1980).

O HJ parece ter vários papéis no desenvolvimento dos insetos como a diapausa, coloração, atividade motora, e vários aspectos do comportamento (WIGGLESWORTH, 1970; NOVAK, 1975). Entretanto, sua função primária é o controle da meta-

morfose e da reprodução.

WIGGLESWORTH (1935), em suas clássicas experiências com *R. prolixus*, demonstrou um "fator inibidor" da metamorfose produzido pelo CA.

Posteriormente, estudos histológicos revelaram que o HJ atua diretamente nas células alvo: quando o HJ é aplicado localmente, ele atua primariamente nas células que receberam o produto, sem apresentar efeito sistêmico no inseto (WIGGLESWORTH, 1959).

Parece que o HJ age modificando eventos iniciados pela ecdisona no núcleo das células epidermais ativando determinadas regiões cromossômicas para manutenção das características ninfais durante o desenvolvimento dos insetos (GILBERT, 1964).

Assim, um nível preciso de HJ deve ser mantido em estádios definidos da vida do inseto para que seu desenvolvimento normal possa ocorrer.

Se houver variações anormais na taxa de HJ em *R. prolixus*, o desequilíbrio hormonal acarretará metamorfoses anormais ou precoces, dependendo do estágio acometido (WIGGLESWORTH, 1972).

Metatelia (neotenia) é a forma morfológica intermediária entre ninfa e adulto, obtida do último estágio ninfal que sofreu metamorfose parcial (WIGGLESWORTH, 1970); por exemplo, o tratamento de HJ exógeno em 5º estágio ninfal de *R. prolixus* resulta em estágio extranumerário (WIGGLESWORTH 1969).

A aparência das características imaginiais precoces de um inseto que sofreu metamorfose parcial antes de atingir o último estágio ninfal é denominada protetelia (WIGGLESWORTH, 1970). Em *R. prolixus*, esta anomalia foi observada por BAEHR (1976) utilizando allatectomia ou parsectomia em 4º estágio de ninfa.

A ação gonadotrópica do HJ foi inicialmente demonstrada por WIGGLESWORTH (1936). Este autor observou que o CA é indispensável para o amadurecimento dos oocitos de *R. prolixus* após um certo estágio de desenvolvimento, quando as células foliculares se tornam ativas. Se o HJ for suprimido no momento em que o folículo ovariano diferenciado estiver apto a receber vitelogenina, sua maturação é interrompida, o oocito degenera, e as células foliculares proiiferam de maneira desorganizadas, invadem e absorvem o oocito morto (WIGGLESWORTH, 1936, 1972). A ação do HJ na Vitelogênese traduz-se pela síntese de vitelogenina pelo corpo gorduroso e pelo aumento dos espaços intercelulares do epitélio folicular que circunda os oocitos, permitindo a passagem de vitelogenina da hemolinfa para o oocito (PRATT & DAVEY, 1972).

Sabe-se que em adultos de ambos os sexos, o HJ promove crescimento e mudanças morfológicas no epitélio das glândulas acessórias, além de ativar a síntese e o transporte do material celular para o lúmen da glândula (SLÁMA et al., 1974). Embora este efeito seja observado em machos de *Rhodnius*, sua fertilidade não parece ser comprometida (WI-

GGLESWORTH, 1936).

Embora somente estes três hormônios (HPTT, HM e HJ) controlem o crescimento e a metamorfose dos insetos, outros hormônios já demonstraram ser responsáveis pela homeostasia e alguns eventos comportamentais (STEELE, 1976; TRUMAN & RIDDIFORD, 1977), como, por exemplo, o hormônio endurecedor da cutícula (Bursicon), hormônio diurético, hormônio antidiurético, etc.

A Fig. 1 sumariza os principais aspectos relacionados com o controle hormonal discutido anteriormente.

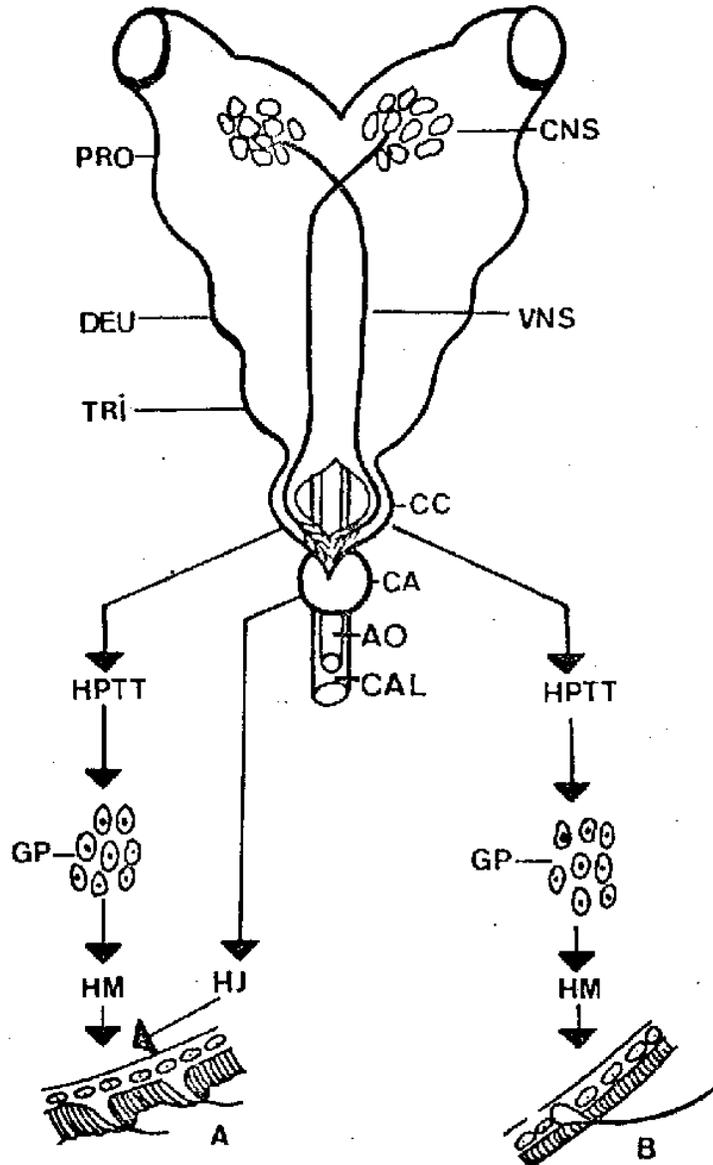
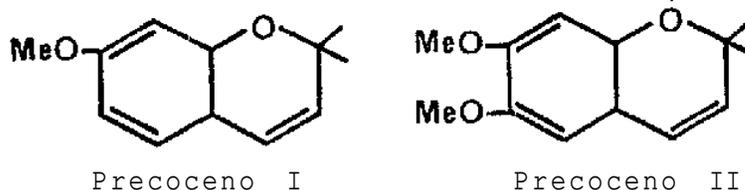


FIGURA 1. Sistema neurendócrino e controle hormonal da metamorfose de Hemíptero: AO, aorta, CA, *corpus allatum*, CAL, canal alimentar, CC, *corpus cardiacum*, CNS, células neurosecretoras, DEU, deutocérebro, GP, glândulas protorácicas, HJ, hormônio juvenil, HM, hormônio da muda, HPTT, hormônio protoracicotrópico, PRO, protocérebro, TRI, tritocérebro, VNS, via neurosecretora, A. Cutícula abdominal de ninfa; B. Cutícula abdominal de adulto. (Adaptação de DOGRA, 1973 e WIGGLESWORTH, 1970).

## F. PRECOCENO

BOWERS et al., (1976), pesquisando a possibilidade de se obter de vegetais substâncias com atividade anti-hormonal para os insetos, observaram que o extrato de *Ageratum houstonianum* induzia esterilidade e metamorfose precoce em algumas espécies de hemípteros.

Na tentativa de isolar e identificar os compostos químicos constituintes da planta, estes mesmos autores evidenciaram o 7 metoxi-2,2 dimetil cromeno (Precoceno I) e o 6,7 dimetoxi-2,2 dimetil cromeno (Precoceno II) como sendo responsáveis pelos efeitos biológicos obtidos.



HULS (1958) já havia sintetizado o precoceno em prosseguimento aos achados de ALERTSEN (1955), que purificou de *Ageratum sp* esta substância, denominando-a de Ageratocromeno.

Posteriormente, BOWERS & MARTINEZ-PARDO (1977) observaram que o tratamento de precoceno por contato em *Onco-peltus fasciatus*, logo após a muda imaginal, impedia o aumento do volume do CA e, conseqüentemente, a inibição do desenvolvimento dos ovários, pela diminuição da secreção de HJ pela glândula.

Desde que a definição do termo anti-hormônio se

aplica a substâncias que previnem o reconhecimento dos sinais hormonais pelas respectivas células receptoras (SLÁMA, 1978), e somada a constatação de que a aplicação de HJ exógena reverte o efeito antigonadotrópico (BOWERS & MARTINEZ-PARDO, 1977), foi sugerido o termo anti-allatotrópico para o efeito do precoceno como sendo melhor do que anti-hormônio juvenil (BOWERS & MARTINEZ-PARDO, 1977; SLÁMA, 1978).

#### 1. Precoceno como "antifeedant"

"Antifeedants" são substâncias que, quando testadas pelos insetos, podem provocar a cessação temporária ou permanente da alimentação (NAKANISHI, 1976). Este termo é relacionado aos componentes que não destroem diretamente os insetos, mas que podem determinar a morte por jejum prolongado (MUNAKATA, 1975). Segundo SLÁMA (1978), a característica química da maioria destas substâncias é representada por um anel aromático metoxilado que corresponde à estrutura do precoceno. Este mesmo autor observou que o tratamento de precoceno II em *Pyrrhocoris*, *Dysdercus* e *Galleria* suprimia a alimentação, inibindo o desenvolvimento dos estádios imaturos destas espécies. Entretanto, os resultados encontrados variaram dependendo da espécie de inseto, modo de aplicação e, principalmente, da dose de precoceno. A especificidade dos "antifeedants" já havia sido reportada por outros autores como MUNAKATA (1975) e NAKANISHI (1976).

## 2. Atividade anti-allatotrópica do precoceno

Nos insetos Heteróptera tem-se demonstrado que o precoceno, em aplicação tópica ou por contáto, é capaz de inibir o crescimento do CA (BOWERS & MARTINEZ-PARDO, 1977) ou determinar uma considerável atrofia desta glândula (PENER *et al.*, 1978; UNNITHAN *et al.*, 1977; UNNITHAN & NAIR, 1979). Estudos em microscopia eletrônica revelaram que em *O. fasciatus* (UNNITHAN *et al.*, 1977) e *Locusta migratoria* (SCHOONEVELD, 1979) o tratamento de precoceno provoca uma rápida degradação das células parenquimatosas do CA e que, alguns dias após, os hemócitos migram para este local, promovendo uma autofagia do material celular que restou.

A observação de que o precoceno II tem efeito allatotrópico somente em ninfas de 4º estágio de *Oncopeltus*, e não nas ninfas de 5º estágio, levou os autores a considerar que o Ageratocromeno é mais efetivo nos estágio em que o CA se encontra em maior atividade (UNNITHAN & NAIR, 1979).

Presume-se que o CA ativado rapidamente metaboliza o precoceno a produto citotóxico que inibe e destrói a glândula (BROOKS *et al.*, 1979; PRATT *et al.*, 1980).

Quando se mantém o CA *in vitro*, a adição de precoceno II ao meio provoca um rápido declínio da atividade desta glândula na síntese de HJ, indicando um possível efeito direto da droga sobre o CA (MULLER *et al.*, 1979; PRATT & BOWERS, 1977).

A reimplantação do CA (tratado com precoceno *in vi-*

tro ou obtido a partir de insetos que receberam previamente a droga) não restaura a atividade da glândula, indicando a irreversibilidade da ação citotóxica (MULLER et al., 1979; MASNER et al., 1979).

Desta forma, tem sido constatado por vários autores que o precoceno não só afeta o desenvolvimento do CA irreversivelmente, como interfere na produção de HJ por esta glândula.

### 3. Atividade do precoceno sobre a metamorfose e a reprodução

Em recentes trabalhos, tem sido reportado que a atividade anti-allatotrópica dos derivados do Ageratocromeno promove a metamorfose precoce em estádios imaturos de Heteróptera. Assim, entre os hemípteros, o tratamento de ninfas de 1º, 2º e 3º estágio (BOWERS et al., 1976) ou de 4º estágio (UNNITHAN & NAIR, 1979) de *O. fasciatus* com precoceno II resulta na produção de adultos protetélicos (Adultóides). Dependendo das condições de aplicação do precoceno ou do período em que as ninfas são tratadas, o precoceno pode induzir o aparecimento de um estágio intermediário que antecede a metamorfose precoce (UNITHAN & NAIR, 1979).

O tratamento tópico ou por contato de precoceno II em outras espécies de hemípteros (*Dysdercus cingulatus*, *Lygaeus kalmii*, *R. prolixus*) e ortópteros (*Shistocerca gregaria* e *Locusta migratoria*) também induz protetelia nos estádios jovens (BOWERS et al., 1976; TARRANT & CUPP, 1978; SLÁMA,

1978; PENER *et al.*, 1978; UNNITHAN *et al.*, 1980).

Nos Heteroptera adultos, por outro lado, o precoceno induz esterilidade, quando aplicado em fêmeas recém mudadas, possivelmente pela diminuição da produção de hormônio juvenil, e assim, interferindo no processo de vitelogenese (BOWERS *et al.*, 1976; BOWERS & MARTINEZ-PARDO, 1977; UNNITHAN *et al.*, 1977).

Em outros grupos de insetos, especialmente Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, o precoceno atua somente alterando a fertilidade (BOWERS & MARTINEZ-PARDO, 1977; LANDERS & HAPP, 1980), sendo discutível sua ação morfogenética.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### A. ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE *Rhodnius prolixus*

Neste trabalho foram utilizadas ninfas de 3° e 4° estágio de *R. prolixus*, pesando respectivamente  $4,47 \pm 0,12$  mg e  $10,36 \pm 0,40$  mg, separadas ao acaso de uma colônia criada e mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Estado do Rio de Janeiro. Sua manutenção foi feita segundo as condições descritas por GARCIA et al., (1975). Os insetos eram mantidos em temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa que variava de 50 a 60%.

Os insetos eram alimentados com sangue humano heparinado (10 U heparina/ml, sendo a heparina proveniente da Sigma Chemical Company) 10 a 20 dias após a última muda, através de um sistema artificial descrito por GARCIA et al., (1975).

#### B. ADMINISTRAÇÃO DE PRECOCENO II, ECDISONA E ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL

Para os diferentes grupos que participaram das experiências foi fixado o tempo de 45 minutos de exposição dos insetos ao sistema de alimentação. Após este tempo, os insetos que não picavam a membrana de alimentação eram descartados da experiência e a quantidade de sangue ingerida

era estimada pela pesagem dos insetos antes e imediatamente após a alimentação. Após o tratamento, os insetos eram observados diariamente, para que o número de ecdises fosse computado.

#### 1. Administração de precoceno II

Antes da administração de precoceno II<sup>1</sup> procedeu-se à preparação de uma solução concentrada desta droga dissolvendo-a em etanol de maneira a dar uma concentração final de 10 mg/ml. Alíquotas desta solução eram misturadas ao sangue alimentar, de modo a ter-se 10 a 300 µg de precoceno II/ml de sangue.

#### 2. Administração de ecdisona

Antes da administração de ecdisona (Simes, Milão) preparou-se uma solução concentrada deste hormônio em etanol - NaCl (1:4) de modo a dar uma concentração final de 1 mg/ml. Alíquotas desta solução eram diluídas no sangue de maneira a ter-se uma concentração final de 5 µg de ecdisona /ml de sangue.

---

<sup>1</sup> Gentilmente cedido pelo Dr. W.S. BOWERS, New York State Agriculture Experimental Station, Cornell University, Geneva, N.Y.

### 3. Administração de hormônio juvenil

Para a aplicação de um análogo de hormônio juvenil (epoxifarnesoato de metila)<sup>2</sup> diluiu-se a droga diretamente em heptana (Matheson Coleman & Bell). Um dia após a alimentação, 1 ml da solução, contendo 50 mg de HJ, era aplicado tópicamente nos tergitos abdominais dos insetos, com auxílio de uma microsseringa (Hamilton Company).

#### C. CONTAGEM DE PONTOS DO GRAU DE PROTETELIA

O grau de características morfológicas imaginiais obtido nos insetos recém-mudados era baseado no sistema de contagem de pontos desenvolvido por WIGGLESWORTH (1969). Este autor considerou escalas de 0-6 para o abdômen, de 0-4 para a genitália de cada sexo, de 0-5 para o tórax, de 0-2 para as patas e de 0-2 para a cabeça. Neste sistema, um adulto normal atingia o valor total de 0 (zero) e uma ninfa normal o valor total de 19. Os adúlóides receberam valores entre 0 e 19.

Se ocorresse ecdise incompleta nos insetos tratados, a cutícula velha era removida com auxílio de uma lupa para a avaliação das possíveis características imaginiais.

<sup>2</sup>Gentilmente cedido pelo Dr. F.B. UBATUBA, Universidade de Brasília.

#### D. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Para o estudo das GP de *R. prolixus* foi utilizado o método de coloração pela Hematoxilina de Hansen (GABE, 1968). Os lobos gordurosos internos torácicos, região onde se encontram as GP, eram previamente isolados segundo a técnica de WIGGLESWORTH (1952) e submetidos à fixação pelo líquido de Carnoy (GABE, 1968) durante 15 a 30 minutos.

Na observação das CNS do tipo A e A', a coloração *in toto* pela Fuccina Paraldeídica (FP) foi executada segundo a técnica histológica descrita por DOGRA & TANDAN (1964). Os cérebros inteiros eram previamente fixados pelo líquido de Bouin (GABE, 1968) por 12 a 24 horas.

Para evidenciação das células do tipo A e do CA o sistema neurosecretor foi fixado pela formalina (NaCl 0,15M e formol a 40%, na proporção de 9:1) durante 24 a 36 horas e corado pelo Azul Vitória (DOGRA & TANDAN, 1964).

Os materiais descritos acima (processados por métodos histológicos) foram montados entre lâmina e lamínula, utilizando Bálsamo do Canadá, e submetidos posteriormente a observação em microscópio ótico.

#### IV. RESULTADOS

##### A. EFEITO DO PRECOCENO II SOBRE A ALIMENTAÇÃO

Para verificar o efeito do precoceno II na alimentação, foram testados grupos de 20-30 insetos de 3° e 4° estádios de ninfa, que receberam sangue Contendo solvente ou sangue contendo 10, 30, 60 ou 100 mg de precoceno II por ml de sangue.

A média de peso de sangue ingerido por inseto foi relacionada com a concentração de precoceno no alimento conforme demonstra a Fig. 2. Estas experiências mostram que não há uma inibição total da sucção de sangue nos insetos que se alimentaram com sangue contendo precoceno, mas sim uma diminuição sensível do volume de sangue ingerido pelos insetos.

##### B. EFEITO TÓXICO DO PRECOCENO II

O efeito tóxico do precoceno II, adicionado na dieta, foi testado pela mortalidade de *Rhodnius*. Grupos de 20-30 insetos de 3° e 4° estádios de ninfa foram alimentados com sangue contendo solvente ou sangue contendo 30, 100 e 300 mg de precoceno II por ml de sangue. A percentagem de mortalidade relacionada ao tempo após o tratamento está representada na Fig. 3. A estimativa da dose de precoceno ingerida por inseto (baseada na quantidade de alimento consumido) nas concentrações de 30; 100 e 300  $\mu\text{g}$  de precoceno por ml de sangue

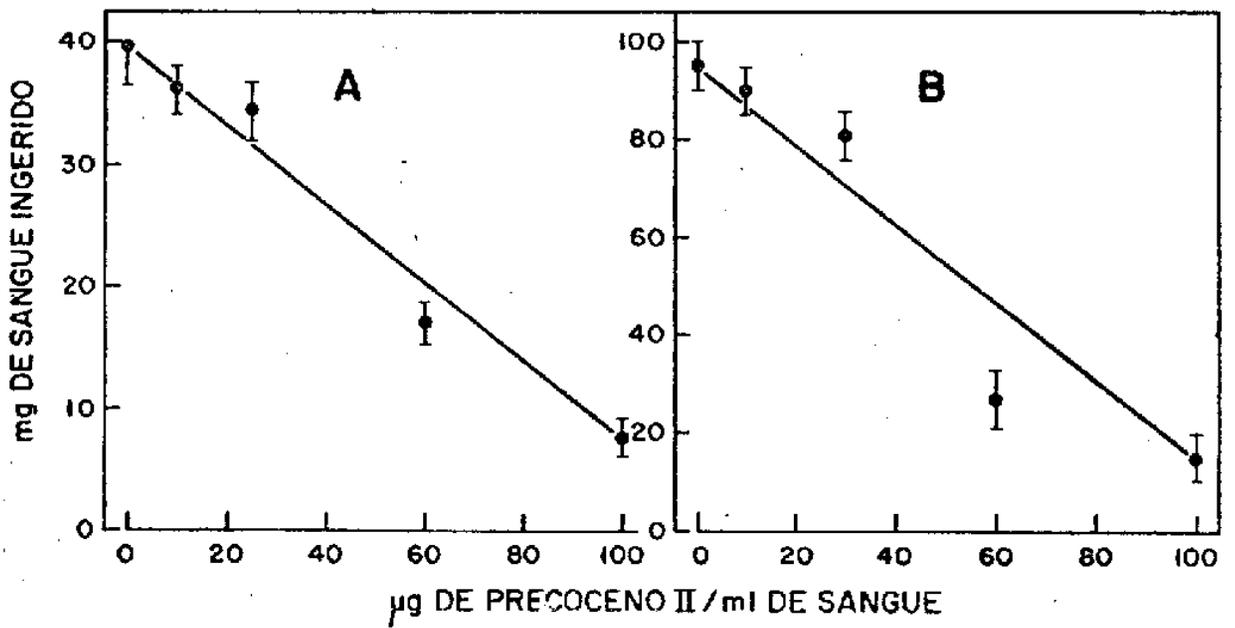


FIGURA 2. Efeito do precoceno II sobre a quantidade de sangue ingerida por *Rhodnius prolixus*. A) 3° estágio; B) 4° estágio.

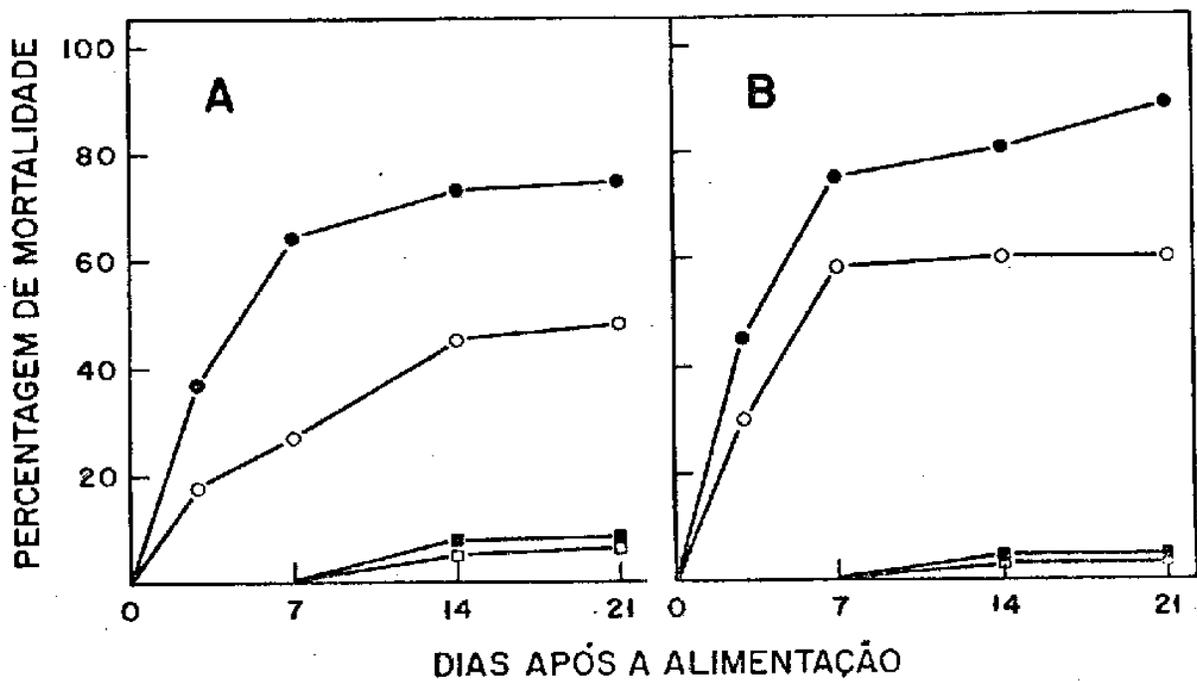


FIGURA 3. Percentagem acumulativa da mortalidade de *Rhodnius prolixus* após o tratamento de precoceno II: A) 3º estágio; B) 4º estágio. (■) controle (■) 30 µg de precoceno/ml; (○) 100 µg de precoceno/ml; (●) 300 µg de precoceno/ml de sangue.

foi de respectivamente  $1,09 \pm 0,03$ ;  $0,77 \pm 0,10$  e  $1,50 \pm 1,20$   $\mu\text{g}$  para cada ninfa de 3° estágio e  $1,77 \pm 0,04$ ;  $1,47 \pm 0,09$  e  $1,50 \pm 1,20$   $\mu\text{g}$  para cada ninfa de 4° estágio. Além disto, foi observado que a mortalidade nos grupos de insetos tratados com precoceno em concentrações superiores a 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sangue era superior a encontrada no grupo controle. Assim, observa-se claramente que a letalidade foi proporcional a concentração de precoceno diluído no sangue e não a dose da droga ingerida por inseto.

#### C. EFEITO DO PRECOCENO II SOBRE A PREVENÇÃO DA ECDISE

O efeito do precoceno II sobre a prevenção da ecdise foi estudado em grupos de 20-30 insetos de 3° e 4° estádios de ninfa alimentados com sangue contendo 10 a 30  $\mu\text{g}$  de precoceno por ml de sangue. Como já foi visto anteriormente (Fig.2), estas doses não são suficientemente altas para afetar significativamente a alimentação.

A percentagem de ecdise relacionada com os dias após a alimentação (Fig. 4) indica que, enquanto no grupo controle 100% de muda foi alcançado em 14 e 16 dias após a alimentação respectivamente no 3° e 4° estádios de ninfa, nos lotes tratados com precoceno o período de intermuda foi progressivamente retardado em função da concentração de precoceno no sangue. Além disto, foi também observado que os insetos que receberam a droga não atingiram a percentagem de muda do lote controle até o 24° dia. Após este período, a observa-

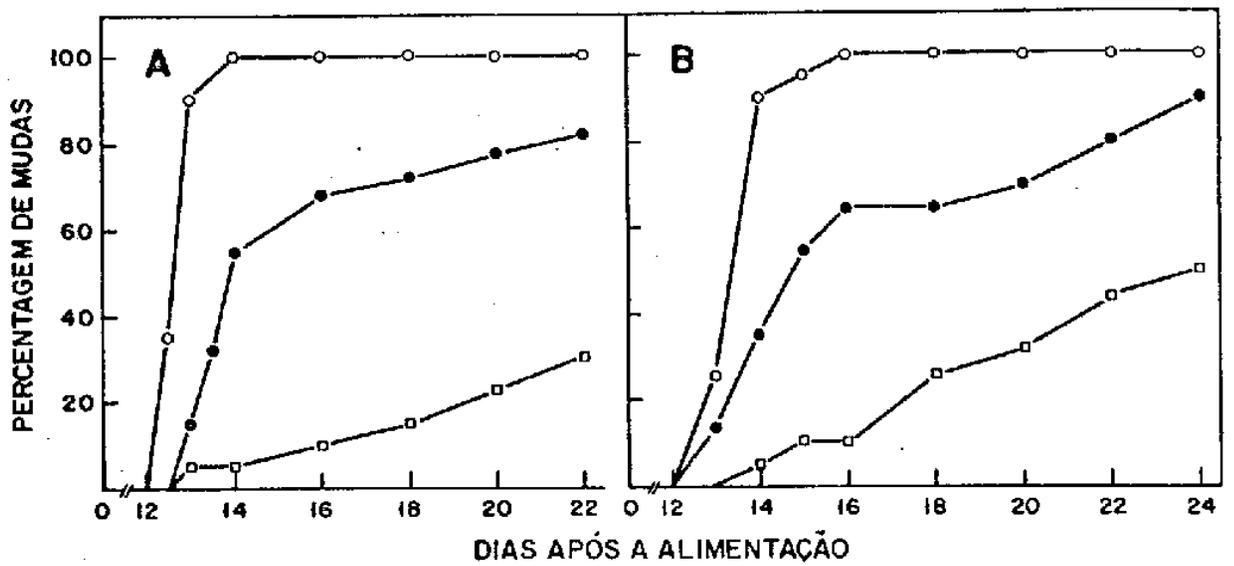


FIGURA 4. Efeito do precoceno II sobre a prevenção da muda de 3° (A) e 4° estágio (B) de *Rhodnius prolixus*: (○) controle; (●) 10 µg de precoceno/ml; (□) 30 µg de precoceno/ml de sangue.

ção dos diferentes grupos tratados até o 40° dia não resultou em percentagem maior de ecdise indicando inibição completa da muda em alguns casos.

#### D. RELAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DA INTERMUDA E O GRAU DE METAMORFOSE DAS NINFAS TRATADAS COM PRECOCENO II

A observação do efeito morfogenético do precoceno II, baseada nas características da cutícula abdominal, tórax, patas, cabeça e genitália (WIGGLESWORTH, 1969), indicou diferentes graus de metamorfose prematura de ninfas tratadas com precoceno. Adultóides perfeitos de 4° e 5° estádios, obtidos respectivamente do tratamento de 3° e 4 estádios de ninfas, apresentavam cutícula abdominal e genitália completamente adultas; ocelos e órgãos adesivos estavam presentes. O tórax completamente desenvolvido apresentava asas, meso e metatorácica. As asas mesotorácicas, divididas em córium e membrana, se apresentavam bastante reduzidas, nunca atingindo tamanho superior a 1/3 da asa do adulto normal. Algumas destas características podem ser observadas na Fig. 5.

A contagem dos pontos das características morfológicas dos insetos obtidos de 4° estágio tratado com precoceno (30 µg/ml) foi relacionada ao período de tempo entre a última alimentação e a ecdise, conforme mostra a Fig. 6. A correlação entre os dois parâmetros foi altamente significativa (coeficiente de correlação de 0,64,  $p < 0,01$ ), sugerindo que a influência do precoceno II na duração da intermuda é direta-

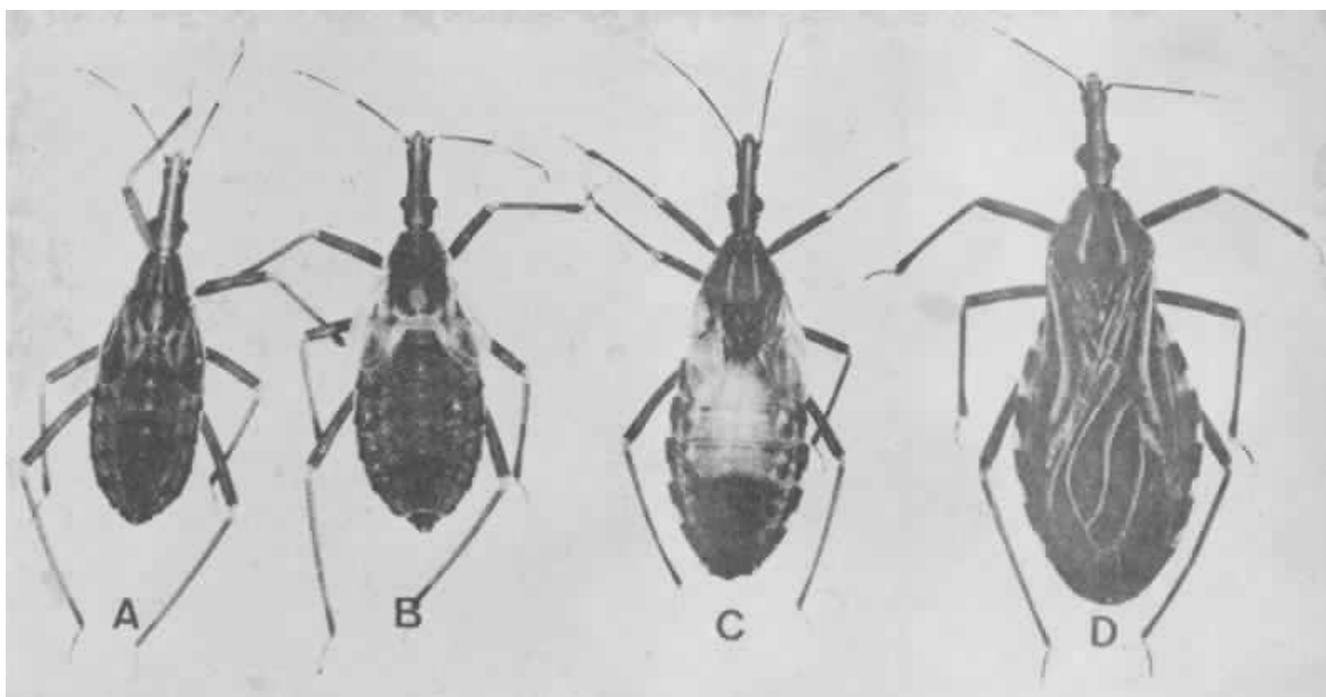


FIGURA 5. Características morfológicas dos insetos que sofreram muda de 4º estágio de *Rhodnius prolixus* tratados com precoceno II (30µg/ml de sangue): A) ninfa de 5º estágio, normal; B) adultóide com característica predominantemente de ninfa; C) adultóide com característica predominantemente imaginal; D) adulto normal. Aumento de 3,5x

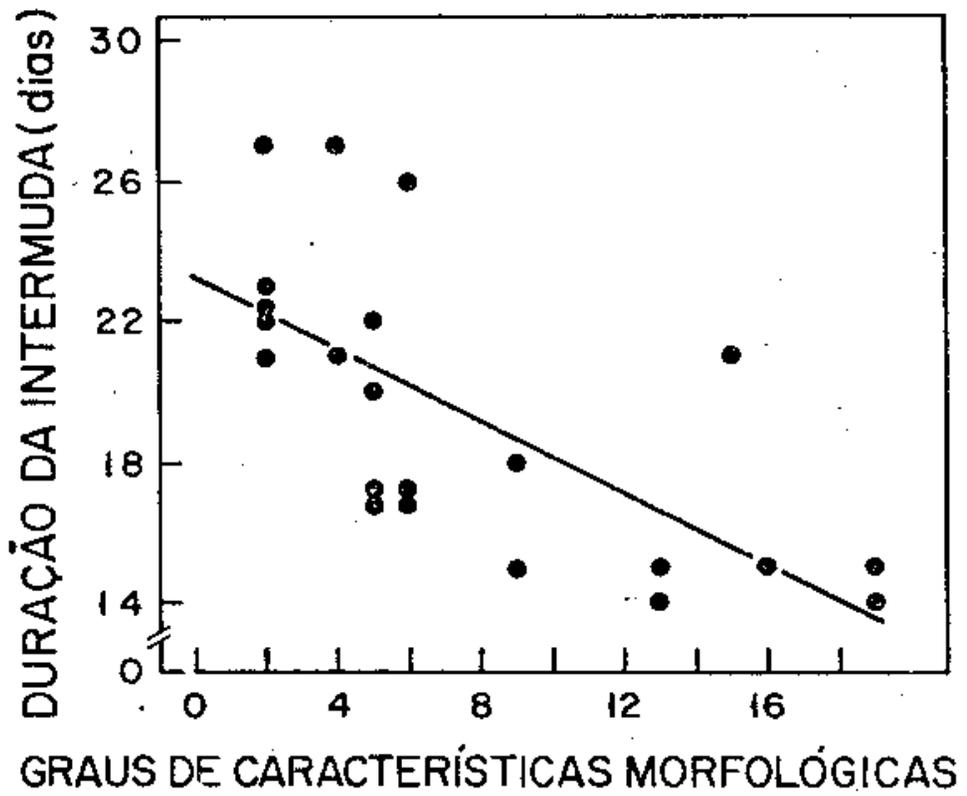


FIGURA 6. Efeito do precoceno II (30 $\mu$ g/ml de sangue) sobre a duração da intermuda e o grau de metamorfose de 4<sup>o</sup> estágio de *Rhodnius prolixus*: adulto normal, 0 ponto; ninfa normal, 19 pontos.

mente relacionada ao grau de metamorfose. Os adultos precoces de *R. prolixus* com características predominantemente de ninfas (Fig. 5B) foram obtidos, principalmente, nos primeiros dias em que foram observadas as ecdises, enquanto que os insetos que sofreram maior atraso no período da intermuda apresentavam desenvolvimento completo das características imaginais (Fig. 5C).

Foi também notado (Tabela 1) que as formas adultóides com caracteres imaturos (contagem maior que 12) foram capazes de se alimentar e iniciar a próxima ecdise resultando em grau mais elevado de metamorfose. Embora a ecdise se tenha iniciado e estes insetos apresentassem as GP, esta não foi completa e os insetos morreram durante o processo, não conseguindo desvencilhar-se da cutícula velha.

Os adultos precoces com características predominantemente imaginais não apresentavam GP 5 dias após a muda. Estes insetos não se alimentavam quando expostos a sangue humano, embora tenha sido observada atração à fonte de alimento no comedouro artificial (Tabela 1).

#### E. EFEITO DA ECDISONA NA PREVENÇÃO DA ECDISE PROVOCADA PELO PRECOCENO II

Os diferentes grupos tratados com precoceno II e/ou ecdisona foram comparados para avaliação do efeito da ecdisona sobre a prevenção da ecdise provocada pela droga. Ninfas de 4º estágio de *R. prolixus* foram alimentadas com 20 µg de precoceno II por ml de sangue (Grupo 2), 20 µg de precece-

TABELA 1. Grau de metamorfose e capacidade de muda dos adultóides obtidos do tratamento de precoceno II (20-30 µg/ml de sangue) de 4º estágio de *Rhodnius prolixus*

Nº de Insetos	Graus de Adultóides	Alimentação *	Glândulas Protorácicas **	Ecdise
20	> 12	+	+	+
21	< 12	-	-	-

\* Os insetos foram expostos à alimentação 10-20 dias após a muda.

\*\* Foram usados para a observação das glândulas protorácicas 10 insetos no 5º dia após a muda.

no II + 5  $\mu\text{g}$  de ecdisona por ml (Grupo 3). O grupo controle recebeu somente ecdisona na concentração de 5  $\mu\text{g}$  por ml (Grupo I). Pode ser observado (Tabela 2, Fig. 7) que, enquanto no Grupo controle 100% dos insetos mudaram entre 14 e 18 dias após a alimentação, os insetos que receberam precoceno (Grupo 2) tiveram o período de intermuda estendido até 28 dias e somente 68% deles sofreram ecdise. No Grupo 3, alimentados com precoceno e ecdisona, 98% dos insetos mudaram em um período de 14 a 28 dias após a alimentação e foram obtidos 89% de adultóides protetélicos.

No 22° dia após a alimentação, a comparação das percentagens de ecdise dos grupos tratados com precoceno (Grupo 2) e precoceno + ecdisona (Grupo 3), respectivamente de 40% e 70%, indicou diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre os resultados. Da mesma forma, a comparação das percentagens de ecdise (total de insetos que mudaram) obtidas no 28° dia após a alimentação entre os dois grupos também demonstrou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste X<sup>2</sup> (Tabela 2, Fig. 7).

Nesta experiência não foi notada alteração da atividade morfológica induzida pelo precoceno II quando os insetos foram tratados simultaneamente com ecdisona.

#### F. EFEITO DO ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL SOBRE A PREVENÇÃO DE ECDISE E INDUÇÃO DE METAMORFOSE PRECOCE

O efeito do hormônio juvenil exógeno (HJ) foi testado nos insetos tratados com precoceno II a fim de se avali-

TABELA 2. Efeitos da ecdisona sobre o período da intermuda e indução de metamorfose precoce em 4° estágio de ninfa de *Rhodnius prolixus* tratada com precoceno II

Grupos	Tratamentos		Nº de Insetos	Sangue ingerido (mg) $\bar{X} \pm$ E.P.	% de mudas		% de adultóides (em relação ao total de mudas)
	Precoceno ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ecdisona ( $\mu\text{g/ml}$ )			22 dias após a alimentação	28 dias após a alimentação	
1	-	5	40	94,8 $\pm$ 6,9	100	100	0
2	20	-	40	92,5 $\pm$ 7,7	40**	68*	63 <sup>NS</sup>
3	20	5	40	89,8 $\pm$ 3,3	70**	98*	89 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença altamente significativa entre estes resultados quando analisados pelo teste  $\chi^2$

\* Diferença significativa entre estes resultados quando analisados pelo Teste  $\chi^2$

NS Diferença não significativa entre estes resultados quando analisados pelo teste  $\chi^2$

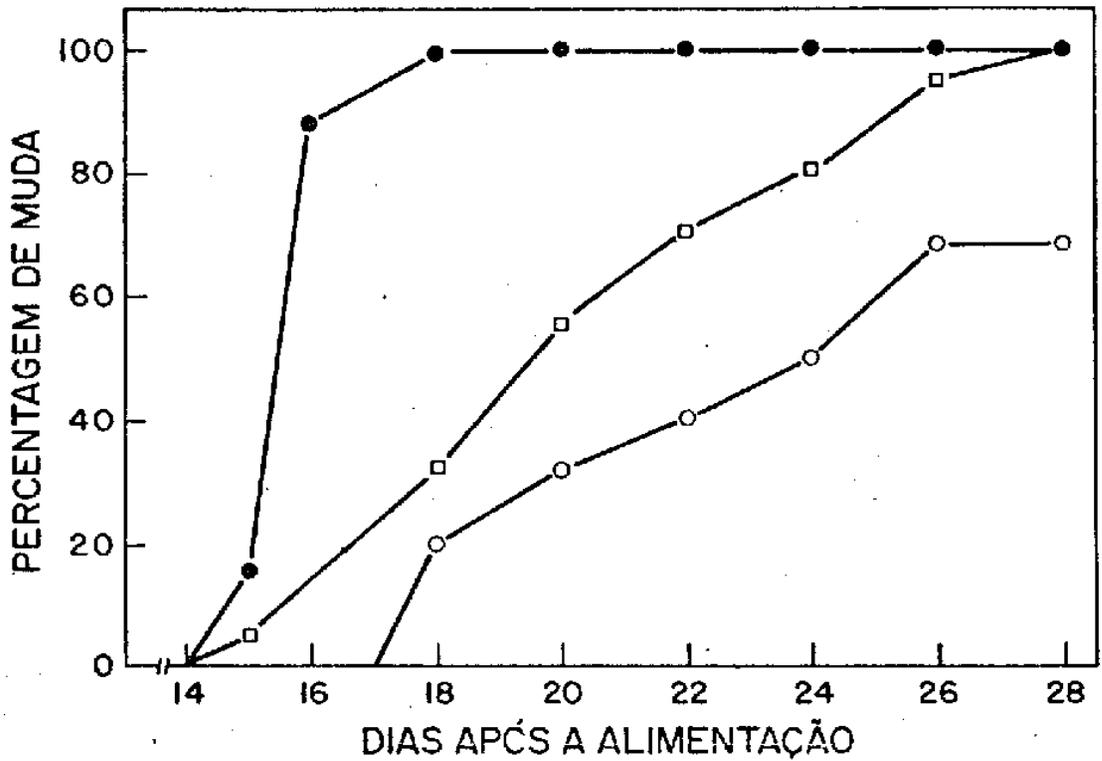


FIGURA 7. Efeito da ecdisona ( $5\mu\text{g/ml}$  de sangue) sobre a prevenção da muda provocada pelo precoceno II ( $20\mu\text{g/ml}$  de sangue) em 4º estágio de *Rhodnius prolixus* (●) controle; (○) precoceno; (◻) precoceno + ecdisona.

ar a possível reversão da indução de metamorfose precoce e prevenção de ecdise. Ninfas de 4º estágio de *Rhodnius* foram tratadas com 20 µg de precoceno II por ml de sangue (Grupo 2) e 20 µg de precoceno II + 50 µg de HJ por inseto (Grupo 3). O grupo controle recebeu somente HJ na dose de 50 µg por inseto (Grupo I). Na Tabela 3, é demonstrada a atividade morfo-genética do precoceno (Grupo 2) e a reversão deste efeito pelo HJ exógeno (Grupo 3). Conforme pode ser notado, até o 289 dia não foi observada metamorfose precoce em nenhum inseto que recebeu precoceno II + HJ, enquanto que a percentagem de adultóides obtida do tratamento de precoceno (Grupo 2) foi de 53%.

A prevenção da ecdise foi parcialmente revertida no 22º dia após a alimentação (Tabela 3, Fig. 8). Enquanto no Grupo 2 (tratado com precoceno) foram obtidos 28% de ecdise, no Grupo 3 (tratado com precoceno + HJ) 60% dos insetos sofreram muda (estes resultados, analisados pelo teste  $\chi^2$ , demonstraram diferença altamente significativa). Neste período o Grupo 1 (controle) já apresentava 100% de ecdise.

No 28º dia após a alimentação, a prevenção da ecdise provocada pelo precoceno não foi revertida pela aplicação tópica de HJ na dose testada. Não houve variação significativa da percentagem de muda total entre os dois grupos.

TABELA 3. Efeito do análogo de hormônio juvenil sobre o período de intermuda e indução de metamorfose precoce de ninfa de 4º estágio de *Rhodnius prolixus* tratada com precoceno II

Grupos	Tratamentos		Nº de Insetos	Sangue ingerido (mg) $\bar{X} \pm \text{E.P.}$	% de mudas		% de adultões (em relação ao total de mudas)
	Precoceno ( $\mu\text{g/ml}$ )	Análogo de Hormônio Juvenil ( $\mu\text{g/inseto}$ )			22 dias após a alimentação	28 dias após a alimentação	
1	-	50	40	89,6 $\pm$ 1,7	100	100	0
2	20	-	40	96,1 $\pm$ 3,0	28*	73 <sup>NS</sup>	53**
3	20	50	40	94,9 $\pm$ 4,7	60*	80 <sup>NS</sup>	0**

\*\* Diferença altamente significativa entre estes resultados quando analisados pelo teste  $\chi^2$

\* Diferença altamente significativa entre estes resultados quando analisados pelo teste  $\chi^2$

NS Sem diferença significativa entre estes resultados quando analisados pelo teste  $\chi^2$

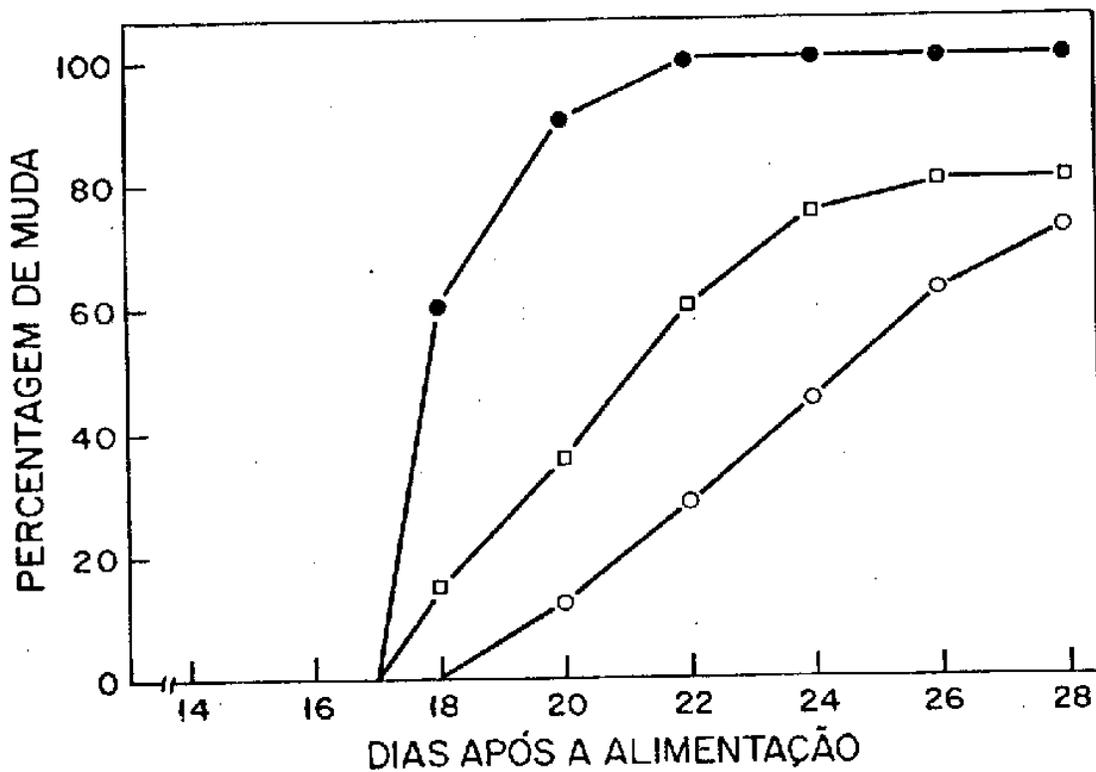


FIGURA 8. Efeito do análogo de hormônio juvenil (50  $\mu\text{g}$ /inseto) sobre a prevenção da muda provocada pelo precoceno II (20  $\mu\text{g}$ /ml de sangue) em 4º estágio de *Rhodnius prolixus* (●) controle; (○) precoceno; (□) precoceno + análogo de hormônio juvenil.

G. EFEITO DO PRECOCENO II SOBRE AS GLÂNDULAS PROTORÁDICAS (GP) E AS CÉLULAS NEUROSECRETORAS (CNS)

Com a finalidade de elucidar o efeito do precoceno sobre o desenvolvimento de 4º estágio de *R. prolixus*, foi estudada sua ação sobre as CNS localizadas na *pars intercerebralis* e as GP.

No 10º dia após a alimentação, 10 insetos de cada grupo foram separados e os lobos internos gordurosos torácicos e cérebres foram submetidos a técnicas histológicas para posterior observação das alterações das GP e CNS.

No grupo controle (alimentado com sangue), as GP dos insetos estavam bem desenvolvidas ocupando quase toda a superfície interna do lobo de tecido adiposo no qual estão situadas. O citoplasma com coloração mais intensa e os núcleos de formato alargado e de contorno mais irregular davam um aspecto característico de células em atividade de secreção (Fig. 9A).

No grupo tratado com precoceno (20 mg/ml de sangue) o exame histológico revelou que as GP se apresentavam com núcleos de formato alongado e citoplasma pouco abundante com algumas células em degeneração (Fig. 9B). Estas características mostram que o precoceno afeta a integridade funcional das GP.

A observação das CNS demonstrou que as células do tipo A não se apresentavam com diferenças aparentes entre o lote tratado com precoceno e o lote controle. Entretanto, po-

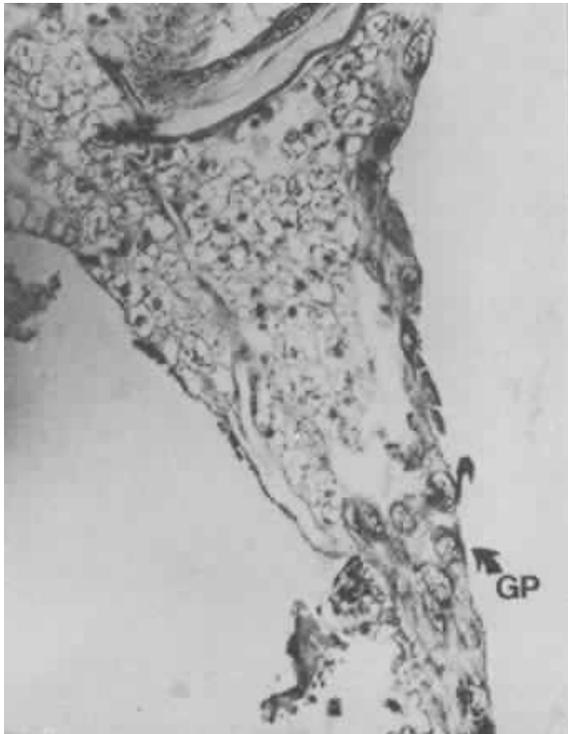
**A****B**

FIGURA 9. As glândulas protorácicas de *Rhodnius prolixus* A) no 10º dia após a alimentação do lote controle; B) do lote tratado com 20 µg de precoceno II por ml de sangue. Coloração pela Hematoxilina de Hansen. Aumento de 640x

de ser observada uma sensível variação no aspecto das células do tipo A' de ambos os grupos analisados. No grupo controle, as células A' estavam desprovidas de grânulos fuccinófilos como conseqüência, provavelmente, da liberação de neurosecreção dos pericários das células. Por outro lado, no grupo tratado com precoceno os insetos apresentaram estas células ricas em material neurosecretado (Fig. 10).

#### H. EFEITO DO PRECOCENO II SOBRE O *corpus allatum*, (CA)

Os sistemas neurosecretores de 20 ninfas de 4° estágio de *R. prolixus* controles e tratadas com precoceno (20 µg/ml de sangue) foram submetidos a técnicas histológicas no 10° dia após a alimentação. Neste período, o exame em microscopia ótica do complexo endócrino retrocerebral (corado pelo Azul Vitória) demonstrou que os CA dos insetos pertencentes ao grupo controle se mostravam desenvolvidos e de fácil evidência (Fig. 11A). No grupo tratado com precoceno, os CA pareciam ter regredido, não se tornando visíveis ao exame microscópico (Fig. 11B).

**A****B**

FIGURA 10. As células neurosecretoras da *pars intercerebralis* de *Rhodnius prolixus* A) no 10° dia após a alimentação do lote controle; B) do lote tratado com 20  $\mu\text{g}$  de precoceno II por ml de sangue. Coloração *in toto* pela fuccina paraldeídica das células A e A'. Aumento de 1280x

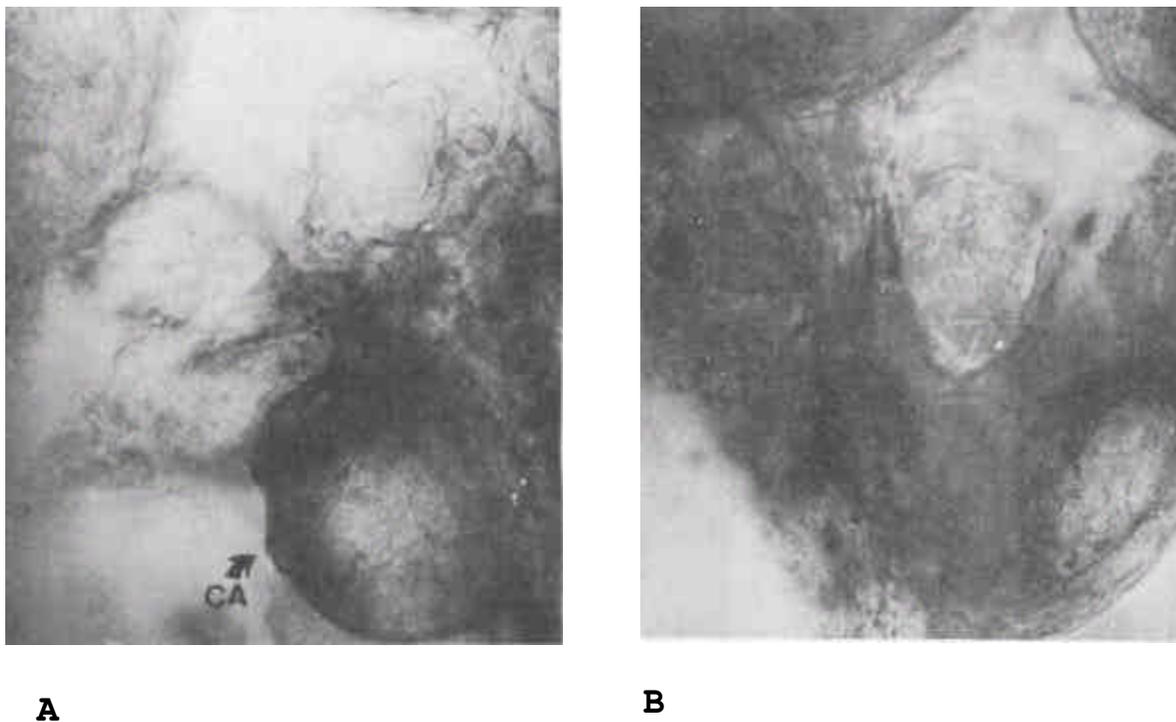


Figura 11. O complexo endócrino retrocerebral de *Rhodnius prolixus* A) no 10º dia após a alimentação do lote controle; B) do lote tratado com 20µg de precoceno II por ml de sangue. Coloração *in toto* pelo Azul Vitória. CA. *Corpus allatum*. Aumento de 1920x.

## V. DISCUSSÃO

### A. EFEITOS "antifeedant" E TÓXICO DO PRECOCENO II

Nos poucos trabalhos existentes sobre o efeito de substâncias com atividade "antifeedant" em insetos, os autores constataram que certas substâncias, quando acrescentadas à dieta, ou mesmo quando aplicadas topicamente ou por contato, provocavam um decréscimo no consumo de alimento (MUNAKATA, 1975; NAKANISHI, 1976).

No presente trabalho, foi possível demonstrar que o precoceno II, adicionado ao alimento, claramente interferiu na quantidade de sangue ingerida por ninfas de 3° e 4° estágio de *R. prolixus*. Esta atividade "antifeedant" foi proporcional a concentração da droga no alimento.

O envolvimento do precoceno II como inibidor da alimentação já tinha sido reportado por SLÁMA (1978) em alguns hemípteros fitófagos submetidos ao tratamento tópico ou oral, e por REMBOLD *et al.* (1979), que adicionaram o precoceno II à dieta de *Apis mellifera*. Entretanto, estes autores não verificaram a interferência da droga na quantidade de alimento ingerido pelo inseto, e sim constataram, através do decréscimo no ganho de peso corporal, o possível efeito inibidor da alimentação provocado pelo precoceno II.

Até o presente, o conhecimento do mecanismo de ação de substâncias como "antifeedant" não apresentou substancial interesse aos pesquisadores. Há uma idéia geral de que este

mecanismo pode envolver a interação da droga com o sistema nervoso central do inseto. Este assunto poderá ser objeto de estudos posteriores.

A toxicidade do precoceno II tem sido relatada em *A. aegypti* (KELLY & FUCHS, 1978), *A. mellifera* (REMBOLD *et al.*, 1979) e *L. migratoria* (CHÉNEVERT *et al.*, 1980), tendo estes autores observado que a percentagem de mortalidade estava relacionada à concentração de precoceno II aplicado, isto é, a toxicidade da substância era dose-dependente. Apesar de a evidência experimental indicar que o precoceno II estaria determinando a mortalidade por um possível efeito tóxico geral, outros estudos serão necessários para elucidar mais detalhadamente as causas desta letalidade.

#### B. EFEITO MORFOGÊNICO DO PRECOCENO II

Vários trabalhos foram anteriormente publicados mostrando o efeito do precoceno em induzir alta incidência de protetelia em ninfas de algumas espécies de insetos (TARRANT & CUPP, 1978; MASNER *et al.*, 1979; UNNITHAN *et al.*, 1980). Estes resultados, normalmente, tem sido obtidos pelo tratamento por contato em substrato impregnado com o precoceno ou por aplicação tópica da droga diretamente no abdômen, tornando-se difícil a quantificação efetiva da dose de precoceno por inseto.

Neste trabalho, o precoceno II foi administrado por via oral e pode ser facilmente quantificado pela medida do pe-

so de sangue ingerido pelo inseto. Desta forma, pode-se verificar o efeito morfogenético da droga em ninfas de *R. prolixus* que receberam doses de 50 a 200 vezes menores do que a aplicação tópica, geralmente utilizada em outros insetos. O tratamento de precoceno via oral se mostrou bastante eficaz sendo que na concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$  de sangue ocorreu a formação de até 63% de adultóides. TARRANT & CUPP (1978), trabalhando com o mesmo 4º estágio ninfal de *R. prolixus* obtiveram 40% de adultóides com uma dose por contato de 15  $\text{mg/cm}^2$ .

Tem sido reportado na literatura uma considerável variação nas características morfológicas resultantes da protetelia provocada pelo precoceno (PENER *et al.*, 1978; MASNER *et al.*, 1979). Assim, um mesmo estágio ninfal, tratado com determinada dose de precoceno, pode desenvolver características predominantemente de ninfa ou de adulto. As observações destas diferenças, no presente trabalho, puderam ser correlacionadas ao atraso da muda de 4º estágio de *Rhodnius*, indicando que o período de intermuda é prolongado nos insetos que apresentaram maior grau de metamorfose. Estes resultados não estão de acordo com os encontrados por TARRANT & CUPP (1978), pois estes autores observaram uma completa uniformidade nas características morfológicas dos adultóides.

Além disto, constatou-se neste trabalho que *R. prolixus* resultante de grau moderado de protetelia (em geral maior que 12 pontos) eram capazes de iniciar uma nova ecdise após a alimentação. Embora os adultóides com características predominantemente imaginais não se alimentassem, estes insetos es-

tariam incapacitados para sofrer nova ecdise devido a degeneração das glândulas protorácicas. A degeneração das GP ocorre normalmente logo após a muda imaginal, tornando o adulto incapaz de mudar (WIGGLESWORTH, 1952). Achados similares a estes foram reportados por MASNER *et al.* (1979) em *O. fasciatus* tratados com precoceno. De fato, os adultóides perfeitos obtidos do tratamento só puderam iniciar nova ecdise quando neles era injetada ecdisona.

#### C. A REVERSÃO DOS EFEITOS DO PRECOCENO II PELA ECDISONA E ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL

O conhecimento do mecanismo da ação hormonal sobre o processo cíclico do crescimento nos insetos foi incrementado quando hormônios naturais ou análogos estruturais sintéticos, e mesmo drogas que interferem na produção de hormônios, se tornaram disponíveis aos pesquisadores.

Na introdução deste trabalho, foi enfatizado ao fato de que o desenvolvimento dos insetos está mutuamente inter-relacionado com a integração funcional endócrina. É praticamente impossível avaliar os efeitos das drogas que afetam o crescimento dos insetos sem analisar seus efeitos no equilíbrio hormonal responsável pela muda. Nesta etapa final da discussão, pretende-se analisar os resultados obtidos à luz dos feitos do precoceno com a inter-relação hormonal de *H. prolixus*.

Além da indução da metamorfose precoce e do retarda-

mento da muda (conforme já foi discutido), foi observada também, em alguns casos, a inibição da ecdise dos insetos tratados com precoceno II. A observação de que o precoceno adicionado ao alimento inibe a liberação de neurosecreção das CNS localizadas na *pars intercerebralis*, e de além disso provocar atrofia das GP durante o período de intermuda foi coerente com a constatação da prevenção da ecdise. Sabe-se que em *Rhodnius* as CNS medianas são ativadas após a alimentação do inseto (STEEL & HARMSSEN, 1971) produzindo o HPTT que estimula as GP a secretarem ecdisona (GILBERT *et al.*, 1980; STEEL, 1973, 1975). Com base no fato de que o tratamento simultâneo de precoceno e ecdisona reverteu o retardamento e a inibição da muda, conclui-se que o precoceno impede o processo normal de muda devido a seu efeito sobre as CNS e direta ou indiretamente, sobre a GP, resultando assim na diminuição da taxa de ecdisona endógena.

BAEHR (1975) observou que em 4° estágio submetido allatectomia e 5° estágio normal de *R. prolixus* tratado com ecdisona, este hormônio age lentamente tendo pouco ou nenhum efeito juvenilizante, ao passo que o tratamento com ecdisterona promove uma apólise mais rápida do que a ecdisona, impedindo a metamorfose completa dos insetos tratados. Desta forma, pôde ser demonstrada a importância do período de intermuda no processo de metamorfose. Neste trabalho, a relação do período de intermuda e das características morfológicas nos exemplares de *Rhodnius* tratados com precoceno ou simultaneamente precoceno e ecdisona, não apresentou diferença significativa

entre os dois grupos, confirmando assim os achados de BAEHR (1975; 1976).

No presente trabalho, a drástica atrofia do CA observada em *R. prolixus* no 10º dia após o tratamento oral com precoceno resulta provavelmente da rápida degeneração das células parenquimatosas da glândula. Esta degeneração pôde ser demonstrada em ninfas de *Locusta migratoria* e fêmeas adultas de *Oncopeltus fasciatus* tratadas topicamente com precoceno. Nestas espécies, o CA, submetido a estudo de microscopia eletrônica, indicou que no final de algum tempo as células íntegras restantes eram fagocitadas, resultando assim na completa destruição da glândula (SCHOONEVELD, 1979; UNNITHAN *et al*, 1977). Por outro lado, MASNER *et al*, (1979) observaram que o tratamento com precoceno (por contato) de fêmeas adultas impediu o crescimento da glândula de somente um terço em relação ao grupo controle, enquanto BOWERS & MARTINEZ-PARDO (1977), nesta mesma espécie, caracterizaram o efeito do precoceno em inibir o crescimento do CA, não modificando o volume inicial da glândula.

Recentemente, algumas evidências bioquímicas têm revelado a importância da atividade do CA na metabolização do precoceno, levando à formação de um produto citotóxico para a própria glândula (BROOKS *et al.*, 1979; PRATT *et al.*, 1980). Esta observação está de acordo com os achados de MIALL & MORDUE (1980) em 5º estágio de *Locusta*, quando constataram que a degeneração relativa da glândula dependia da época em que era aplicado o precoceno. Assim, as diferenças

entre os resultados reportados neste estudo e em trabalhos de outros autores, quanto ao efeito anti-allatotrópico do precoceno em promover a inibição do crescimento ou a atrofia do CA, devem ter resultado principalmente das condições fisiológicas em que se encontraram os insetos, do estado de atividade da CA, da dose e do modo de aplicação da droga.

PRATT & BOWERS (1977) demonstraram *in vitro* o comprometimento do CA em diminuir a secreção de hormônio juvenil quando era acrescentado precoceno II ao meio em que as glândulas eram cultivadas.

De maneira geral, pode-se pensar que a indução de metamorfose precoce provocada pelo tratamento de precoceno II (adicionado à dieta) resulta do efeito anti-allatotrópico da droga, em promover não só a atrofia da glândula como também a diminuição do nível de HJ endógeno. Esta hipótese pôde ser reforçada neste trabalho, pela observação de que a aplicação de epoxi farnesoato de metila (análogo de HJ) um dia após o tratamento com precoceno impediu a metamorfose precoce das ninfas de 4º estágio de *R. prolixus*.

Em *O. fasciatus*, as modificações nas características das células neurosecretoras do tipo A, levaram os autores a sugerir um efeito indireto do precoceno na inativação dos CA (UNNITHAN *et al*, 1978). Algumas evidências demonstram serem estas células as responsáveis pela produção do hormônio que ativa os CA (JOHANSON, 1958).

Parece provável que em *R. prolixus* exista um sistema de controle do CA semelhante ao que existe no *Oncopeltus*.

BAEHR (1976) em *Rhodnius* cauterizou *pars intercerebralis* em tempos diversos após a alimentação e demonstrou que a cauterização até 24 horas após o repasto provocava um efeito similar ao da allatectomia.

Em adição aos efeitos morfogênicos do precoceno, foi observado neste trabalho que insetos tratados com esta droga apresentavam um retardamento ou mesmo inibição da ecdise. A similaridade deste resultado com outros reportados na literatura, sugere que o HJ influencia não somente a produção de adúltoídes como a duração do período de intermuda. A aplicação de um análogo de HJ em insetos tratados com precoceno diminuiu, parcialmente, a duração da intermuda, além de inibir a produção de insetos protetélicos. BARRETT (1974) verificou o efeito da aplicação tópica de análogo de HJ sobre a duração do período de intermuda em 5º estágio de *R. prolixus* e constatou que o análogo não somente impedia a completa metamorfose como promovia uma sensível diminuição do tempo entre a alimentação e a ecdise. Conclusões semelhantes foram obtidas por DUMSER & DAVEY (1975), ao trabalharem com 4º estágio de *R. prolixus* submetidos à allatectomia tratados com HJ. Além destes fatos, BAEHR (1975) relatou que o HJ parece ser indispensável no processo da muda, desde que a allatectomia de ninfas de 4º estágio de *R. prolixus* inibia 93% da muda. Esta hipótese foi sustentada por BAEHR (1975), pelo fato de que a aplicação do análogo de HJ restabelecia 62% da muda nos insetos submetidos à allatectomia. Ainda BAEHR (1975) mostrou que os insetos sem CA sofriam ecdise quando recebiam, ao invés de HJ, ecdisona. Os resultados apresentados no presente trabalho mostram semelhança aos resul-

tados de BAEHR (1975): foi observado que insetos que recebiam precoceno tinham o período de intermuda reduzido quando eram tratados simultaneamente com HJ ou ecdisona.

A função do HJ no processo da muda é ainda de conhecimento escasso e fragmentario e está sujeita a especulações. O tratamento de HJ, ou a implantação de CA ativa em algumas espécies de lepidópteros em diapausa, induziram a muda (KRISHNAKUMARAN & SCHNEIDERMAN, 1965). A mesma resposta não ocorreu quando era usado abdômen isolado de pupa, indicando, assim, que o tecido alvo do HJ, neste caso, não seria as células epidermais e sim, provavelmente, as GP (OBERLANDER & SCHNEIDERMAN, 1966).

Foi observado que o precoceno afetou as GP em ninfas de *Rhodnius*. Deste modo, a reversão parcial, obtida pelo tratamento com análogo de HJ, da prevenção ou mesmo da inibição da ecdise produzida pelo precoceno, poderia resultar de uma indução protoracicotrópica do HJ favorecendo a produção de ecdisona. Não se pode esquecer, entretanto, que explicações alternativas seriam também pertinentes, como por exemplo, a de poder o HJ induzir uma descarga de material neurosecretado (hormônio protoracicotrópico) conforme foi constatado por DAVEY (1971) em *Phocanema decipiens*. Assim, as ninfas de *R. prolixus* tratadas com precoceno poderiam descarregar o HPTT das células A' que, como já foi visto, estavam carregadas de material neurosecretado, quando tratadas com análogo de HJ. O HPTT, como se sabe, pode induzir as GP a produzir ecdisona, diminuindo, assim, o período de intermuda e aumentando o

número de mudas, nos insetos tratados com precoceno. Também se poderia supor que as duas hipóteses relatadas ocorressem simultaneamente.

Estes fatos estão de acordo com a hipótese de que o precoceno II pode ser utilizado para a investigação da inter-relação cérebro-CA-GP. Com a finalidade de esclarecer mais detalhadamente alguns aspectos levantados na presente discussão, outros estudos estão sendo conduzidos em continuidade a este trabalho.

## VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados neste trabalho com *Rhodnius prolixus*, conclui-se:

### A. Para ninfas de 3° e 4° estágio

1. o precoceno II em concentrações acima de 30  $\mu\text{g/ml}$  de sangue apresenta *atividade "antifeedant"*, diminuindo a quantidade de sangue ingerida pelos insetos;
2. em doses acima de 30  $\mu\text{g/ml}$  de sangue o precoceno II apresenta efeito tóxico, provocando alta mortalidade;
3. o precoceno II na concentração de 10 a 30  $\mu\text{g/ml}$  de sangue promove atraso de muda;

### B. Para ninfas de 4° estágio

1. o precoceno II nas concentrações de 10 a 30  $\mu\text{g/ml}$  de sangue induz alta incidência de metamorfose precoce;
2. o período de intermuda é prolongado nos insetos (tratados com precoceno II) que apresentam maior grau de metamorfose;
3. a ecdisona aplicada oralmente (5  $\mu\text{g/ml}$  de sangue) inibe o efeito do precoceno II (20  $\mu\text{g/ml}$  de sangue) sobre a prevenção da ecdise sem, entretanto, interferir na indução de metamorfose precoce;

4. o análogo de hormônio juvenil, aplicado tópicamente um dia após a alimentação (50  $\mu\text{g}$  por inseto) inibe a produção de metamorfose precoce e diminui, sensivelmente, o período de intermuda nos insetos tratados com precoceno II (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sangue);
5. o precoceno II induz atrofia do *corpus allatum* e das glândulas protorácicas durante o período de intermuda, bem como inibe a liberação de neurosecreção das células A' localizadas na pars *intercerebralis*.

## VII. RESUMO

Foram estudados os efeitos do precoceno II, administrado por via digestiva, sobre o desenvolvimento de ninfas do 3° e 4° estágio de *R. prolixus*. O precoceno, nas concentrações de 10 a 100 µg/ml de sangue, reduziu progressivamente o volume de sangue ingerido (ação "antifeedant") e provocou uma alta mortalidade nas concentrações acima de 30 µg/ml de sangue. O retardamento da ecdise foi dose-dependente e em vários casos os insetos tiveram a muda inibida apesar de ingerirem grande volume de sangue. Grande número de insetos sofreu metamorfose prematura. As características morfológicas destes insetos foram correlacionadas com a duração do ciclo da muda. Os adultos precoces com características "ninfais" se alimentaram e iniciaram a ecdise seguinte. Os insetos com características predominantemente imaginais tiveram uma vida curta e não se alimentaram, apesar de lhes serem oferecidas várias oportunidades de alimentação.

O retardamento da ecdise provocado pelo precoceno II foi revertido pela ecdisona; este hormônio não interferiu na produção de metamorfose precoce. Por outro lado, a aplicação tópica de um análogo de hormônio juvenil um dia após a alimentação inibiu a produção de metamorfose precoce e reduziu o período de intermuda nestes insetos.

O exame microscópico das glândulas protorácicas (GP), *corpus allatum* (CA) e das células neurosecretoras (CNS) cerebrais, no 10° dia após a alimentação, revelou: a) que as GP

estavam atrofiadas) contrariamente ao que ocorria no grupo controle; as células das GP estavam alongadas e apresentavam citoplasma escasso; b) os CA estavam ausentes ou muito atrofiada; c) a CNS do tipo A não apresentavam nenhuma diferença com as células do grupo controle; d) a CNS do tipo A' estavam repletas de material paraldeído-fuccínico enquanto que as do grupo controle estavam vazias.

Os resultados sugerem que o precoceno II pode afetar o desenvolvimento de ninfas de *R. prolixus*, interferindo na produção e/ou liberação de ecdisona e hormônio juvenil. Estes dados são coerentes com a hipótese de que o precoceno II afeta o crescimento de *R. prolixus* por agir na interação cérebro-CA-GP.

## VIII. ABSTRACT

The effects of precocene II, given orally, on the development of third- and fourth-instar larvae of *R. prolixus* were studied. Precocene, at 10 to 100  $\mu\text{g/ml}$  of blood meal, progressively reduced the amount of blood ingested (*antifeedant action*) and caused a high mortality in doses higher than 30  $\mu\text{g/ml}$  of blood. Moulting was dependent on the doses of precocene, and in several cases the bugs had the ecdysis prevented despite the ingestion of enough blood. Large number of insects underwent premature metamorphosis. A high correlation between the duration of the moulting cycle and the morphogenetic adultoid was obtained. Precocious adults with slight imaginal characters were able to feed and initiate the next ecdysis. Adultiforms with distinct imaginal characteristics were short-lived and did not feed despite repeated opportunities.

The ecdysis prevention activity of precocene (20  $\mu\text{g/ml}$ ) could be counteracted by ecdysone given orally (5  $\mu\text{g/ml}$ ) although this hormone did not interfere in the adultiform production. On the other hand, a juvenile hormone analogue applied topically a day after feeding (50  $\mu\text{g/bug}$ ) precluded the premature metamorphosis and reduced the intermoulting period in these insects.

Microscopic examination of the prothoracic glands (PG), corpus allatum (CA) and neurosecretory cells (NSC), ten days after treatment, revealed: a- the PG, contrarily to

the control bugs, were atrophied; the glands cells were elongated and presented a scarce cytoplasm; b- the CA were absent or very much atrophied; c- the NSC of type A did not show any apparent difference with the control group; d- the NSC of type A' accumulated paraldehyde-fuchsin positive material whereas in the control bugs they were empty.

The results suggested that precocene II treatment may affect the development of *R. prolixus* larvae by interfering with the production and/or release of ecdysone and juvenile hormone. Our findings are consistent with the hypothesis that the precocene affect the growth by acting in the brain-CA-PG interactions.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALERTSEN, A.R. 1955. Ageratochromene, a heterocyclic compound from the essential oils of some *Ageratum* species. *Acta Chem, Scand.*, 9: 1725-1726.
- BAEHR, J.C. 1967. Étude des variations de la neurosécrétion au niveau du cerveau et du ganglion sous-oesophagien chez les femelles adultes d'un hemiptere *Rhodnius prolixus* (Reduviidae). *Memoire Fac. Sci. Paris*, p. 38.
- BAEHR, J.C. 1968. Étude histologique de la neurosécrétion du cerveau et du ganglion sous-oesophagien de *Rhodnius prolixus* (Hemiptere). *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, 267:2634-2637.
- BAEHR, J.C. 1969. Étude des variations de la neurosécrétion au niveau du cerveau et du ganglion sous-oesophagien d'imagos femelles de *Rhodnius prolixus* (Stal) Hémiptère. *C.R. Acad. Paris, D*, 268: 151-154.
- BAEHR, J.C. 1973. Contrôle neuroendocrine du fonctionnement du corpus allatum chez *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 19: 1041-1056.
- BAEHR, J.C. 1975. Physiologie des insectes - Comparaison des effets de l'ecdysone et de l'ecdystérone sur la qualité de la mue chez un insecte Hémiptère *Rhodnius prolixus* (Stal). *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, 280: 1465-1468.
- BAEHR, J.C. 1976. Étude du contrôle neuroendocrine du fonctionnement du corpus allatum chez les larves du quatrième stade de *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 22: 73-82.

- BAEHR, J.C., PORCHERON, P. & DRAY, F. 1978. Dosages radio-immunologiques des ecdysteroides et des hormones juveniles au cours des deux derniers stades larvaires de *Rhodnius prolixus* (Stal). Insecte Hémiptère Reduviidae. C.R. Acad. Sci. Paris, D, 287: 523-525.
- BARRETT, F.M. 1974. Effect of topical application of a juvenile hormone mimic on the duration of the moulting cycle in fifth instar *Rhodnius*, *J. Insect Physiol.*, 20: 1507-1514.
- BARRETT, T.V. 1976. Parasites and predators of triatominae. In: Research Pan American Health Organization, Scientific Publication N° 318, *New approaches in American Trypanosomiasis*, p. 24-28.
- BECKEL, W.E. & FRIEND, W.G. 1964. The relation of abdominal distension and nutrition to moulting in *Rhodnius prolixus* (Stal) (Hemiptera). *Can. J. Zool.*, 42: 71-78.
- BOLLENBACHER, W.E., AGUI, N., GRANGER, N. & GILBERT, L. I. 1979. *In vitro* activation of insect prothoracic glands by prothoracicotropic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA*, 76: 5148-5152.
- BOWERS) W.S. & MARTINEZ-PARDO, R. 1977. Antiallatotropins: inhibition of corpus allatum development. *Science*, 197: 1369-1371.
- BOWERS, W.S., OHTA, T., CLEERE, J.S. & MARSELIA, P.A. 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science*, 193: 542-547.
- BROOKS, G.T., PRATT, G.E. & JENNINGS, R.C. 1979. The action of precocenes in milkweed bugs (*Oncopeltus fasciatus*) and locusts (*Locusta migratoria*). *Nature Lond.*, 281:579-572.
- BUXTON, P.A. 1930. The biology of blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans. Ent. Soc. London*, 78: 227-236.
- CASSIER, P. 1979. The *corpora allata* of insects. *Inst. Rev. Cytol.*, 57: 1-70.

- CHÉNEVERT, R. PERRON, J.M., PAQUIN, R. ROBITAILLE, M. & WANG, Y.K. 1980. Activity of precocene analogs on *Locusta migratoria migratorioides*. *Experientia*, 36: 379-390.
- CLARK, N. 1935. The effect of temperature and humidity relative upon the eggs of the bug, *Rhodnius prolixus* (Heteroptera, Reduviidae). *J. Anim. Ecol.*, 4: 82-91.
- COCKBURN, J.M. 1972. Laboratory investigations bearing on possible insecticide resistance in triatomid bugs -10 p., Geneva, WHO (WHO/VBC/72.359).
- DAVEY, K.G. 1971. Moulting in a parasitic nematode, *Phocanema decipiens*. VI. The mode of action of insect juvenile hormones and farnesyl methyl ether. *Int. J. Parasitol.*, 1: 61-66.
- DOGRA, G.S. 1973. Neurosecretion in *Rhodnius prolixus* and the problem of endocrine control of reproduction. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 66: 1011-1021.
- DOGRA, G.S. & TANDAN, B.K. 1964. Adaptation of certain histological techniques for *in situ* demonstration of the neuro-endocrine system of insects and other animals. *Quart. J. micr. Sci.*, 105: 455-466.
- DUMSER, J.B. & DAVEY, K.G. 1975. The *Rhodnius* testis: hormonal effects on germ cell division. *Can. J. Zool.*, 53: 1682-1689.
- FELICIANGELI, M.D. 1970. Ricerche preliminari sulla sterilizzazione di *Rhodnius prolixus* per contatto tarsale sopra superfici trattate con metepa (ossido di tris-(2-metil aziridinil fosfato). *Riv. Parassit.* 31: 285-290.
- FRIEND, W.G. 1965. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stal. *Can. J. Zool.*, 43: 125-132.
- FRIEND, W.G., CHOY, C.T.H. & CARTWRIGHT, E. 1965. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.*, 43: 891-904.
- FRIEND, W.G. & SMITH, J.J.B. 1977. Factors affecting fee-

- ding by blood sucking insects. *Ann. Ref. Entomol.*, 22: 309. 331.
- FURTADO, A.F. 1976. Étude histophysiologique des cellules neurosécrétrices de la pars intercerebralis de larves femelles de *Panstrongylus megistus* (Heteroptera: Reduviidae). *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, 283: 163-166.
- FURTADO, A.F. 1977. Contrôle endocrine des mitoses goniales et du déclenchement de la méiose chez la femelles de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Thèse d'État Univ. P. et. M. Curie, Paris VI*, 159 p.
- FURTADO, A.F. 1979. Cerebral neurosecretion and regulation of moulting in a haematophagous insect *Panstrongylus megistus* (Heteroptera, Reduviidae). *Experientia*, 35: 1123-1124.
- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. Laboratoire d'Evolution, Faculté des Sciences, Paris, Masson, Paris. 550 p.
- GALLIARD, H. 1935. Recherches morphologiques et biologiques sur la reproduction des Rêduvidés hématophages (*Rhodnius* et *Triatoma*). *Thès Fac. Sci. Univ. Paris, Masson, Paris*, 160 p.
- GALUN, R.. 1975. Behavioral aspects of chemoreception in blood-sucking invertebrates, in: GALUN, R. et al. (ed.) *Sensory physiology and behavior*, New York, Plenum Press, p. 211-221.
- GARCIA, E.S., MACARINI, J.D., GARCIA, M.L.M. & UBATUBA, F.B. 1975. Alimentação de *Rhodnius prolixus* em laboratório. *Ah. Acad. brasil. Ciênc.*, 47: 537-545.
- GILBERT, B. 1976. Possible use of juvenile hormone mimics in vector control. In: Pan American Health Organization, Scientific Publication N° 318, *New Approaches in American Trypanosomiasis*, p. 282-289.
- GILBERT, L.I. 1964. Physiology of growth and development: endocrine aspects. In: ROCKSTEIN, M. (ed.) *The physiology of insecta*. Academie Press, New York. p.149-225.

- GILBERT, L.I., BOLLENBACHER, W.E. & GRANGER, N.A. 1980. Insect endocrinology: regulation of endocrine glands, hormone titer, and hormone metabolism. *Ann. Rev. Physiol.*, 42: 493-510.
- GOLDSWORTHY, G.J. & MORDUE, W. 1974. Neurosecretory hormones in insects. *J. Endocrinol.* 60: 529-558.
- HARRINGTON, J.S. 1960. Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology*, 50: 279-286.
- HOCKING, B. 1971. Blood-sucking behavior of terrestrial arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 16: 1-26.
- HULS, R. 1958. Synthèses de chromènes substitués. Synthèse du diméthoxy -6-7 diméthyl -2-2-3 chromène (ageratochromène). *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 67: 22-32.
- JOHANSSON, A.S. 1958. Relation of nutrition to endocrine-reproductive functions in the milk-weed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Nytt. Mag. Zool.*, 7: 1-132.
- KELLY, T.J. & FUCHS, M.S. 1978. Precocene is a specific antigonadotropic agent in adult female *Aedes aegypti*. *Physiol. Ent.*, 3: 297-301.
- KRISHNAKUMARAN, A. & SCHNEIDERMAN, H.A. 1965. Prothoracotropic activity of compounds that mimic juvenile hormone. *J. Insect Physiol.*, 11: 1517-1532.
- LAKE, P. & FRIEND, W.G. 1968. The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii*, on the development of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 14: 543-562.
- LANDERS, M.H. & HAPPI G.M. 1980. Precocene inhibition of vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 36: 619-620.
- LARROUSSE, F. 1927. Étude biologique et systématique du genre *Rhodnius* Stal (Hemiptères-Reduviidae). *Ann. Parasitol.*, 5: 63-88.

- LENT, H. 1948. O gênero *Rhodnius* Stal (Hemiptera-Reduviidae). *Rev. Bras. Biol.*, 8: 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: 487-560.
- LENT, H. & VALDERRAMA, A. 1977. Observações, em laboratório, sobre o ciclo evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, *R. pictipes* Stal, 1872 e *R. neivai* Lent, 1953. *Rev. Bras. Biol.*, 37: 325-333.
- LINDSTEDT, K.J. 1971. Chemical control of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.*, 297: 553-581.
- MADDRELL, S.H.P. 1963. Control of ingestion in *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature Lond.*, 198: 210.
- MARINI-BETTÓLO, G.B. 1976. Modern trends in the use of natural products for controlling pests and plant diseases. In: BETTÓLO, G.B. (ed.) *Semaine d'Etude sur le Thème Produits Naturels et la Protection des Plantes*, Pontificia Academia Scientiarum, Città del Vaticano. p. 5-16.
- MASNER, P., BOWERS, W.S., KALIN, M. & MUHLE, T. 1979. Effect of precocene II on the endocrine regulation of development and reproduction in the bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37: 156-166.
- MIALL, R.C. & MORDUE, W. 1980. Precocene II has juvenile-hormone effects in 5th instar *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 26: 361-364.
- MORRIS, G.P. & STEEL, C.G.H. 1977. Sequence of ultrastructural changes induced by activation in the posterior neurosecretory cells in the brain of *Rhodnius prolixus* with special reference to the role of lysosomes. *Tissue & Cell*, 9: 547-561.
- MULLER, P.J., MASNER, P., KALIN, M. & BOWERS, W.S. 1979. *In vitro* inactivation of corpora allata of the bug *Oncopeltus fasciatus* by precocene II. *Experientia*, 35: 704-705.

- MUNAKATA, K. 1975. Insect antifeeding substances in plant leaves. *Pure Appl. Chem.*, 42: 57-66.
- NAKANISHI, K. 1976. Insect growth regulators from plants. In MARINI-BETTOLO (ed.) *Semaine d'Etude sur le Thème Produits Naturels et la Protection des Plantes*, Pontificia Academia Scientiarum, Città del Vaticano. p. 185-196.
- NOCERINO, F. 1976. Suscetibilidad de *R. prolixus* y *T. maeulata* a los insecticidas en Venezuela. *Boln. Inf. Dir. Malariaiol. Saneam. Ambien.*, 16: 276-283.
- NOVAK, V.J-A. 1975. *Insect Hormones*, 2nd ed., CHAPMAN & HALL, London. 600 p.
- OBERLANDER, H. & SCHEIDERMAN, H.A. 1966. Juvenile hormone and RNA synthesis in pupal tissues of Saturniid moths. *J. Insect Physiol.*, 12: 37-41.
- OKASHA, A.Y.K. 1964. Effects of high temperature in *Rhodnius prolixus*. *Nature Lond.*, 204: 1221-1222.
- PENER, M.P., ORSHAN, L. & De WILDE, J. 1978. Precocene II Causes atrophy of corpora allata in *Locusta migratoria*. *Nature Lond.*, 272: 350-353.
- PRATT, G.E. & BOWERS, W.S. 1977. Precocene II inhibits juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata in vitro. *Nature Lond.*, 265: 548-550.
- 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.
- PRATT, G.E., JENNINGS, R.C., HAMMETT, A.F. & BROOKS, G.T. 1980. Lethal metabolism of precocene I to a reactive epoxide by locust corpora allata. *Nature Lond.*, 284:320-323.
- REMBOLD, H., CZOPPELT, C. & SHARMA, G.K. 1979. Precocene II is no anti-juvenile hormone in the honey bee, *Apis mellifera*. *Z. Naturforsch.*, 34: 1261-1263.
- SANTOS, A.L. & GARCIA, E.S. 1980. Some effects of a juveni-

- le hormone analogue on oogenesis of *Rhodnius prolixus*.  
*Pesq. Bas. Doença de Chagas*, V7.
- SCHOONEVELD, H. 1979. Precocene-induced collapse and resorption of *corpora allata* in nymphs of *Locusta migratoria*.  
*Experientia*, 35: 363-364.
- SLÁMA, K. 1978. The principles of antihormone action in insects. *Acta Entomol. hohemosloyaca*, 75: 65-82.
- SLÁMA, K., ROMANUK, M. & SORM, F. 1974. *Insect hormones and bioanalogues*, SPRINGER-VERLAG, Viena. p. 387.
- 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 feedback mechanism in the insect moulting cycle. *Nature Lond.*, 253: 267-269.
- STEEL, C.G.H. 1978. Nervous and hormonal regulation of neurosecretory cells in the insect brain. In: GAILLARD, P.J. & BOER, H.H. (ed.) Elsevier/North Holland, Amsterdam. p. 327-330.
- STEEL, C.G.H. & HARMSSEN, R. 1971. Dynamics of the neurosecretory system in the brain of an insect, *Rhodnius prolixus*, during growth and moulting. *Gen. Com. Endocrinol.*, 17: 125-141.
- STEELE, J.E. 1976. Hormonal control fo metabolism in inse-  
*Ann. Adv. Insect Physiol.*, 12: 239-323.
- SVOBODA, J.A., KAPLANIS, J.N., ROBBINS, W.E. & THOMPSON, M.J. 1975. Recent developments in insect steroid metabolism. *Ann. Rév. Entomol.*, 20: 205-220.
- TARRANT, C.A. & CUPP, E.W. 1978. Morphogenetic effects of precocene II on the immature stages of *Rhodnius prolixus*.  
*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72: 666.668.
- TOBE, S.S. & PRATT, G.E. 1974. Dependence of juvenile hormone release from *corpus allatum* on intraglandular content. *Nature Lond.*, 252: 474-476.

- TRUMAN, J.W. & RIDGIFORD, L.M. 1977. Invertebrate systems for the study of hormonal effects on behavior. *Vitam. Horm.*, 35: 283-325.
- UNDIANO, C. 1968. Predadores naturales de los triatomídeos, su biología y en la lucha biológica. *Rev. Fac. Cienc. Med. Córdoba*, 16: 307-318.
- UNNITHAN, G.C. & NAIR, K.K. 1979. The influence of *corpus allatum* activity on the susceptibility of *Oncopeltus fasciatus* to precocene. *Entomol. Soc. Amer.*, 72: 38-40.
- UNNITHAN, G.C., NAIR, K.K. & BOWERS, W.S. 1977. Precocene-induced degeneration of the *corpus allatum* of adult females of the bug *Oncopeltus fasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 23: 1081-1094.
- UNNITHAN, G.C., NAIR, K.K. & KOOMAN, C.J. 1978. Effects of precocene II and juvenile hormone III on the activity of neurosecretory A-cells in *Oncopeltus fasciatus*. *Experientia*, 34: 411-412.
- UNNITHAN, G.C., NAIR, K.K. & SYEL, A. 1980. Precocene-induced metamorphosis in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Experientia*, 36: 135-136.
- URIBE, C. 1927. On the biology and life history of *Rhodnius prolixus* Stal. *J. Parasitol.*, 13: 129-136.
- VALDIVIESO, F., DIAZ, B.S. & NOCERINO, F. 1971. Susceptibilidad de *B. prolixus* a los insecticidas clorados en Venezuela. *Boln. Inf. Dir. Malariol. Saneam. Ambient.*, II: 47-52.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1935. Function of the *corpus allatum* in insects. *Nature Lond.*, 136: 338.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1936. The functions of the *corpus allatum* in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Microsc. Sci.*, 79: 91-121.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1952. The thoracic gland in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and its role in moulting. *J. Exp. Biol.*,

29: 561-570.

- WIGGLESWORTH, V.B. 1955. The breakdown of the thoracic gland in the adult insect *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.*, 32: 485-491.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1959. *The control of growth and form*. Ithaca, New York, Cornell Univ. Press, p. 140.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1969. Chemical structure and juvenile hormone activity: comparative tests on *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 15: 73-94.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1970. *Insect hormones* B. OLIVER & R. BOYD & R. CLARK, Edinburgh. p. 159.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1972. *The principles of insect physiology*, 7th ed. CHAPMAN & HALL, London. p. 827.
- WIGGLESWORTH, V.B. & GILLET, J.D. 1934. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* and the mechanism of orientation to the host. *J. Exp. Biol.*, II: 120-139.