

EFEITO DA AZADIRACTINA NO DESENVOLVIMENTO DO *Trypanosoma cruzi* (CLONE DM-28C) em *Rhodnius prolixus* STAL, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE).

MARCELO SALABERT GONZALEZ

Rio de Janeiro

1992

TÍTULO DA TESE

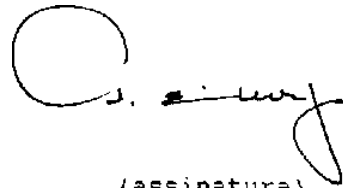
EFEITO DA AZADIRACTINA NO DESENVOLVIMENTO DO *Trypanossoma cruzi* (CLONE DM-28C) EM *Rhodnius prolixus* STAL, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)

AUTOR

MARCELO SALABERT GONZALEZ

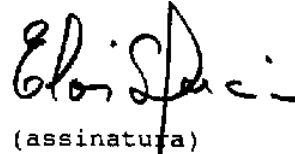
APROVADA EM: 29 de Outubro de 1992

GONZALO EFRAIN MOYA BORJA



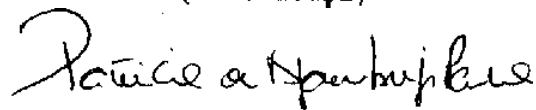
(assinatura)

ELÓI DE SOUZA GARCIA



(assinatura)

PATRÍCIA DE AZAMBUJA PENNA



(assinatura)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

EFEITO DA AZADIRACTINA NO DESENVOLVIMENTO DO *Trypanossoma cruzi* (CLONE DM-28C) EM *Rhodnius prolixus* STAL, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE).

MARCELO SALABERT GONZALEZ

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

ELÓI DE SOUZA GARCIA

Tese submetida a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de "Magister Scientiae" em Medicina Veterinária. Área de concentração em Parasitologia Veterinária.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Outubro, 1992

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

A CAPES e OMS, pela bolsa de estudos e
recursos proporcionados ao laboratório de
Fisiologia de Insetos, propiciando a realização
deste trabalho.

À TAVIE, PEDRO e SANDRA

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Elói de Souza Garcia, da Fundação Oswaldo Cruz, pela orientação e apoio.

Ao Professor Carlos M. Morel, da Fundação Oswaldo Cruz, por ter oferecido as condições de infraestrutura do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sem as quais não poderia ter sido realizado este trabalho.

Ao Professor Carlos Wilson Gomes Lopes, coordenador da Coordenadoria de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo firme apoio concedido durante a realização do curso de Pós-Graduação.

Ao Professor Gonzalo Efraim Moya Borja, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo estímulo a pesquisa no campo da fisiologia de insetos.

Aos colegas integrantes do Laboratório de Fisiologia de Insetos da Fundação Oswaldo Cruz, Patrícia de Azambuja Penna, José Eugênio de Lima Gomes, Cícero Brasileiro de Mello Neto, MARIA Denise Feder e Gilberto Couto Alcântara, pelo companheirismo, conhecimentos e apoio prestados e indispensáveis a realização deste trabalho.

Ao Doutor Samuel Goldenberg, do Laboratório de Expressão Gênica da Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio prestado e dúvidas esclarecidas, que muito ajudaram em nosso trabalho.

Aos colegas Flávio "Símio" da Silva Farias, Denise Valle e Myrna Bonaldo, do Laboratório de Expressão Gênica da Fundação Oswaldo Cruz, pelo companheirismo e apoio científico prestado durante todo o tempo de realização desta Tese.

A minha família, pelo apoio e confiança em mim depositados por toda vida.

Aos demais colegas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e Fundação Oswaldo Cruz, pelo convívio produtivo e agradável durante a realização desta tese.

BIOGRAFIA

Marcelo Salabert Gonzalez, filho de Júlio Esteves Gonzalez e Irany Morel Salabert, nasceu na cidade do Rio de Janeiro em 4 de Janeiro de 1962. Fez o curso primário no Grupo Escolar João Koppe, o curso ginásial no Colégio Antônio de Oliveira Salazar e o segundo grau no Colégio Miguel Couto Bahiense.

Em 1987 formou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em 1992, prestando concurso público na Universidade Federal Fluminense, foi selecionado para o cargo de Professor-Assistente do Departamento de Biologia Geral, onde atualmente está trabalhando.

ÍNDICE

	PÁG
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Crescimento dos insetos	22
2.2. Posição taxonômica	23
2.3. Ciclo biológico	23
2.4. Sistema digestivo	24
2.5. Sistema neurosecretor do <i>R. prolixus</i>	30
2.6. Controle hormonal do desenvolvimento do <i>Rhodnius prolixus</i>	34
2.7. Reguladores de desenvolvimento de insetos	53
2.8. Azadiractina	68
2.9. <i>Trypanossoma cruzi</i>	80

3. MATERIAL E MÉTODOS	97
3.1. Estabelecimento da colônia de <i>R. prolixus</i>	97
3.2. Procedimento alimentar	97
3.3. Infecção com <i>T. cruzi</i>	98
3.4. Infecção intestinal e quantificação de parasitas	98
3.5. Coleta de parasitas da urina e fezes	98
3.6. Estimativa da atividade hemolítica intestinal em <i>R. prolixus</i>	99
3.7. Estimativa da atividade proteolítica intestinal em <i>R. prolixus</i>	99
4. RESULTADOS	101
4.1. Efeito da ingestão concomitante de azadiractina A e infecção com <i>T. cruzi</i> através do repasto sanguíneo	101
4.2. Efeito de pré-tratamento com azadiractina A na sobrevivência do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	102
4.3. Efeito da azadiractina A sobre a vitalidade do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	102
4.4. Efeito de diferentes doses de azadiractina sobre o desenvolvimento de <i>T. cruzi</i>	103

4.5. Efeito, a longo prazo, da azadiractina sobre o desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	103
4.6. Efeito da azadiractina sobre as atividades hemolítica e proteolítica do trato digestivo do <i>R. prolixus</i>	103
4.7. Efeito da azadiractina sobre a eliminação do <i>T. cruzi</i> pelas excretas do <i>R. prolixus</i>	104
4.8. Avaliação "in vitro" do efeito da azadiractina sobre o desenvolvimento do <i>T. cruzi</i>	105
5. DISCUSSÃO	106
6. CONCLUSÃO	115
7. BIBLIOGRAFIA CITADA	115

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1- Vista dorsal de *R. prolixus* (adulto), sem os tergitos abdominais. Promesentero (estômago), posmesentero (intestino), proctodeum (reto). 24.1
- Figura 2- Sistema neuroendócrino dos triatomíneos (NSC, células neurosecretoras; B, cérebro; CC, *corpora cardiaca*; CA, *corpora allata*; PG, glândulas protorácicas). Efeitos do repasto sanguíneo: (1) intestino (G) distendido pelo repasto sanguíneo; (2) receptores abdominais para tensão estimulados pela distensão; (3) impulso nervoso estimulando as NSC a produzir PTH; (4) PTH liberado na hemolinfa a partir do CC; (5) PTH estimula as PGs; (6) PGs produzem e liberam neurohormônio na hemolinfa. O tipo de cutícula (Cu) sintetizada pelas células epidermais sobre a ação da ecdisona depende da presença (cutícula ninfal) ou ausência do hormônio juvenil (cutícula adulta). 33.1
- Figura 3- Fórmula estrutural da ecdisona (STOKA, 1987). 35.1
- Figura 4- Fórmula estrutural do JH (STOKA, 1987). 41.1
- Figura 5- Fórmula estrutural da azadiractina (KOUL et al, 1989). 68.1

Figura 6- Microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas (a) e tripomastigotas (b) de <i>T. cruzi</i> com o cinetoplasto localizado na região posterior do parasito	80.1
Figura 7- Efeito da ingestão concomitante de azadiractina A e infecção com <i>T. cruzi</i> através do repasto sanguíneo	105.1
Figura 8- Efeito do pré-tratamento com azadiractina A na sobrevivência do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	105.2
Figura 9- Efeito da azadiractina A sobre a vitalidade do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	105.3
Figura 10- Efeito de diferentes doses de azadiractina sobre o desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	105.4
Figura 11- Efeito, a longo prazo, da azadiractina sobre o desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i>	105.5
Figura 12- Efeito da azadiractina sobre a atividade hemolítica do trato digestivo do <i>R. prolixus</i>	105.6
Figura 13- Efeito da azadiractina sobre a atividade proteolítica do trato digestivo do <i>R. prolixus</i>	105.7
Figura 14- Efeito da azadiractina sobre a eliminação do <i>T. cruzi</i> pelas excretas do <i>R. prolixus</i>	105.8

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Crescimento e desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> em meio de cultura (LIT) contendo azadiractina A	105.9
Tabela 2- Efeito da azadiractina sobre a metaciclogênese do <i>T. cruzi</i> "in vitro" (meio TAUGAAG)	105.10
Tabela 3- Efeito da azadiractina sobre as formas tripomastigotas sanguíneas do <i>T. cruzi</i>	105.11

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- 1) Bana- Benzoil-Arginina-Naftilamida
- 2) C.A- *Corpora Allata*
- 3) C.C- *Corpora Cardiac*
- 4) CG- Corpo Gorduroso
- 5) CNSc- Célula neurosecretora cerebral
- 6) DTT- Ditiotreitól
- 7) Ec- Ecdisona
- 8) Ecd- Ecdisteróides
- 9) 20-OH-Ec- 20-Hidroxi-ecdisona
- 10) EDTA- Sal dissódico ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)
- 11) GE- Glândulas endócrinas
- 12) GRs- Reguladores de desenvolvimento

- 13) HCP- Período crítico cerebral
- 14) HMG-CoA-Redutase-3-hidroxi-e-metil-glutaril-CoA-Redutase
- 15) JH- Hormônio Juvenil
- 16) JHBP- Proteína ligada ao JH
- 17) JHE- JH esterases
- 18) NaCl- Cloreto de Sódio
- 19) NSC- Célula neurosecretora
- 20) PG- Glândula Prototorácica
- 21) PTH- Hormônio Protoracicotrópico
- 22) RNAm- RNA mensageiro
- 23) TCA- Ácido tricloro acético

RESUMO

Neste trabalho, foram investigados os efeitos da azadiractina A no curso da infecção por *Trypanosoma cruzi* no intestino do triatomíneo vetor *Rhodnius prolixus*. No *Rhodnius prolixus* o desenvolvimento do clone Dm-28c do *T. cruzi* decresce de uma maneira dose dependente, e a ED50 deste efeito inibitório da azadiractina de 0.25 ug/ml de sangue. Usando este inseto, nós conduzimos experimentos de longo prazo demonstrando que a azadiractina (1.0 ug/ml de sangue) bloqueia o desenvolvimento do *T. cruzi* durante 120 dias após o tratamento com a droga. Similarmente, a eliminação do *T. cruzi* nas fezes e urina foi bloqueada por um período de 50 dias após a infecção dos insetos tratados com azadiractina. Larvas de 5º estágio de *R. prolixus* infectadas com *T. cruzi* realizam uma drástica inibição do desenvolvimento do tripanosomatídeo quando tratadas com azadiractina A. A discussão destes resultados enfoca a possibilidade de que a azadiractina deve atuar diretamente na fisiologia intestinal e/ou indiretamente através do sistema neurosecretório.

ABSTRACT

Studies were carried out the effects of azadirachtin on the course of *Trypanosoma cruzi* infection in the gut of triatomine vector, *Rhodnius prolixus*. In *Rhodnius prolixus* the development of *T. cruzi* clone Dm-28c decreased in a dose dependent manner, and ED50 of this inhibitory effect was 0.25 ug azadirachtin/ml bloodmeal. Using this insect, we conducted a long term experiment which showed that azadirachtin (1.0 ug/ml bloodmeal) completely blocks the development of *T. cruzi* even 120 days after treatment with the drug, and after four infectant meals. Similarly, the elimination of *T. cruzi* in feces and urine was also completely blocked over a period of 50 days after infection in insects treated with azadirachtin. Fifth-instar larvae of *Rhodnius prolixus* infected with *T. cruzi* displayed drastic inhibition of trypanosome development when treated with azadirachtin. The discussion of these results focuses on the possibility that azadirachtin may act directly on gut physiology and/or indirectly through the neurosecretory system.

1-INTRODUÇÃO

O *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), é transmitido por triatomíneos, que são os vetores do parasita. O descobridor desta enfermidade, Carlos Chagas, não só reconheceu a doença como uma entidade clínica, como também identificou o seu agente causal e o inseto vetor. Apesar de já se terem passado mais de oito décadas desde sua descoberta, a relação fisiológica entre este protozoário patogênico e seu vetor hematófago, como em outras tripanossomíases, ainda é de conhecimento escasso e fragmentário (GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

Numerosos parâmetros associados com o parasita e/ou o vetor artrópode podem modular o desenvolvimento do *T. cruzi* neste hospedeiro (RYCKMAN, 1965; BRENER, 1973; ZELEDON, 1976; MILES, 1979; GARCIA & DVORAK, 1982).

O protozoário apresenta diferentes aspectos morfológicos e funcionais durante o seu ciclo de vida, alternando-se entre dois tipos de hospedeiros, vertebrado e invertebrado. Este flagelado apresenta formas replicativas (epimastigotas no inseto e amastigotas no mamífero) e infectivas (tripomastigotas metacíclicos do inseto e sanguíneos nos mamíferos) durante o seu desenvolvimento (BRENER, 1973; ZELEDON, 1987; GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

Um dos maiores obstáculos no conhecimento da dinâmica de desenvolvimento do *T. cruzi* na natureza é a grande falta de informações

sobre a interação do hospedeiro invertebrado com este parasita (GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

Um dos fatores que deve influenciar a infecção do triatomíneo pelo trypanossoma, é o estado fisiológico do inseto. Uma modificação no controle do balanço hormonal poderá, por exemplo, interferir no crescimento e desenvolvimento do parasita. Substâncias com efeitos hormonais e antihormonais comprovados sobre diferentes espécies de insetos, e particularmente sobre triatomíneos, se revestem de especial interesse como candidatas para utilização em tal estudo (GARCIA et al., 1989).

Azadiractina, um triterpenóide isolado de sementes da árvore tropical *Azadirachta indica* por BUTTERWORTH & MORGAN (1968), apresenta uma alta atividade biológica, atuando como inibidor do desenvolvimento e reprodução de insetos (REMBOLD & SIEBER, 1981; SIEBER & REMBOLD, 1983; GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al., 1984; MORDUE et al., 1985). Estes efeitos são devidos a ação supressiva do composto sobre os níveis de ecdisteróides (SIEBER & REMBOLD, 1983; GARCIA et al., 1986; REMBOLD et al., 1988) e JH (REMBOLD et al., 1988; REMBOLD, 1984) na hemolinfa.

Dados recentes obtidos em *R. prolixus*, demonstram que azadiractina A e B, fornecidas através do repasto sanguíneo, inibem o desenvolvimento dos estágios imaturos e no adulto a maturação e deposição de ovos (GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al., 1984; GARCIA et al., 1986; GARCIA et al., 1987; FEDER et al., 1988).

Azadiractina é rapidamente excretada pelo inseto e somente uma pequena quantidade de droga é retida pelo *R. prolixus*, o que demonstra a afinidade altamente específica do composto pelos órgãos aos quais se liga, e faz deste inibidor natural do desenvolvimento de insetos uma atrativa ferramenta de trabalho para estudos sobre a interação parasito/hospedeiro (GARCIA et al., 1984).

Neste trabalho, procuramos enfocar a capacidade da azadiractina A de interferir na interação entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros

invertebrados triatomíneos, demonstrando claramente o efeito inibitório deste composto sobre o desenvolvimento do protozoário em *Rhodnius prolixus*, através da quantificação dos parasitas no tubo intestinal e urina dos vetores infectados e dos efeitos da droga na interação entre *T. cruzi* com seus triatomíneos vetores (GARCIA et al., 1989a; GARCIA et al, 1989b; GARCIA et al, 1991).

Uma vez que o composto não demonstra um efeito tóxico para o parasita quando adicionada aos meios de cultura normalmente utilizados para manutenção de cepas, e baseados na relação parasita\hospedeiro altamente especializada entre estes dois organismos, evidencia-se que o efeito na situação endócrina do inseto deve interferir direta ou indiretamente na relação específica entre o parasito e seu vetor.

Assim sendo, procuramos analisar, utilizando técnicas de fisiologia de insetos, bioquímica e parasitologia, como a azadiractina interfere no desenvolvimento do *T. cruzi*, traçando um paralelo entre o efeito da azadiractina no balanço hormonal do inseto e a inibição do crescimento do parasita.

Esta combinação de efeitos no controle neurohormonal do artrópode e na interação parasita/hospedeiro, faz da azadiractina não só uma interessante candidata a inseticida, mas também um útil instrumento de trabalho para observações e esclarecimentos sobre os mecanismos de desenvolvimento deste parasita em seus hospedeiros invertebrados.

Acreditamos que este enfoque aumentara o conhecimento sobre o ciclo deste flagelado em seu inseto vetor, esclarecendo importantes etapas do desenvolvimento deste parasita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Crescimento dos insetos

Na maior parte dos animais verifica-se um crescimento do tipo contínuo, mesmo em períodos de maior ou menor atividade orgânica. Nos insetos, no entanto, a presença de um exoesqueleto não permite este tipo de crescimento, ocorrendo ciclicamente períodos de crescimento interno não visualizado, limitados por períodos de rápido crescimento externo.

O crescimento nos insetos está ligado ao processo de muda, uma vez que estes animais possuem a necessidade de trocar seu exoesqueleto periodicamente por uma outra camada externa que lhes permita continuar expandindo sua massa corporal.

A muda é definida como um conjunto de eventos fisiológicos interdependentes que culminam com a ecdise, ou seja, a substituição da cutícula antiga por uma nova. Os períodos de crescimento inaparente entre duas trocas cuticulares são denominadas estádios, e apresentam intensa atividade fisiológica. De acordo com o crescimento na evolução para a fase adulta, a cutícula apresenta diferentes graus de complexidade morfológica, encontrando-se na maioria dos insetos, um aspecto cuticular larval ou pupal, muito distinto do imaginal (NOVAK, 1975).

O processo de muda tem início com a apólise, que representa a ativação das células hipodérmicas que se desagregam da cutícula, aumentam em número e tamanho e iniciam a atividade secretora. O espaço compreendido entre a cutícula em formação e a cutícula antiga é preenchido pelo líquido da muda, que contém enzimas responsáveis pela hidrólise da endocutícula, a qual é reabsorvida e parcialmente usada na síntese da nova endocutícula. A dissolução da endocutícula favorece o enfraquecimento da linha ecdisial, que com a pressão de dentro para fora, exercida pelo inseto, rompe-se permitindo a ocorrência da muda.

Logo após a ecdise, a nova cutícula apresenta-se maleável e sem cor, tornando-se dura e pigmentada algum tempo depois. Neste período há expansão cuticular, o que permite o crescimento interno durante um dado estágio. A endocutícula continua a ser depositada lentamente até o início do novo ciclo de muda (WIGGLESWORTH, 1972).

O padrão de desenvolvimento de cada tipo de inseto e as diferentes fases de larva, pupa e imago são produzidas e controladas por mecanismos hormonais e neuroendócrinos presentes em todos os tipos de insetos. Estes mecanismos serão oportunamente descritos e analisados na continuação desta revisão.

2.2. Posição taxonômica

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

2.3. Ciclo biológico

O *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, é um inseto hemimetabólico, sob o ponto de vista ontogênico, possuindo 3 fases: ovo, ninfa e adulto.

2.4. Sistema digestivo

2.4.1. Anatomia

RAMIREZ PEREZ (1969), divide o tubo digestivo do *R. prolixus* em segmentos (Fig.1):

1) Estomodeum- Ou intestino anterior. Compreende a cavidade bucal, a faringe e o esôfago.

Os insetos sugadores não possuem uma boca verdadeira, mas sim uma boca funcional correspondente ao local onde o jogo de estiletes mandibulares abandona o sulco labial e penetra na extremidade anterior da cabeça. A cavidade bucal propriamente dita encontra-se logo após, limitada em cima pelo pós-clípeo e lateralmente pelas lâminas maxilares (BARTH, 1952).

Dorsalmente apresenta-se uma lâmina chamada epifaringe que consiste em uma invaginação das paredes do pós-clípeo. Esta lâmina apresenta orifícios onde se encontram as células gustativas que são receptores químicos encarregados de controlar a alimentação.

Ventralmente encontra-se uma lâmina triangular chamada hipofaringe, que une os estiletes que se encontram separados de ambos os lados da faringe, permitindo a meato salivar e do canal salivar das maxilas (RAMIREZ PEREZ, 1969).

Apesar de sua marcante diversidade estrutural, as glândulas salivares de todos os triatomíneos são constituídas por uma glândula principal, uni ou multilobulada, e uma glândula acessória em cada lado dorso-lateral do tórax (GARCIA, 1987).

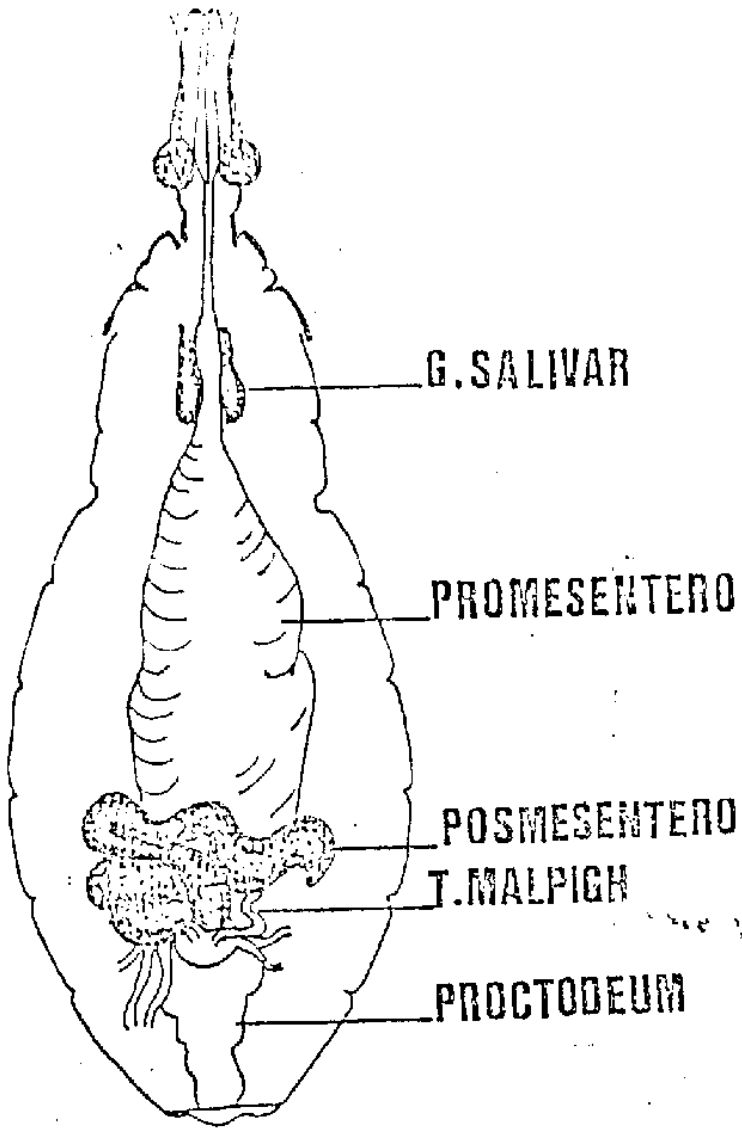


Figura 1- Vista dorsal do *R. prolixus* (adulto), sem os tergitos abdominais. Promesentero (estômago), posmesentero (intestino), proctodeum (reto).

Pouco se sabe sobre o papel da secreção salivar dos triatomíneos em seu processo digestivo, não tendo sido demonstrado até o momento a presença de enzimas digestivas nesta secreção (BAPTIST, 1941). Entretanto, duas anticoagulinas foram descobertas em *R. prolixus*: a prolixina-S, de origem salivar e encontrada no estômago, e a prolixina-G, uma anticoagulina intestinal capaz de inibir a trombina (HELLMAN & HAWKINS, 1964; HELLMAN & HAWKINS, 1965). Além da prolixina-S a saliva do *R. prolixus* contém as seguintes atividades: (1) uma apirase que transforma ATP e ADP em AMP (RIBEIRO & GARCIA, 1980; smith et al., 1980)); (2) uma atividade anti-agregação plaquetária (RIBEIRO & GARCIA, 1981); (3) uma atividade anti-serotonina/histamina (RIBEIRO, 1982) e (4) uma atividade anti-tromboxano A₂, que também inibe a agregação plaquetária (RIBEIRO & SARKIS, 1982).

Estas atividades, através do impedimento à coagulação sanguínea e da inibição da agregação plaquetária, facilitam a digestão e o transporte do sangue através do canal alimentar, uma vez que são ingeridas juntamente com o repasto sanguíneo (GARCIA, 1987).

A faringe consiste em uma estrutura fortemente esclerotizada, localizada entre a cavidade bucal e o esôfago. Sua extremidade anterior se reduz a um sulco que penetra no canal alimentar das maxilas. O esôfago é um tubo simples que nasce na extremidade posterior da faringe e desemboca no promesêntero (RAMIREZ PEREZ, 1969).

2) Mesentero- Ou intestino médio. Compreende o promesêntero (estômago) e o pós mesêntero (intestino).

O promesêntero é a parte dilatada do tubo digestivo que se encontra entre o tórax e o quinto segmento abdominal (fig.2). Nesta região o alimento é concentrado pela absorção do excesso de líquido e retido por várias semanas, constituindo-se em um saco de armazenamento (WIGGLESWORTH, 1943) com forma e cor variáveis de acordo com o grau de alimentação: em jejum apresenta-se verde-claro com bolhas de ar no interior. Logo após a alimentação torna-se vermelho; depois de algumas semanas torna-se verde-escuro.

O promesêntero é normalmente relatado como um saco de armazenamento de sangue ingerido, mas já foram encontradas nesta região enzimas que agem sobre nucleotídeos (RIBEIRO & GARCIA, 1979), carboidratos (RIBEIRO & PEREIRA, 1984) e lipídeos (GARCIA, 1987).

O posmesêntero é um tubo que se comunica com o posteriormente com o reto ao nível do desembocamento dos 4 tubos de Malpighi, apresentando numerosas circunvoluções (fig.2).

Nesta região se processa a digestão de proteínas, carboidratos e lipídeos (GARCIA, 1987).

3) Proctodeum- Ou intestino posterior. Compreende o saco retal e o cone anal. A ampola retal é uma estrutura piriforme que constitui a última parte do tubo digestivo desempenha importante papel na absorção de água e na recuperação de mineirais (WIGGLESWORTH, 1932).

2.4.2. Alimentação

Os insetos hematófagos desempenham uma sequência comportamental no momento da seleção de alimentos, resumida pelas seguintes fases: Orientação, início da alimentação (degustação), continuação do repasto (ingestão) e término do repasto (GALUN, 1975).

2.4.3. Organização do processo digestivo de hemipteros

A digestão de sangue representa, nos insetos hematófagos, a sequência de modificações que o sangue ingerido sofre até ser transformado em moléculas simples que possam ser utilizadas pelo organismo (AZAMBUJA, 1985). Os hemipteros não possuem membrana peritrófica, uma delicada

camada protetora das células epiteliais intestinais que as separa do conteúdo intestinal protegendo-as da abrasão de fragmentos duros e de permeabilidade variável de inseto para inseto (WIGGLESWORTH, 1972), mas apresentam uma membrana lipoproteica que reveste qual luva as microvilosidades das células ventriculares (membrana perimicrovilar) estendendo-se para o lúmen e terminando em fundo cego (TERRA, 1990). Em *R. prolixus*, o sangue ingerido é armazenado no ventrículo anterior, onde a água é absorvida e as hemácias rompidas. A digestão de proteínas ocorre no ventrículo posterior sob a ação de um tipo enzimas (catepsinas B e D) que geralmente só ocorrem no interior de células, mas nestes insetos são secretadas para o lúmen ventricular. Os oligopeptídeos resultantes passam para o espaço perimicrovilar onde ocorre a digestão intermediária e final (TERRA, 1988).

Ao que parece, o *R. prolixus* deve ter evoluído a partir de percevejos sugadores de plantas. Como a seiva de plantas apresenta baixas concentrações de aminoácidos essenciais, uma concentração variável de açúcares, altas concentrações de íons potássio e ausência de polímeros, os sugadores de seiva devem ter recebido a membrana peritrófica em função do fato de não precisarem mais fazer a digestão de polímeros, e devem ter adquirido as membranas perimicrovulares para que pudessem absorver nutrientes com maior eficiência, a partir de seivas pobres em aminoácidos essenciais. O *R. prolixus* provavelmente reteve as membranas perimicrovulares como um substituto para a membrana peritrófica na compartimentalização dos alimentos. A membrana peritrófica está presente em outros insetos hematófagos, como por exemplo os mosquitos adultos. Por outro lado a presença de catepsina, ao invés de tripsina, também presente nos mosquitos, deve resultar da adaptação de um ancestral próximo para sugar sementes ricas em inibidores de tripsina. A secreção de catepsinas para o lúmen do tubo digestivo permitiu a este ancestral contornar o impedimento da digestão de proteínas criado pela inibição da tripsina (TERRA, 1990).

2.4.4. Enzimas digestivas

Uma considerável diversidade de enzimas está descrita em triatomíneos. Entretanto, poucas destas atividades enzimáticas foram isoladas e purificadas. Na maioria dos casos as enzimas digestivas são classificadas com base no pH ótimo e substrato específicos determinados em homogenatos intestinais. Consequentemente, muitas questões concernentes as propriedades físico-químicas e ligações específicas destas enzimas permanecem sem resposta (GARCIA, 1987).

Resumidamente, até o momento foram descritas em *R. prolixus* atividades enzimáticas capazes de atuar na digestão de carboidratos (carbohidrases capazes de hidrolizar poli, oligo e dissacarídeos á monosacarídeos, e classificadas como glicosidases e amilases) (RIBEIRO & PEREIRA, 1984; GARCIA, 1987; TERRA et al, 1984), proteínas (proteases capazes de atacar as ligações peptídicas das proteínas e peptídeos, usualmente divididas em proteínases ou endopeptídases e peptídases ou exopeptídases) (HOUSEMAN & DOWNE, 1980; HOUSEMAN & DOWNE, 1981; HOUSEMAN & DOWNE, 1982; GOODING, 1969; GARCIA et al., 1978; HOUSEMAN, 1978; GARCIA & GUIMARÃES, 1979), lipídeos e fosfatos (lipases e fosfatases) (TERRA et al, 1984).

2.4.5. O processo hemolítico

A hemoglobina é essencial para suprir as necessidades nutricionais dos insetos hematófagos, uma vez que constitui mais de 70% das proteínas **totais do sangue** (BALASHOV, 1972). **Apesar desta constatação, somente** recentemente tem sido dada a atenção necessária aos fatores responsáveis pelo processo hemolítico e seu papel fisiológico na digestão dos insetos hematófagos.

Autores como YORKE & MACKIE (1924), trabalhando com *Culex pipens fatigans* e *Aedes aegypti*, e ADLER & THEODOR (1926), utilizando como

modelo experimental o *Phlebotomus papatasi*, realizaram os primeiros estudos sobre este processo fisiológico, e não conseguiram demonstrar atividade hemolítica em homogenatos e extratos de glândulas salivares destes insetos.

GEERING (1975), reportou a presença de um fator lítico para hemácias de coelho no homogenato de intestino médio de *A. aegypti* e sugeriu a participação de proteínas digestivas no processo hemolítico e, talvez, a existência de fosfolipases.

GOODING (1977), comprovou a presença de uma hemolisina no intestino médio de *Glossina morsitans* e evidenciou o agente no lúmen intestinal. Este autor também observou que a atividade lítica aumentava com o repasto sanguíneo, atingindo um efeito máximo 24\48 horas após a alimentação.

Trabalhando com *Stomoxys calcitrans*, SPATES & DELOACH (1980), demonstraram uma atividade hemolítica no homogenato do intestino médio deste inseto. No ano seguinte, estes mesmos autores tentando purificar uma hemolisina, comprovaram a alta atividade hemolítica presente em extrato lipídico do intestino (SPATES & DELOACH, 1981). SPATES et al (1982), atribuíram a ácidos graxos livres (ácido palmítico, ácido palmitoleico e ácido oleico) a responsabilidade por este processo hemolítico, postulando que estes ácidos graxos possuiriam características semelhantes a detergentes, quando presentes em altas concentrações, lisando as hemácias ingeridas pelo inseto.

AZAMBUJA (1983 e 1985) e AZAMBUJA et al (1986), demonstraram a presença de um fator hemolítico no intestino médio de ninfas e adultos de *R. prolixus* e sugeriu que o estímulo a produção de hemolisina estaria associado ao conteúdo de eritrócitos, tal como provavelmente nas outras espécies hematófagas. Este trabalho excluiu a possibilidade de no *R. prolixus*, a distensão abdominal ser reguladora do processo hemolítico, entretanto, nada se podendo concluir sobre a natureza química do estímulo.

No *R. prolixus*, o exame mais detalhado do aparecimento do fator demonstrou que a atividade hemolítica era mínima nos insetos em jejum e atingia níveis máximos de 2 a 4 dias após o repasto sanguíneo (AZAMBUJA, 1985; AZAMBUJA et al., 1986). Além disto, foi determinada a presença do agente hemolítico no lúmen da região anterior do intestino médio e sugeriu-se que o agente poderia ser de natureza peptídica, baixo peso molecular e de características neutras. As características deste fator hemolítico purificado, sugerem que o *R. prolixus* possui uma classe de agentes hemolíticos distinta das encontradas em outras espécies de insetos hematófagos e semelhante a fatores encontrados em venenos de Hymenoptera (AZAMBUJA, 1985).

O papel fisiológico deste fator deve estar associado à lise da membrana dos eritrócitos e, portanto, a liberação da hemoglobina, já que nesta espécie a passagem da hemoglobina livre para o pósmeôntero antecipa o contato direto das enzimas proteolíticas com o substrato proteico, facilitando assim o processo digestivo.

2.5. Sistema neurosecretor do *R. prolixus*

KÓPEC (1917), mostrou pela primeira vez que os insetos possuem um sistema de controle interno. Mais tarde, WIGGLESWORTH (1934a, b, 1935 e 1936) trabalhando com *R. prolixus*, demonstrou, utilizando técnicas de decapitação, parabiose e transplantes, a existência de um controle hormonal, regulador dos processos de muda. A partir destes experimentos clássicos, iniciou-se o estudo da endocrinologia de insetos, com a descrição dos órgãos e hormônios envolvidos em diferentes e integradas atividades biológicas e fisiológicas.

Segundo DOGRA (1973) e como representado na figura 2, a morfologia geral do sistema neurosecretor do *R. prolixus* consiste em um grupo de células neurosecretoras cerebrais (CNSc) situadas na Pars intercerebralis (PI; região mediana dorsal do protocérebro), 1 par de

corpora cardíaca (CC), Órgão reservatório de neurosecreção, e corpus allatum (CA) e 1 par de glândulas protorácicas (PG).

2.5.1. Células neurosecretoras- São encontradas no cérebro, gânglio subesofageano e gânglios abdominais. Apenas abordaremos as células neurosecretoras cerebrais (CNSc), pois estão diretamente ligadas aos processos fisiológicos aqui citados.

A CNSc é a unidade básica do sistema neurosecretor representada como um neurônio modificado e caracterizado por possuir traços de uma célula endócrina capaz de produzir neurosecreção. Ao contrário dos neurônios típicos, estas células não estabelecem contato sináptico com outros neurônios, mas formam estruturas vesiculares no axônio terminal que se assemelham a estruturas pré-sinápticas e são responsáveis pela liberação do material neurosecretor (SLAMA et al., 1974).

BAEHR (1968) distingue 4 tipos de células que diferem por suas formas e afinidades tintoriais. São as células do tipo A, A", a e c.

As células do tipo A situam-se na região anterior e dorsal da PI, medem de 30 à 40um, se apresentam em número de 8 a 10 e possuem uma forma variável, piriforme ou poligonal, facilmente observadas ao estereoscópio. A neurosecreção é repartida em grânulos e enche o citoplasma que aparece percorrido de trabéculas claras. O núcleo é volumoso, geralmente central e mostra um aglomerado de cromatina na periferia e um grande nucleolo 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 purpura (DOGRA, 1973).

As células do tipo A" situam-se na PI, podendo ser confundidas com as células do tipo A, graças as semelhanças em tamanho e forma (BAEHR, 1968). Estas células apresentam finos grânulos de neurosecreção o que resulta em um citoplasma caracteristicamente uniforme (BAEHR, 1969) e quando coradas pela FP aparecem pouco pigmentadas (DROGA, 1973; FURTADO, 1976), não apresentando afinidades tintoriais pelo AV (FURTADO, 1976).

As células do tipo a estão situadas na região mediana anterior do protocérebro, entre as células do tipo A, medem de 15 à 20 um e aparecem em número de 5 de cada lado do sulco mediano. Seu tamanho, forme (arredondado ou oval) e localização podem confundí-las com as células do tipo c, das quais se distinguem pela sua coloração em Orange G (BAEHR, 1967).

As células de tipo C são de 2 tipos facilmente distinguíveis pelo tamanho (8 e 20 um) e estão distribuídas na PI, nos lobos laterais do protocérebro e tritocérebro. Estas células são coradas pelo Azocarmim e são o mais numeroso grupo dos tipos celulares encontradas (BAEHR, 1968).

Os axônios das células do tipo A e A" convergem de cada lobo cerebral para a região posterior do lobo protocerebral, cruzando o sulco mediano e seguindo a direção do trotocebro (fig.2). De cada grupo de células parte um nervo interno, o C. Cardiacum I (NCCI), que se cruzam e atingem o C.C do lado oposto. Formam também um nervo extra o N.C.C II, que atinge o C.C do mesmo lado (WIGGLESWORTH, 1972). Estes nervos penetram na parte apical do C.C, onde os 2 lobos cardiacum se fundem. Nesta região, a maioria das CNSc terminam, seu trajeto (Dogra, 1973).

2.5.2. **Corpora cardíaca** (C.C)- Estão situadas atrás do cérebro, entre o vaso dorsal e o esôfago e anteriores ao C.A, podendo estar fusionados ou separados, ligando-se ao C.A e gânglio subesofageano, através do nervo Allato (NOVAK, 1975).

A parte anterior do C.C é desprovida de material neurosecretor, exceto na passagem do NCC. Da parte posterior fusionada, um estreito nervo se estende ao longo da superfície ventral da Aorta (Dogra, 1973) (fig.2).

2.5.3. **Corpora Allatum** (C.A)- Ocorre em todos os insetos alados, como um par de órgãos glandulares, situados após o C.C e intimamente associados a estes, estando a região anterior dos C.A em justaposição com o c.c. (fig.2). Nos hemípteros aparecem fusionados, formando uma

estrutura única. Dependendo do espaço de tempo após a última alimentação, existe considerável diferença no tamanho desta glândula (WIGGLESWORTH, 1963).

Histologicamente, o C.A aparece como uma única camada periférica de pequenas células e o resto do corpo é preenchido por células parenquimatosas circulares grandes que são responsáveis pela secreção hormônio juvenil. Ambos os tipos de células se coram pelo AV (BAEHR, 1973).

2.5.4. Glândulas Protorácicas (PG)- Aparecem como órgãos glandulares pareados, situados na área ventro-lateral do prototorax, podendo conectar-se com os ramos traqueais ou atingirem o mesotorax. Em *R. prolixus*, são do tipo difuso e aparecem como cadeias de células dentro dos lobos internos do corpo gorduroso, ao lado do tubo digestivo (NOVAK, 1975). Em coloração pela hematoxilina de Hansen observa-se que há uma malha de células com núcleos largos dispersos sobre o lobo. Diferentes formas são observadas dependendo do grau de atividade destas células. A função destas glândulas é produzir e secretar a ecdisona, hormônio responsável, nos artrópodes, pelo controle do desenvolvimento embrionário, pós-embrionário e muda (JENNINGS, 1983).

WIGGLESWORTH (1952) observou que ninfas de quarto e quinto estágio de *R. prolixus* não alimentadas apresentam estas células atrofiadas, com coloração pálida, núcleos alongados e contorno irregular. Após a alimentação, o citoplasma destas células aumenta de tamanho e toma uma coloração mais intensa. O núcleo torna-se alargado e lobulado e um grande número de hemócitos aparece na superfície da glândula. Tais 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 JH durante a intermuda promove a degeneração das PGs, tornando o inseto adulto incapaz de mudar novamente (WIGGLESWORTH, 1955). WIGGLESWORTH (1952) observou que no primeiro dia

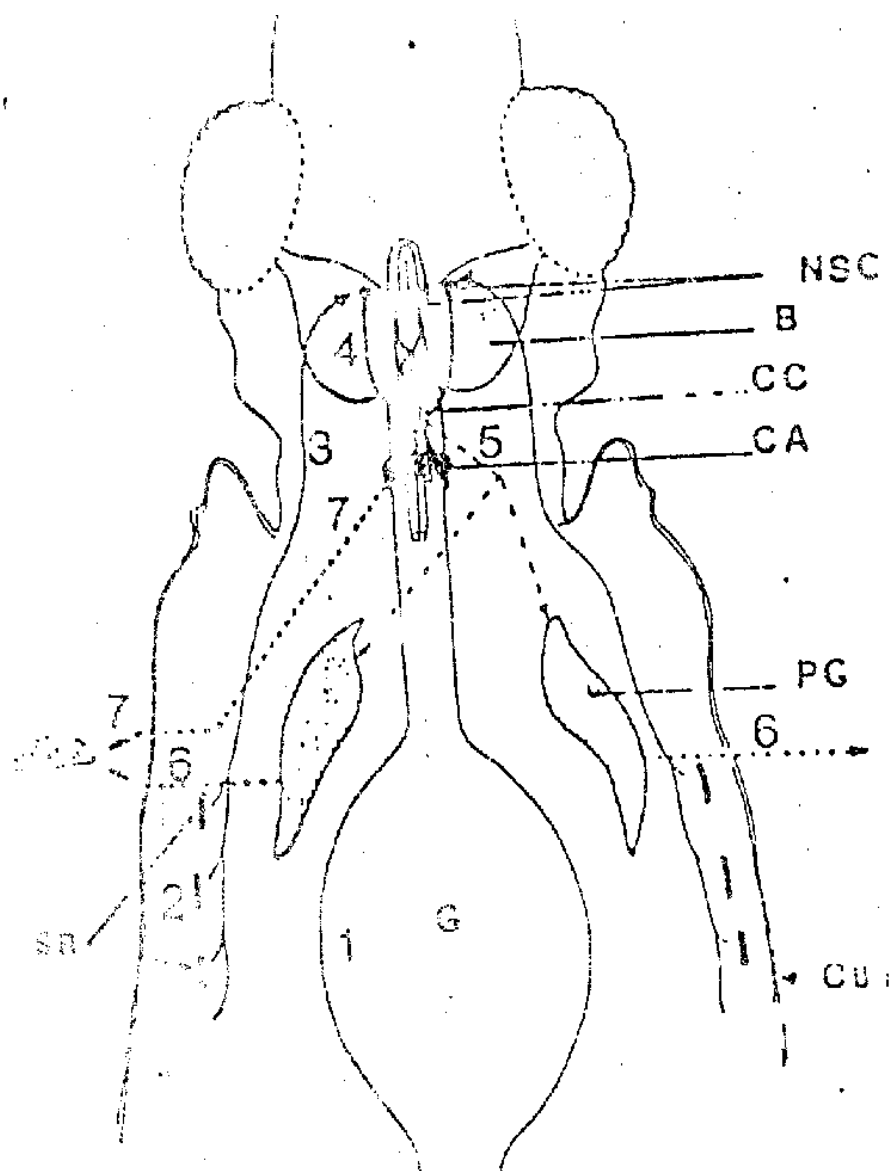


Figura 2- Sistema neuroendócrino dos triatomíneos (NSC, células neurosecretoras; B, cérebro; CC, corpora cardíaca; CA, corpora allata; PG, glândulas protorácicas). Efeitos do repasto sanguíneo: (1) intestino (G) distendido pelo repasto sanguíneo; (2) receptores abdominais para tensão estimulados pela distensão; (3) impulso nervoso estimulando as NSC a produzir PTH; (4) PTH liberado na hemolinfa a partir do CC; (5) PTH estimula as PGs; (6) PGs produzem e liberam neurohormônio na hemolinfa. O tipo de cutícula (Cu) sintetizada pelas células epidermais sobre a ação da ecdisona depende da presença (cutícula ninfas, ou ausência do hormônio juvenil (cutícula adulta).

após a muda imaginal é iniciado o processo de degeneração das PGs e já no terceiro dia não aparece mais nenhum vestígio das glândulas.

2.6. Controle hormonal do desenvolvimento do *R. prolixus*

O processo cíclico de crescimento, muda, metamorfose, desenvolvimento ovariano e da capacidade reprodutiva nos insetos é basicamente controlado por um sistema compreendido por 3 hormônios: PTH, Ecdisona e JH. Estes hormônios devem estar presentes nos momentos adequados e em quantidades precisas, ao longo do ciclo de vida do inseto, para que seu desenvolvimento ocorra de forma plenamente satisfatória.

O hormônio protoracicotrópico (PTH) é produzido pelas CNSc (WIGGLESWORTH, 1972; GILBERT et al., 1980) e liberado periodicamente em resposta a estímulos condicionados a fatores nutricionais. Este hormônio tem como função a ativação das PGs. A ativação destas glândulas resulta na síntese do hormônio da muda (ecdisona), que será convertida nos tecidos periféricos em 20-hidroxi-ecdisona, forma ativa do hormônio (SVOBODA et al., 1975). Este hormônio atua sobre as células epidermais iniciando o processo de muda: Retração da epiderme da cutícula velha (apólise) e deposição da nova cutícula, culminando com a liberação do material que restou da cutícula velha (ecdise) (WIGGLESWORTH, 1972).

O hormônio juvenil (JH), sintetizado pelo C.A, é o responsável pela determinação do caráter da muda iniciada pela ecdisona. Um alto nível de JH determina muda de ninfa para ninfa, enquanto um nível não detectável ou baixo leva a metamorfose do inseto (BAEHR et al., 1978). No *R. prolixus*, o JH volta a ser sintetizado em níveis mais altos durante a fase adulta do inseto, exercendo uma função gonadotrófica (WIGGLESWORTH, 1972). Em *R. prolixus* é necessária a presença de PTH por alguns dias após o repasto sanguíneo para que um nível de ecdisona seja alcançado e possa se completar a muda (WIGGLESWORTH, 1972). Este período de tempo é conhecido como período crítico cerebral.

2.6.1. Ecdisona (Ec)

A ecdisona é um esteróide hidroxilado produzido nas PGs (KING et al., 1974; CHINO et al., 1974) sobre influência do PTH (JENNINGS, 1983). Os ecdisteróides são compostos com similaridade estrutural com os esteróides presentes em animais e vegetais (GOODWIN et al., 1978). Segundo STOKA (1987), estes compostos possuem certas características estruturais que os distinguem dos hormônios esteróides típicos dos mamíferos: estrutura com 27 átomos de carbono, função cetônica localizada no anel B e grande polaridade devida a presença de cadeia lateral e grupos hidroxilados (fig.3). Nos artrópodes, os ecdisteróides controlam o desenvolvimento embrionário, pós-embrionário e reprodutivo (STOKA, 1987). Existem evidências que apontam os ecdisteróides como velhas moléculas espalhadas na biosfera e descobertas, assim como outros hormônios esteróides em organismos autotróficos e heterotróficos (STOKA, 1987). A ecdisona foi o primeiro composto isolado e caracterizado por sua atividade biológica como indutor da muda em insetos (BUTENANDT & KARLSON, 1954). O nível destas substâncias flutua através da vida do inseto, descendo ou subindo a intervalos apropriados durante os estádios (JENNINGS, 1983).

Os mecanismos de ação da ecdisona compreendem: a ativação das células hipodérmicas restaurando a capacidade de crescimento e síntese proteica, permitindo a formação de nova cutícula (MOROHOSHI & IIJIMA, 1969). Ocorre um aumento cíclico do DNA nas células hipodérmicas acompanhando o aumento dos níveis do ecdisona. A ecdisona produz apenas uma indução, pois as características da nova cutícula dependem da presença ou não do JH (MOROHOSHI et al., 1972). Na fase adulta, a ecdisona é secretada pelos ovários com a função de induzir o corpo gorduroso (C.G) a secretar a Vitelogenina, em algumas espécies de dípteros (HAGEDORN et al., 1975). A ecdisona é convertida nos tecidos periféricos a uma forma mais ativa, a 20-hidroxi-ecdisona (20-OH-Ec) (SVOBODA et al., 1975), composto este capaz de induzir a uma retração da epiderme da cutícula velha

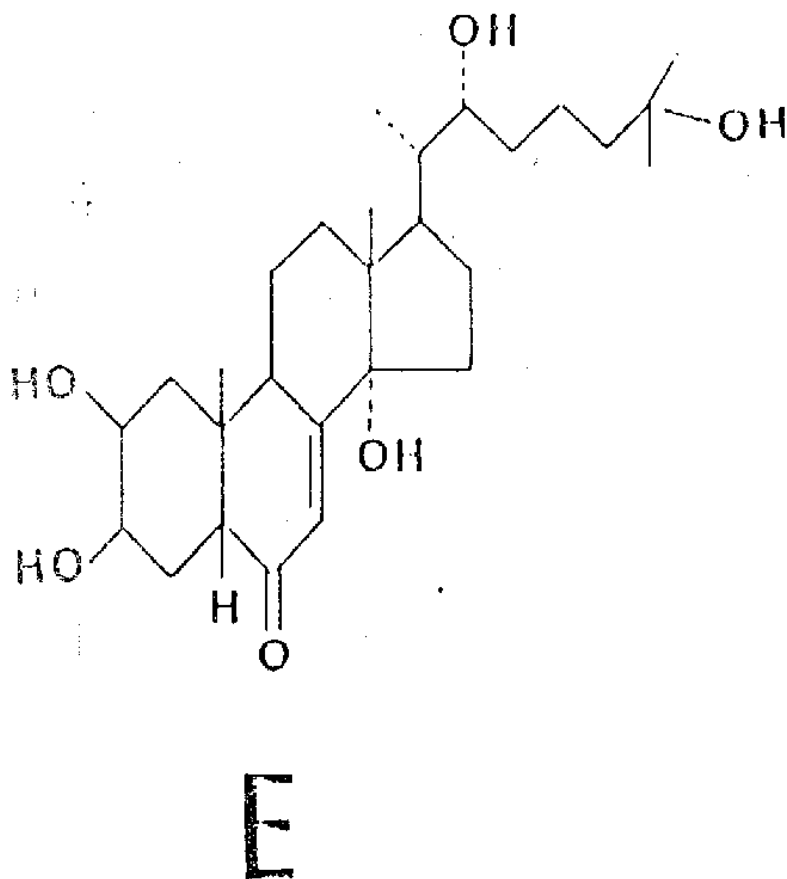


Figura 3- Fórmula estrutural da ecdisona (STOKA, 1987).

(apólise) e deposição da nova cutícula, culminando com a liberação do material da cutícula velha ou ecdise (WIGGLESWORTH, 1972). A atuação dos ecdisteróides na célula epidérmica dividi-se em diferentes fases (STOKA, 1987). Uma delas é a esclerotização da nova cutícula, produzida quando as proteínas cuticulares interagem com as ortoquinonas, que possuem uma síntese mediada pela enzima Dopa descarboxilase (KARLSON & SEKERIS, 1962). A Ec induz a síntese da Dopa descarboxilase (SHAAYA & SEKERIS, 1965) e esta indução pode ser bloqueada por puomicina ou actinomicina D, o que sugere a síntese de novo da Dopa descarboxilase (SEKERIS & KARLSON, 1964; SPENCER et al., 1983). Recentes estudos em mamíferos mostram que a locação de receptores para estrogênio é exclusivamente nuclear, não existindo receptores citoplasmáticos (KING & GREENE, 1984; WELSHONS et al., 1984; GORSKI et al., 1984). Em insetos está provado que os ecdisteróides exercem seus efeitos a um nível molecular, substanciando a existência de receptores nucleares para ecdisona (MAROY et al., 1978; YUND et al., 1978) e observa-se a ligação da 20-OH-Ec aos cromossomas politênicos (GRONEMEYER & PONGS, 1980).

Vários outros compostos relacionados à ecdisona em diferentes padrões e níveis de hidroxilação foram isolados em embriões de insetos (THOMPSON et al., 1981), o que sugere que as várias espécies químicas distintas devem possuir diferentes funções em diferentes estágios do desenvolvimento (JENNINGS et al., 1983). A ingestão destes compostos ou análogos por várias espécies de insetos, interrompem seu desenvolvimento e causam esterelidade em fêmeas adultas (ROBBINS et al., 1968).

Os insetos são inábeis para sintetizar o núcleo esteróide e sintetizam a ecdisona a partir do colesterol obtido da dieta ou pela transformação de outros esteróides alimentares (stigmaterol, citosterol e etc) em colesterol (JENNINGS, 1983), algumas substâncias químicas podem interferir neste processo como por ex. os azasteróides hipocolesteriolêmicos, que são inibidores da enzima esterol - delta 24 redutase, capaz de transformar fitoesteróides em colesterol (ROBBINS et al., 1968; AL- IZZI & HOPKINS, 1982). As ecdisonas passam por várias transformações metabólicas (GILBERT et al., 1980) como oxidação,

epimerização e conjugação, e são convertidas em vários produtos que podem ser estocados excretados e apresentar diferentes propriedades biológicas (JENNINGS, 1983). A conversão de Ec para 20-OH-Ec é induzida através de um citocromo P-450 ligado a uma função mista esteróide oxidase (JOHNSON & REES, 1977; SMITH et al., 1979). Esta enzima, que é um alvo atrativo para inibição química, está presente em vários insetos e tecidos e varia de atividade durante o desenvolvimento, constituindo uma parte do mecanismo regulatório do metabolismo destes compostos (JENNINGS, 1983). Dois pulsos de Ec ocorrem antes de cada muda. No primeiro pulso observa-se uma pequena quantidade na hemolinfa e o redirecionamento de programação celular ou transformação nas células epidérmicas para uma mudança metamorfoica (COUDRON et al., 1981). Se JH está presente a reprogramação não ocorre e as características do organismo emergente não apresentam mudanças. O segundo pulso de ecdisona é muito amplo e continua os processos e eventos iniciados com a muda (COUDRON, 1981).

A cutícula consiste de uma fina parede extracelular de proteínas e quitina recobrando as células epidérmicas. Estas células quando estimuladas pela 20-OH-Ec ativam-se metabolicamente, crescem e secretam enzimas degradativas que dissociam os componentes quitina da cutícula. As proteínas e a quitina são então reabsorvidas e recicladas (COUDRON et al., 1981). Aparentemente o 1º pulso da 20-OH-Ec induz a síntese de proteínas nucleares regulatórias que iriam influenciar o caráter da população de mRNA. Se JH está presente as proteínas regulatórias e a população de mRNA não são alteradas. No inseto adulto os ovários são estimulados pelos peptídeos cerebrais a secretar a 20-OH-Ec, que em algumas espécies de dípteros estimula o corpo gorduroso a produzir e secretar vitelogenina, a qual é sequestrada pelos oócitos em desenvolvimento. Os mecanismos de ação da Ec sobre o corpo gorduroso (CG) são desconhecidos, mas provavelmente são semelhantes aos esteróides de mamíferos, estimulando a transcrição de RNA específico (COUDRON et al., 1981).

Em outros insetos ocorre também o pico de ecdisona coincidindo com a deposição do corion. A ecdisona sintetizada é secretada dentro do

oócito, sendo metabolizada no desenvolvimento embrionário e utilizada como fonte de hormônios esteróides para o embrião (COUDRON et al., 1981).

As principais técnicas utilizadas para mensuração dos níveis circulantes de ecdisteróides em insetos são os ensaios biológicos com o radioimunoensaio, o HPLC e a cromatografia gasosa. A técnica mais utilizada tem sido o radioimunoensaio pois possui uma rápida performance e uma alta sensibilidade (STOKA, 1987).

A concentração de ecdisteróides varia entre diferentes espécies e dentro de uma mesma espécie dependendo do ritmo circadiano, como no caso do *R. prolixus* (BEAULATON et al., 1984; STEEL & AMPLEFORD, 1984). No período crítico cerebral, no 5º estágio ninfal dos triatomíneos varia entre o 6º e o 9º dia, dependendo da duração deste estágio, as espécies envolvidas e as condições ambientais da colônia como temperatura, umidade e fotoperíodo (STOKA, 1987). Como característica geral o pico de ecdisteróides é produzido após o período crítico cerebral. BEAULATON et al (1984) observaram que no 5º estágio de *R. prolixus*. O teor de ecdisteróides aumenta a partir do período crítico cerebral (6 dias após a alimentação) até o 13º dia após a alimentação. BAEHR et al (1978) observaram que em *R. prolixus* o pico de ecdisteróides ocorre no 11º dia após a alimentação. STEEL et al (1982), determinaram o ritmo circadiano de ecdise conectado com variações diárias do teor de ecdisteróides durante o 5º estágio de *R. prolixus* submetidos a fotoperíodo com 12 horas de luz(l) e 12 horas escuro(d). Foi a 1ª observação do ritmo circadiano nos níveis circulantes de hormônios em invertebrados, pois as amostras foram coletadas a cada 4 horas. O aumento dos níveis de ecdisteróides está correlacionado com o desligamento da luz, mas variações são detectadas mesmo quando os insetos são mantidos em escuridão por 24 horas, o que demonstra a existência de um sistema endógeno de tempo de liberação de ecdisteróides. Estas variações diárias evidenciam a existência de regulação por um sistema que coordena mudanças na velocidade de síntese, metabolismo e excreção de ecdisteróides (STEEL & AMPLEFORD, 1984).

Existem 2 principais caminhos metabólicos para a Ec: o aumento da atividade biológica e a diminuição da atividade biológica (STOKA, 1987). O aumento da da atividade hormonal da Ec é feito através da hidroxilação (similarmemente ao que ocorre nos vertebrados onde a testosterona é transformada em uma forma hidroxilada mais ativa, 25-dihidro-testosterona) e a conversão Ec/ 20-OH-Ec é catalizada por um sistema enzimático chamado Ecdisona-20-monooxigenase ou Ecdisona-20-hidroxilase (KING & SIDDALL, 1969). O intestino médio, os túbulos de Malpighi e o CG revelam uma localização prevalente desta enzima (KING & SIDDAL, 1969).

O decréscimo da atividade biológica se faz por 3 tipos de transformações: hidroxilação da 20-OH-Ec, epimerização da Ec e conjugação. A 20-OH-Ec é hidroxilada para 20,26 dihidro-ecdisona, transformação esta que leva a um decréscimo da atividade biológica do composto, sendo um importante caminho de inativação nas ninfas. A 20,26-dihidro-Ec apresenta uma grande correlação com os níveis de 20-hidroxi-Ec. É razoável supor uma sequência hidroxilante Ec / 20-hidroxi-Ec / 20,26-dihidro-Ec similar a descrita em *Locusta* (FEYEREISEN et al., 1976).

A epimerização consiste na passagem de Ec para 3 dehidro-Ecdisteróides e a seguir para 3 epiecdisteróides, esta última passagem é catalizada pela enzima isomerase-desidrogenase- Ec ou Ec-3-epimerase (MAYER et al., 1979).

A conjugação é um processo de conversão de ecdisteróides em metabólitos mais polares e biologicamente inativos, demonstrada em várias espécies de insetos, considerando os produtos finais do metabolismo de ecdisteróides. Os ecdisteróides são conjugados principalmente com sulfatos, glucosídeos e ácido glucurônico (FEYEREISEN et al., 1976; SANNASI & KARLSON, 1974; THOMPSON et al., 1973; HEINRICH & HOFFMEISTER, 1970) Em *T. infestans* como em outras espécies de insetos o maior número de conjugados é observado no trato alimentar e nos túbulos de Malpighi (STOKA & NORIEGA, 1982). A presença de conjugados de ecdisteróides foi inferida por meio de hidrólise enzimática dos compostos de alta polaridade isolados por cromatografia de camada fina

(STOKA & CHARREAU, 1981). *T. infestans* possui também diferentes tipos de conjugados, a parte os compostos altamente polares, que não são hidrolizados por enzimas, constituindo provavelmente uma outra variedade de conjugados ou ecdisteróides com cadeia lateral acídica similares aos observados em *Pieris brassicae* (LAFONT et al., 1980).

A conjugação é o principal processo de inativação da Ec, especialmente durante as primeiras horas, localizando-se no CG, tórax, trato alimentar e túbulos de Malpighi (STOKA, 1987).

Esta acumulação está relacionada ao processo de excreção destes produtos. Os ecdisteróides estimulam a secreção dos de fluídos nos túbulos de Malpighi durante os primeiros minutos, sugerindo uma regulação de curto tempo (GEE et al., 1977).

Em *R. prolixus* o período da produção principal de Ecdisteróides (10-16 dias após a alimentação) coincide com importante excreção do composto (150 ng de Ec por reto), sugerindo que a excreção rítmica destes compostos pode ser mediada pelos seus níveis circulantes (STEEL et al., 1982). O CG possui um duplo papel no metabolismo de ecdisteróides, o aumento da atividade biológica da Ec pela Ec-20-hidroxilase e a inativação dos ecdisteróides com gludurono e sulfo transferases, exercendo funções análogas as do fígado dos vertebrados, um órgão envolvido com síntese proteica e processos anabólicos relacionados, além de ser o sítio de mecanismos de detoxicação através da formação de glucoronoconjugados (STOKA, 1987).

2.6.2. Hormônio juvenil (JH)

O hormônio juvenil é um sesquiterpenóide produzido no corpora allata (CA) (NOVAK, 1975) e que possui uma grande variedade de efeitos morfogênicos e gonadotróficos (WIGGLESWORTH, 1940; WIGGLESWORTH, 1965; WIGGLESWORTH, 1972; 1974; NOVAK, 1975), tais como: a determinação da qualidade da muda e o tipo de cutícula que irá ser secretada em resposta a ação dos ecdisteróides; afeta o desenvolvimento dos órgãos internos incluindo corpo gorduroso, sistema nervoso central e gônadas; síntese e liberação do ferormônios sexuais atraentes (cópula).

O PTH atinge o CA não só por via hemolinfática mas vindo também diretamente do cérebro em forma de grânulos via nervus CC e nervus allatum (BAEHR et al., 1978). O estímulo a secreção do JH está relacionado ao repasto sanguíneo, através da liberação do PTH e da concentração das proteínas hemolinfáticas (BAERH et al., 1978). O JH não é estocado e sua síntese é seguida de liberação (TOBIE & PRATT, 1974a; 1974b).

Existem 3 tipos conhecidos de espécies químicas de JH (CASSIER, 1979) (fig.4): JH I, JH II e JH III. O JH I e II possuem uma atividade mais morfogênica e o III uma atividade mais gonadotrófica (GILBERT et al., 1980).

O JH I é abundante na intermuda do 4^o estágio (BAERH, 1973). No 5^o estágio, 24 horas após o repasto este composto decresce e se mantém assim até a ecdise, provavelmente por uma inibição promovida por controle nervoso cerebral (WIGGLESWORTH, 1972). O JH possui as funções primárias na metamorfose e reprodução do inseto, com uma atuação direta sobre a célula alvo epidérmica, aparentemente modificando eventos iniciados pela ecdisona no núcleo das células epidermais, ativando regiões cromossômicas para manutenção das características ninfais durante o desenvolvimento dos insetos (GILBERT, 1964). Além disso também atua sobre a diapausa, coloração, atividade motora, metabolismo geral e comportamento sexual (WIGGLESWORTH, 1969; NOVAK, 1975).

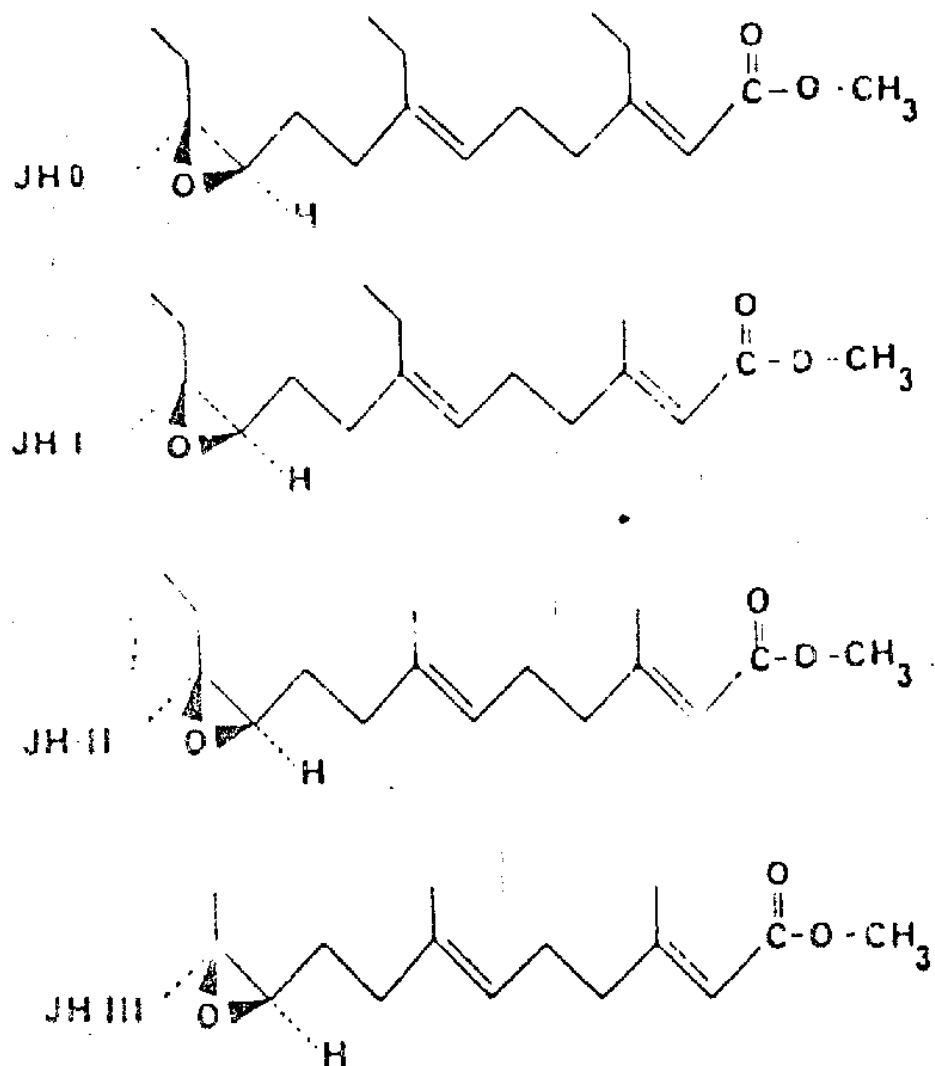


Figura 4- Fórmula estrutural do JH (STOKA, 1987).

As observações iniciais sobre o hormônio juvenil demonstraram que o desenvolvimento é acelerado com a remoção do CA. Estudos realizados "in vivo" utilizando extirpação e implantação da glândula e injeção de extratos ativos e sintéticos concluíram que este composto possui um efeito supressivo sobre as mudanças metamorfoicas na larva e um outro efeito ativador sobre a síntese de proteínas. Aparentemente a atuação do JH ocorre através de dois diferentes mecanismos ambos associados com a transcrição do RNA mensageiro (mRNA), o mecanismo estimulatório induzindo a transcrição de mRNA específico para vitelogenina, com a diferenciação do corpo gorduroso ocorrendo antes da muda para adulto, demonstrando que a reprogramação celular do corpo gorduroso para produção de vitelogenina ocorre antes da muda imaginal (GILBERT, 1976). Assim é possível que insetos hemimetábolos possuam 2 pulsos de síntese de ecdisteróides durante o último estágio ninfal e que em ausência de JH, o CG apresente um metabolismo de adulto. (COUDRON et al., 1981).

O CA é o sítio de síntese e liberação do JH. Dados histológicos e experimentos com ablação e reimplantação desta glândula (WIGGLESWORTH, 1936) e estudos recentes com explantes do CA em cultura de tecidos suplementadas com precursores radioativos (JUDY et al., 1973; SCHOOLEY et al., 1976; TOBE & PRATT, 1974a; TOBE & PRATT, 1974b), fazem com que esta glândula seja considerada o local de produção do JH. A produção e secreção deste hormônio é comandada por neurohormônios cerebrais (ex: PTH) e do CA. O CA é também estimulado pela concentração de proteínas hemolinfáticas obtidas através da alimentação (BAERH et al., 1978). A 3 hidroxil-3 metil-glutaril coA (HMG-CoA) é uma enzima chave na via biossintética do terpeno e deve representar o processo limite na síntese do JH (KRAMER & LAW, 1980; FEYEREISEN et al., 1981; MONGER & LAW, 1982). Em vertebrados, esta enzima possui um papel modulador na biossintese do colesterol (BROWN & GOLDSTEIN, 1980). Reguladores da síntese do JH devem atuar sobre o nível de HMG coA redutase no CA (MONGER & LAW, 1982).

Os insetos não sintetizam esteróides mas sintetizam terpenóides "de novo" (STOKA, 1987) Existem 2 diferentes formas de HMG coA (MONGER & LAW, 1982); uma ativa desfosforilada e uma forma inativa fosforilada.

Este mecanismo de fosforilação/desfosforilação provê uma rápida regulação da biossíntese do JH e possivelmente a fosforilação proteica é o principal mecanismo de regulação metabólica intracelular (LARNER et al., 1979; DENTON et al., 1981; KASUGA et al., 1982; DUCEMAN et al., 1981).

A receptividade dos tecidos ao hormônio juvenil varia de acordo com o momento do ciclo de vida do inseto e possivelmente está ligada ao número e conformação dos receptores em uma dada célula alvo, caracterizando-se por uma modulação tecido específica (COUDRON, 1981).

O transporte do JH do CA para os tecidos receptores é feito por meio de macromoléculas proteicas da hemolinfa; proteínas ligadas ao JH (JHBP), que estão divididas em 2 grupos de acordo com a sua capacidade de ligação e especificidade: o primeiro grupo possui baixa afinidade pelo JH e é constituído por lipoproteínas de alto peso molecular ; o segundo grupo possui uma alta afinidade pelo JH e é constituído por proteínas de baixo peso molecular (DE KORT & GRANGER, 1981). Estas proteínas transportadoras refletem uma situação similar ao que acontece em vertebrados onde albuminas e muitas lipoproteínas possuem baixa afinidade, baixa especificidade e alta capacidade para interagir com hormônios lipofílicos, coexistindo com outras proteínas com alta afinidade, alta especificidade e baixa capacidade de associação com esses mesmos hormônios (STOKA, 1987).

As variações no nível do JH circulante são influenciadas por 2 caminhos principais (STOKA, 1987): 1) controle da velocidade de biossíntese do JH; 2) controle da velocidade de inativação do JH.

Em *T. infestans*, o JH injetado no 5 estágio é convertido em 4 metabólitos principais: JH I ácido, JH I ácido diol e compostos altamente polares . A conversão JH/JH ácido é um dos primeiros processos metabólicos a que o JH é submetido, sendo catalizado por esterases (JHE) descobertas principalmente na hemolinfa, epiderme e CG (STOKA, 1987). Os compartimentos hemolinfáticos são o primeiro sítio de regulação dos níveis de JH (REBOREDO et al., 1984). A conversão JH/JH

ácido é um passo chave para a regulação da atividade do JH, desde que o JH ácido é biologicamente inativo (STOKA, 1987).

Existem porém outros processos regulatórios em *T. infestans* e outros insetos, os quais protegem o JH da ação das esterases: as JHBP que se ligam especificamente ao JH (STOKA, 1982; SANDBURG et al., 1975a, b; GOODMAN et al., 1978; KRAMER et al., 1974). Possivelmente JHE e JHBP atuam em conjunto constituindo um mecanismo regulatório (STOKA, 1987).

Não está claro se JHBP somente transporta um composto hidrofóbico (JH) em um meio hidrofílico (hemolinfa), protegendo-o da inativação, ou se também possui algum efeito nos órgãos alvo do JH. Estudos com epiderme de *M. sexta* "in vitro" (MITSUI et al., 1979) demonstram que a meia vida do JH é triplicada quando o JHBP está presente no meio de cultura, mas diferenças na ação do JH na metamorfose a nível celular não foram observadas, o que prova que os receptores para JH na epiderme (KLAGES & EMMERICH, 1980) podem reconhecer o JH livre e o JH ligado a JHBP. Estudos da inibição da deposição cuticular através do efeito do JH no discos imaginais de *Plodia interpunctella* demonstram que a adição de JHBP reforçou sinergicamente a ação do JH (SANDBURG et al., 1975a).

Um dos mais importantes aspectos de ação hormonal é o mecanismo através do qual os hormônios produzem seus efeitos a nível molecular. Uma norma geral na evolução hormonal é que os hormônios, assim como seus receptores podem sofrer alterações estruturais no curso do tempo, e a coordenação destas mudanças em ambas as estruturas, eleva a resposta fisiológica da interação hormônio/receptor, ex.: JH possui uma dupla função, induzindo processos de muda nos estádios juvenis e possuindo uma ação gonadotrófica nas fêmeas adultas, mas nos insetos primitivos contemporâneos (apterigotas) somente regula a reprodução cíclica durante a vida adulta; dificilmente estes insetos fazem metamorfose; o que sugere que a ação básica primitiva do JH era gonadotrófica, o que implicou numa aparição posterior de receptores para JH idênticos ou diferentes em diferentes tecidos. Algo similar deve acontecer com a Ec desde que este hormônio tem alguns efeitos supressivos no ciclo sexual de flagelados parasitos do trato alimentar de insetos (CLEVELAND &

NUTTING, 1955). Por outro lado, insetos tratados com substâncias quimicamente análogas ao JH são menos suscetíveis a infecção intestinal por *T. cruzi*, tendo-se observado que a infecção intestinal de insetos alimentados em pacientes chagásicos foi de 44.9% em ninfas normais de *P. megistus* e de 6.5% para aquelas tratadas com análogos do JH (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al., 1975).

O mecanismo de ação do JH nas células alvo ainda não está esclarecido embora tenha sido proposto um modelo, por WILLIAMS e KAFATOS (1972) baseado no fato que o genoma de cada célula é subdividido em 3 "módulos" de genes: larva, pupa e adulto, cada qual controlado pelo seu gen regulador principal, o JH atuando como um correpressor que participa no controle negativo do gens regulatórios dos sets pupal e adulto.

Diferentemente dos ecdisteróides não existem evidências de receptores nucleares para o JH nos órgãos alvo, mas sim de receptores citosólicos para JH no CG e epitélio folicular (KOEPEPE, 1981). Em *R. prolixus* foi detectada a existência de receptores saturáveis e específicos para JH na membrana das células foliculares (HENCHUK & DAVEY, 1985). Aparentemente O JH liga-se a um peptídeo que faz parte do complexo Na, K-ATPase, envolvido no transporte de Na através das membranas celulares e na atividade da 20-OH-Ec (KROEGER, 1963; KROEGER & LEZZI, 1966) e do JH (LEZZI & GILBERT, 1972). Sabe-se que ligando-se a ouabaina, um glucosídeo esteróide que é um inibidor específico da Na,K-ATPase (ABU-HAKIMA & DAVEY, 1979), o JH atua como um inibidor não competitivo da ouabaina ligante. Desde que a ligação Na,K-ATPase/ouabaina causa a inibição da enzima, a ação do JH será a de decrescer o efeito inibidor e aumentar a atividade da Na,K-ATPase (HENCHUK & DAVEY, 1982). Em *R. prolixus*, observou-se que o JH aumentou em 3 vezes a atividade da Na,K-ATPase nas células foliculares dos folculos vitelogênicos (ABU-HAKIMA & DAVEY, 1979; HENCHUK & DAVEY, 1982).

Este efeito na atividade de uma enzima exercido pelo JH, adicionado aos diferentes efeitos observados em outros tecidos (bloqueio da síntese de proteína nos últimos estádios larvares, indução da síntese de

vitelogenina nas fêmeas adultas e a indução da fosfatase ácida ovariana) indica a versatilidade da resposta fisiológica por ação do JH (STOKA, 1987).

2.6.3. Hormônio protoracicotrópico

O PTH foi o 1º hormônio de insetos a ser descoberto e o 1º neurohormônio a ser descrito em algum animal (GRANGER & BOLLENBACHER, 1981). KOPEC (1917) realizou estudos em *Lymantria dispar*, na qual efetuou a ligadura entre as metades superior e inferior da larva. Quando estas ligações foram feitas em um estágio crítico, a metade anterior realizava pupação enquanto a posterior permanecia larval. Em 1922, KOPEC observou que a estirpação do cérebro antes deste período crítico prevenia a pupação, concluindo que o cérebro do inseto libera um fator humoral que afeta a muda pupal. Estes estudos foram ignorados por cerca de 10 anos até que a significância das células neurosecretoras no cérebro dos vertebrados foi estabelecida por SCHARRER (1928). Os estudos de KOPEC representam a 1ª demonstração da função humoral do cérebro do inseto e a 1ª indicação em algum animal de que o sistema nervoso possui uma função endócrina.

WIGGLESWORTH (1934) corroborou as idéias de KOPEC através de estudos em *R. prolixus*, nos quais a implantação de regiões cerebrais em ninfas decapitadas foram hábeis para levar estas ninfas à muda, demonstrando que o fator no cérebro do inseto responsável pela muda estava localizado no protocérebro dorsal, uma área que contém células neurosecretoras. WIGGLESWORTH concluiu que estas células produzem um fator indutor da muda por ele chamado hormônio cerebral. Estudos posteriores realizados por HACHLOW (1931), PLAGGE (1938) e FUKUDA (1941) indicaram que outro fator estava envolvido. Descobriram que a fonte deste outro fator são as PGs e a natureza da relação entre cérebro e PGs foi finalmente resolvida por CARROL WILLIAMS (1947, 1952) estudando o desenvolvimento adulto de *Hyallophora cecropia*. Enquanto a implantação do cérebros ativos de pupas em desenvolvimento em abdômens isolados de

pupas em diapausa falharam para induzir a resposta, a implantação de cérebros junto com GPs estimulou o desenvolvimento adulto com uma muda metamorfoica para um abdômen adulto. Williams concluiu que o cérebro estimula as PGs a produzir um hormônio que induz a muda, definindo a base hormonal para muda em insetos.

A maior parte dos ensaios biológicos para estudo do PTH foram realizados utilizando pupas de lepidopteros, principalmente *Bombix mori* (KOBAYASHI & YAMAZAKI, 1974), *Samia cynthia ricini* (ISHIZAKI & ICHIKAWA, 1967) e *Hyalophora cecropia* (WILLIAMS, 1952). Todos os ensaios são basicamente similares em modelo, performance e interpretação aos experimentos utilizados em *H. cecropia* para definir o eixo endócrino cérebro/GPs (WILLIAMS, 1952). Eles envolvem uma muda em estado de desenvolvimento interrompido por estirpação de seu cérebro imediatamente após a ecdise pupal. A implantação de um cérebro ativo ou a injeção de um extrato contendo atividade PTH nestas mudas, inicia a metamorfose para adulto. As respostas para desenvolvimento adulto tornam-se evidentes em cerca de 2-3 semanas. Dependendo das espécies utilizadas respostas positivas alternativas podem ser observadas como por ex. a retração da epiderme (WILLIAMS, 1968).

GIBBS & RIDDIFORD (1977) desenvolveram um método mais rápido e sensível para experimentar o efeito do PTH no desenvolvimento, utilizando o enforcamento antes da liberação do PTH em 4 estágios de *Manduca sexta*, obtendo uma resposta positiva a injeção do extrato cerebral (muda pupal ou larval) em aproximadamente 1 a 2 dias.

STEEL et al (1982), correlacionando a ação da ecdisona, determinada por radioimunoensaio, a atividade celular neurosecretória, evidenciada pelo HCP (período crítico cerebral), concluíram que ocorrem dois períodos de liberação do PTH do cérebro do 5º estágio de *R. prolixus*, um imediatamente após a repasto sanguíneo e o segundo com 5 ou 6 dias.

KNOBLOCK & STEEL (1987 e 1989), trabalhando com vários estágios larvares de *R. prolixus*, examinaram, o tempo de liberação da atividade protorácicotrópica a partir de evidências obtidas de experimentos com

tranplantes de cabeça e sua habilidade para estimular o nível hemolinfático de ecdisteróides no corpo dos animais tranplantados, e demonstraram que a decapitação antes do HCP resulta em um rápido e permanente decréscimo do nível de ecdisteróides, enquanto que a decapitação após o HCP não impede o aumento normal dos níveis de ecdisteróides, evidenciando que a presença da cabeça é essencial logo antes do HCP e está associada ao aumento do nível hemolinfático de ecdisteróides.

Nestes trabalhos os autores também determinaram que a atividade PTH emana das cabeças de fêmeas 4 a 5 dias após o repasto sanguíneo e das cabeças de machos em 5 a 6 dias após a alimentação, concluindo que a atividade PTH é liberada da cabeça por um período de 48 horas após a alimentação e que este período ocorre um dia antes em fêmeas (KNOBLOCK & STEEL, 1987 e 1989).

GARCIA et al (1990), utilizando cabeças transplantadas, tratadas ou não com azadiractina, para corpos recipientes, tratados ou não com este composto, realizou uma comparação entre o efeito da azadiractina e do transplante de cabeças sobre a atividade PTH cerebral, concluindo que a azadiractina A interfere com a liberação do PTH do cérebro e do CC das larvas de *R. prolixus*.

O desenvolvimento de testes mais específicos "in vitro" para PTH só mais recentemente tem sido realizado. Trata-se de um tipo de ensaio desenvolvido como resultado de avanços técnicos e com um grande potencial de sucessos desde que monitora diretamente a ativação de PGs pelo PTH (BOLLENBACHER et al., 1979, 1980). Este tipo de ensaio foi desenvolvido com base no estabelecimento de condições culturais para manutenção de órgãos de insetos in vitro (MARKS, 1976), uma vez que as glândulas endócrinas são facilmente mantidas em cultura (AQUI, 1976). As técnicas "in vitro" são utilizadas para demonstrar a ativação da síntese de Ec pelas PGs em resposta ao cérebro (BOLLENBACHER & BOWEN, 1983), utilizando também tecidos específicos selecionados tais como integumento larval (AQUI et al., 1972; AQUI, 1975) e testículos (KAMBYSELLIS & WILLIAMS, 1971) coincubados com as PGs e monitorados para uma resposta

morfogenética indicativa de aumento na síntese de Ec. A limitação deste método consiste na utilização de uma resposta biológica para monitorar a ativação das GPs. O método que permite a quantificação da síntese de Ec em resposta ao PTH *in vitro* é o RIA para Ec (BORST & O'CONNOR, 1972; GILBERT et al., 1977).

A partir de 1940, quando WIGGLESWORTH realizou os estudos iniciais identificando no cérebro de *R. prolixus* uma região com as células neurosecretoras cerebrais, realizaram-se inúmeros trabalhos para identificar as células neurosecretoras cerebrais produtoras do PTH (PTH/CNSc), a partir de 3 diferentes abordagens do problema:

1) Ensaio biológico "in situ"- Mensuração da atividade de fragmentos cerebrais, determinando as CNSc mediais ou laterais do protocérebro como fonte do hormônio, dependendo do estudo e/ou do tipo de inseto (WIGGLESWORTH, 1940; WILLIAMS, 1948; GIBBS & RIDDIFORD, 1977).

2) Correlação entre eventos de desenvolvimento mediados por PTH com mudanças morfológicas e histológicas na aparência das CNSc- Consiste em tentativas de identificação em várias espécies de insetos (STEEL & HARMSSEN, 1971; KONO, 1973, 1975; HIRUMA & AQUI, 1977). A atividade das células é avaliada pela abundância e movimentação dos grânulos neurosecretores, sendo rapidamente aparente que a morfologia de uma CNSc particular pode mudar dramaticamente em um curto intervalo de tempo (BERLIND, 1977; STEEL & HARMSSEN, 1971). Entretanto estas variações celulares nunca foram relacionadas com variações nas taxas de síntese, estoque e transporte de um produto definido como PTH (BOLLENBACHER & BOWEN, 1983).

3) Comparações entre o desenvolvimento de animais normais e animais com obliteração por microcauterização de CNSc selecionadas.

Em *Megoura viciae* as CNSc do protocérebro são bem definidas com distinta orientação espacial, permitindo a cauterização de grupos celulares com uma área de 30 um. revelando que em animais cauterizados o grupo 2 das células protorácicas médias são necessárias para a

atividade, concluindo que seriam as CNSc\PTTH (STEEL, 1978). Com este método as CNSc\PTTH foram identificadas no cérebro de pupas de Manduca (AQUI et al., 1979; BOLLENBACHER et al., 1980).

O CC é historicamente assumido como o órgão neurohemal e sítio de liberação do PTH. Esta suposição é baseada na morfologia clássica de estrutura neurohemal deste órgão e na observação de material neurosecretório em seu interior. A exocitose deste material neurosecretório tem sido observada (GOLDSWORTHY & MORDUE, 1974; GILBERT & KING, 1973; WIGGLESWORTH, 1964).

Os níveis de PTH no cérebro e hemolinfa são inferidos de ensaios *in vivo* utilizando cérebros totais ou homogenatos cerebrais e dos estudos de ligação (Granger e Bollenbacher, 1981), cujos dados indicam os momentos de liberação de PTH e seu aumento na hemolinfa por método indireto. A muda e metamorfose em resposta a implantações cerebrais ou injeções de homogenato representam síntese ou estoque de PTH pelo cérebro.

Não existem atualmente mensurações dos níveis de PTH, pois não existe ensaio direto para o hormônio e os resultados frequentemente não guardam relação com o nível correspondente de ecdisona (BOLLENBACHER & BOWEN, 1983).

O nível de PTH é controlado por 1 ou mais dos seguintes mecanismos, variando consideravelmente entre diferentes espécies: Síntese, liberação, sequestro, catabolismo e excreção. O mecanismo de liberação parece ser o mais importante e controlado por estímulos ambientais. Fatores externos afetam as CNSc direta ou indiretamente via efetores neurais ou endócrinos, induzindo ou prevenindo a liberação, dependendo do inseto e do estado de desenvolvimento. Estes estímulos ambientais parecem depender do nicho particular ocupado pelo inseto e devem encaixar-se em uma das seguintes categorias básicas:

1) Estímulo proprioreceptivo ou mecanoreceptivo- Larvas de *Rhodnius* requerem repasto sanguíneo para disparar os eventos

neuroendócrinos para iniciar a muda (WIGGLESWORTH, 1934a). A distensão abdominal causada pelo repasto estimula receptores abdominais de extensão enviando sinais proprioreceptivos ao cérebro (VAN DER KLOOT, 1961), aumentando a atividade de CNSc selecionadas, o que está correlacionado com mudanças na sua atividade secretória e é seguido por aumento nos ecdisteróides hemolinfáticos (ORCHARD & STEEL, 1980). Outros insetos, tais como a *Locusta migratória* (CLARKE & LANGLEY, 1963) e o *Oncopeltus fasciatus* (NIJHOUT, 1979) apresentam mecanismos semelhantes ao *Rhodnius*.

Outros estímulos mecanoreceptivos tais como contatos em volta ou superpopulação, parecem exercer efeitos opostos aumentando a liberação em algumas espécies e diminuindo em outras, por mecanismos desconhecidos (CHURCH, 1955; BERREUR et al., 1979), mas indubitavelmente similares a *Rhodnius* (tradução para ação de sinais de receptores de senso periféricos).

Em Lepidoptera, um certo peso crítico deve ser atingido antes que a liberação do PTH possa ocorrer (BECK, 1970; NIJHOUT, 1975). Esta alometria deve ser traduzida por efetores nervosos que agem de forma similar aos proprioreceptores de *R. prolixus* (BOLLENBACHER & BOWEN, 1983).

2) Estímulo fotoperiódico, cicardiano e sazonal- Em muitas espécies de Lepidoptera, a liberação do PTH é um evento de abertura e sincronizado, ocorrendo somente em certos momentos durante o ciclo L:D (BOLLENBACHER & BOWEN, 1983).

Em *Manduca* e *Antheracea* a liberação de PTH é controlada por marcador cicardiano sensível a luz (TRUMAN, 1972; TRUMAN & RIDDIFORD, 1974; FUJISHITA & ISHIZAKI, 1981). Logo a liberação de PTH ocorre nas larvas que tenham alcançado peso crítico antes ou durante o momento fotoperiodicamente determinado que é iniciado somente uma vez a cada 24 horas.

Em *Manduca* a simples liberação de PTH que inicia a muda larval e a liberação pulsátil que induz muda pupal no início do último estágio são também eventos de abertura e sincronizados (BOLLENBACHER & GILBERT, 1981; GILBERT et al., 1981).

Em adição ao controle cicardiano e ambiental, existe uma regulação sazonal responsável pelo início da diapausa. Esta é uma regulação mais complexa que a cicardiana e os fatores ambientais que induzem a diapausa devem ser experimentados no início do desenvolvimento para resultar na liberação do PTH no final do desenvolvimento. O fotoperíodo é o principal estímulo a diapausa por efeito direto ou indireto via tradução neural ou hormonal (TAUBER & TAUBER, 1976; SAUNDERS, 1976; BECK, 1980).

3) Temperatura- Sozinha ou em conjugação com um fotoperíodo particular, pode afetar a indução ou terminação da diapausa (LEES, 1955; TAUBER & TAUBER, 1976; BECK, 1980). A *M. sexta* entra em diapausa em resposta a fotoperíodos curtos, mas dias curtos são inefetivos para gerar diapausa se a temperatura ambiental não estiver entre 26 e 30 graus. Se a criofase coincide com o período escuro, a incidência de diapausa aumenta, enquanto decresce com a coincidência de termofase com período escuro (THURSTON, 1976). A diapausa termina em *Manduca* com a exposição da pupa a poucos dias de elevada temperatura (RASUL, 1972). A inativação e estimulação da liberação do PTH em *Manduca* são dependentes da temperatura, em um complexo e particular caminho (BOLLENBACHER & BOWEN, 1963). Não se sabe como a variação de temperatura afeta as CNSc diferencialmente, mas especula-se que nucleotídeos cíclicos devem estar envolvidos neste processo (BERRY & RASENICK, 1981).

A demonstração da estrutura química dos diferentes tipos de PTH e a determinação precisa dos mecanismos de controle ambiental sobre a sua síntese, estoque e liberação, permitirão não só uma acurada quantificação dos seus níveis nas diferentes fases do desenvolvimento dos insetos, como também permitirão que finalmente se elucidem os processos endocrinológicos e fisiológicos envolvidos na recepção e tradução pelo sistema nervoso dos sinais ambientais que afetam as

células neurosecretoras ou uma via neuroendócrina (BOLLENBACHER & BOWEN, 1983).

2.7. Reguladores de desenvolvimento de insetos (GRs)

2.7.1. Interação inseto/plantas

As plantas são as mais abundantes formas de vida presentes em nosso planeta, exercendo as funções de coletores de energia e fonte de alimentos para a vida na Terra. Desde que as plantas são relativamente fixas e os insetos são frequentemente altamente móveis, os artifícios competitivos usados por plantas e insetos para a sobrevivência no tempo e espaço são especialmente interessantes (BOWERS, 1984). Para a maioria das plantas com flores, há um tipo de conflito semelhante aos das plantas polinizadas por insetos e das que comem insetos; embora as plantas precisem proteger-se contra um pastejo excessivo, elas também precisam dos animais para a polinização e, muitas vezes para a dispersão de sementes (EDWARDS & WRATTEN, 1980). Como consequência desta necessidade de uma estratégia coevolutiva com os insetos, as plantas desenvolveram mecanismos para explorar a mobilidade dos insetos, através da produção de flores, néctar, pólen e uma variedade de substâncias químicas atraentes designadas para influenciar um comportamento do inseto favorável a sua polinização cruzada (BOWERS, 1984). Químicos e biólogos reconhecem que muitas plantas produzem uma superabundância de substâncias químicas que aparentam conter pouca ou nenhuma importância para o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução (BOWERS, 1984).

FRAENKEL (1959), formalizou o conceito de substâncias secundárias de plantas produzidas por estímulos envolvidos como mecanismos botânicos de defesa. JERMY (1966) e THORSTEISON (1960) colocaram os fatores químicos vegetais atrativos e estimulantes em uma perspectiva balanceada com a importância das substâncias repelentes e fagoinibidoras. Finalmente EHRLICH & RAVEN (1965), enunciaram e codificaram a teoria da

coevolução entre plantas e herbívoros. Por esta teoria, as plantas desenvolveram com o passar do tempo uma série de mecanismos estratégicos de coevolução com os herbívoros que lhes permitem resistência seletiva ao pastejo excessivo associada com a utilização dos insetos para aumentar a sua viabilidade reprodutiva (EDWARDS & WRATTEN, 1980). São conhecidas cerca de 30.000 estruturas de compostos vegetais secundários (HABORNE, 1977). O sabor, palatabilidade e toxicidade de uma planta dependem das suas substâncias secundárias. Certamente estes mecanismos defensivos, incluem repelentes, fago-inibidores, hormônios e anti-hormônios que podem ser imensamente úteis para a proteção de plantas agrícolas e controle de insetos vetores de doenças. Alguns destes inseticidas derivados de plantas e conhecidos como de 3ª e 4ª geração, são intensamente tóxicos para os insetos e minimamente prejudiciais às populações humanas (BOWERS, 1984).

Estudos com fisiologia de insetos e química de plantas revelaram estratégias defensivas das plantas contra os insetos que não implicam em toxicidade intrínseca dos compostos secundários produzidos. Estas estratégias promovem uma interrupção direta sobre mecanismos fisiológicos específicos necessários para que o inseto possa realizar com sucesso sua metamorfose, reprodução, diapausa e comportamento, através de uma interferência com o seu sistema endócrino (BOWERS, 1984). Assim, compostos secundários que mimetizam ou antagonizam os principais hormônios de insetos (ex: ecdisona e JH), foram identificados em várias espécies de plantas. Uma vez que a presença ou ausência de JA e/ou ecdisona regula a embriogênese, metamorfose, reprodução, diapausa e determinação morfológica e sexual, a interrupção destes processos pode ser uma poderosa estratégia defensiva.

Exemplos de substâncias isoladas de plantas que demonstraram capacidade de agir sobre o sistema neuroendócrino de insetos seriam: (1) O precoceno I e II, compostos com atividade de anti-hormônio juvenil de insetos descobertos por BOWERS (1976) em extrato da planta *Ageratum houstonianum*, e capazes de promover a metamorfose precoce em insetos, como consequência da destruição do CA (BOWERS, 1977); (2) A azadiractina, um triterpenóide obtido de sementes da árvore tropical

Azadirachta indica (LAVIE et al., 1967; BUTTERWORTH & MORGAN, 1968; ZANNO et al., 1975), capaz de exercer efeito inibitório sobre o crescimento, desenvolvimento e reprodução de insetos através do decréscimo do nível de ecdisteróides, JH e PTH (REMBOLD & SIEBER, 1981; GARCIA & REMBOLD 1984; GARCIA et al., 1984; 1986; REMBOLD, 1984; 1987; 1989; DORN et al., 1986; SIEBER & REMBOLD; 1983; GARCIA et al., 1986; 1987; REMBOLD et al., 1987; GARCIA et al., 1990).

Não é surpreendente que as plantas utilizem uma grande variedade de substâncias defensivas em sua economia, uma vez estes químicos possuem ação não só contra insetos, como também sobre os patógenos de plantas (BOWERS, 1984).

2.7.2. Os princípios da ação antihormonal e do controle de insetos por desequilíbrio endócrino

Desde a aparição dos inseticidas comerciais de primeira (ex: nicotina, piretrinas e rotenonas) e segunda (ex: DDT e BHC) geração as principais metas a serem alcançadas surgiram com a finalidade de aumentar a eficiência no combate as pragas, melhorar o uso possível do investimento econômico e evitar efeitos danosos ao meio ambiente (STOKA, 1987). Este último tópico tem servido como fonte para métodos alternativos com vista a evitar (STOKA, 1987): efeitos secundários em outra espécie animal (inclusive o homem) e vegetal, que são muitas vezes mais danosos que as pragas por si só; aumento da resistência por parte das pragas aos inseticidas correntes devido a trocas na velocidade de penetração e inativação dos mecanismos dos inseticidas; aparição de pragas secundárias como resultado da eliminação das endemias naturais e a eliminação dos insetos úteis para polinização.

A partir deste ponto novas linhas de pesquisa surgiram, adotando diferentes estratégias para o controle de pragas entomológicas, tais como: Soltar livre no meio natural, machos estéreis criados em laboratório, uma proposta de decréscimo do potencial biótico das

espécies de pragas em poucas gerações; guerra biológica com o uso de entomopatógenos, tais como parasitos (bactérias e vírus); ferormônios sexualmente atraentes que possibilitem capturar e eliminar machos de espécies de pragas, com sucessiva e considerável diminuição dos níveis populacionais; uso de reguladores naturais de desenvolvimento (ou análogos sintéticos) para prevenir o desenvolvimento normal e crescimento, uma vez que o sistema endócrino dos insetos é responsável pelo desenvolvimento, metamorfose, reprodução e controle de outros processos (metabolismo de carboidratos e lipídeos, balanço hídrico e metabolismo mineral, etc), representando um ponto vulnerável no ciclo de vida destes artrópodes (STOKA, 1987).

É extremamente difícil determinar a natureza antineuroendócrina específica dos vários tipos de inibição do desenvolvimento e crescimento do inseto. Especial atenção deve ser dada aos fago-inibidores por sua interferência com os elos nutricionais envolvidos na ativação das glândulas neuroendócrinas (SLÁMA, 1978).

Os sinais ambientais ou nutricionais são captados por órgãos sensitivos no inseto e transmitidos aos centros neurosecretórios do sistema nervoso central, onde um determinado estímulo é transformado em um neurohormônio que através dos axônios das células nervosas alcança os tecidos alvos ou órgãos neurohemais a partir dos quais os hormônios são liberados na hemolinfa para atingir vários tecidos funcionalmente relacionados (SCHARRER, 1964).

As glândulas endócrinas (GE) são os alvos primários da cadeia de ação neuroendócrina e seus melhores exemplos são o CA e as PGs, que secretam seus hormônios distribuindo o estímulo funcional pelos tecidos secundários ou órgãos alvo periféricos (SLÁMA, 1978).

De acordo com SLÁMA (1978), os vários tipos de inibição específica são classificados de acordo com a sua natureza em:

1) Fatores antineurotrópicos- previnem a transformação do estímulo neural em neurohormonal, agindo no caminho entre os receptores e os centros neurosecretores.

2)a- Fatores antiadenotrópicos- previnem a estimulação glandular por ação antialatotrópica ou antiprotoraxicotrópica.

b) Fatores antineurohormonais- intervem com a com a ativação neurohormonal das GEs.

3) Fatores antihormonais- previnem o reconhecimento dos sinais hormonais pelas células alvo periféricas.

4) Fatores antihomeostáticos- fornecem uma falsa mensagem feed back aos pontos susceptíveis na cadeia de ação neuroendócrina.

Os fatores nutricionais exercem importante papel no controle ambiental da atividade neuroendócrina. Para que ocorra crescimento somático e desenvolvimento larval e ovariano, um mínimo de aquisição de material de reserva é necessário. Um mínimo de alimento e água é necessário para efetuar a apólise e ecdise, e os sinais nutricionais dão o compasso dos principais componentes da cadeia neuroendócrina (JOHANSSON, 1958; ENGELMANN, 1970).

A alimentação interrompida, jejum e má nutrição resultam em desenvolvimento parcial ou interrompido. Uma maior ou menor inibição do nível dos hormônios, defeitos nutricionais ou fago-inibidores causam certos desvios de desenvolvimento que sugerem a inibição seletiva de algum componente do sistema neuroendócrino (SLÁMA, 1978). Exemplos destas inibições seriam: aumento ou diminuição do número de estágios larvares (HURPIN, 1962), formação de larvas supranumerárias (BECK, 1972) e formação precoce de pupas e adultos de *Galleria melonella* (ALLEGRET, 1952).

É necessária uma análise prática dos possíveis sintomas inibitórios em cada elo do complexo neuroendócrino, para distinguir entre os efeitos especificamente antineurohormonais e antihormonais (SLÁMA, 1978).

Reguladores de desenvolvimento (GRs) são, geralmente, compostos que devido as suas características estruturais potenciam ou inibem a ação dos hormônios que regulam a metamorfose, ou previnem sua biossíntese (STOKA, 1987).

Este método de ação é lento e acompanhado por um alto grau de especificidade contra insetos em uma escala zoológica. Os inseticidas tradicionais de amplo espectro causam morte imediata, atacando o sistema nervoso e processos vitais, mas também exercem seus efeitos em outros organismos vegetais e animais (STOKA, 1987).

A conveniência da utilização das GRs como elemento de controle:

1) Não pode ser feito quando a praga possuir alguma das seguintes características: grande capacidade migratória, sobrevivência em uma grande variedade de hospedeiros e poucas gerações por ano.

2) Só pode ser feito por meio de bioreguladores tais como hormônios ou GRs agonistas ou antagonistas de ação hormonal, no ciclo de vida de insetos que possuem períodos determinados durante os quais a ausência do hormônio é necessária ou fatal para o desenvolvimento normal.

Os GRs estão classificados, de acordo com STOKA (1987), em agonistas ou mímicos da ecdisona, antagonistas da ecdisona, agonistas do JH e antagonistas do JH. Agonistas são substâncias que induzem uma resposta fisiológica similar ou idêntica a produzida pelo hormônio nativo, enquanto que antagonistas são substâncias que previnem a ação de um dado hormônio.

1) Agonistas da Ec

A Ec aplicada tópicamente nos insetos usualmente desbalanceia o desenvolvimento e o ciclo de muda, causando inclusive a morte. Os ecdisteróides possuem uma larga distribuição na biosfera, fatos estes que determinam que os ecdisteróides sejam considerados inseticidas em potencial.

A 20-hidroxi-ecdisona é o mais ubíquo dos ecdisteróides presentes em plantas superiores e invertebrados. Embora sua presença em vegetais superiores seja relacionada como uma função defensiva contra insetos fitófagos (GALBRAITH & HORN., 1966), esta função não é cumprida em certas espécies que se alimentam em plantas com altos teores de ecdisteróides (HIKINO & TAKEMOTO, 1974).

A Ec em altas doses causa uma apólise acelerada associada com sintomas patofisiológicos e em baixas doses provoca uma indução prematura da formação do último estágio larval e metamorfose. Provavelmente estes efeitos possuem uma base comum com os efeitos antialatotrópicos devido a retroalimentação negativa com a atividade do JH à nível dos tecidos alvos periféricos (SLÁMA., 1978).

A eficácia dos ecdisteróides no controle de pragas é baixa já que o tratamento para ter sucesso deve ser aplicado diretamente e em altas concentrações. Este fato associado ao alto custo de síntese orgânica ou extração do hormônio de vegetais, faz com que os ecdisteróides não sejam usados como controle de pragas em condições de campo (STOKA, 1987).

2) Antagonistas da ecdisona

O metabolismo dos fitoesteróides em insetos demonstra que o Sitosterol, Stigmasterol e Campesterol são convertidos em Demosterol através de sucessivas transformações para Ecdisteróides (ROBBINS et al., 1975; THOMPSON et al., 1973). Descobertas feitas usando inibidores do metabolismo de esteróides desenvolvias em investigações biomédicas

tornaram-se úteis para uso no estudo do metabolismo de ecdisteróides em insetos (SVOBODA & ROBBINS, 1967). Estes inibidores, incluindo o triparanol e um número de animais estruturalmente relacionadas ao JH (ROBBINS et al., 1975) inibem a enzima A, 24-esterol redutase, responsável pela conversão do desmosterol em colesterol em vertebrados e insetos. Estes compostos anticolesterêmicos chamados azasteróides, são usados somente em insetos fitófagos, desde que os hematófagos retirem o colesterol da dieta. É necessário analisar o uso de azasteróides com cuidado em função de seus efeitos colaterais em vertebrados, onde os hormônios esteróides exercem importante efeito fisiológico (STOKA, 1987).

As funções nutricionais estão estreitamente ligadas a ativação das PGs e aparentam ser automaticamente reguladas livremente dos centros neuroendócrinos. Os efeitos anti-ecdisona causam um atraso seletivo da ontogenese de um determinado estágio de desenvolvimento. A apólise e o desenvolvimento do novo estágio será prevenido embora o crescimento somático se realize nos limites do dado estágio. O estágio larval afetado irá hipertrofiar na medida na medida dos substratos de reserva utilizados (SLÁMA, 1978). Existem compostos que não previnem a apólise mas inibem os estágios finais de formação da nova cutícula ou intervêm com a ecdise, como por exemplo a Ajugarina (KUBO et al., 1976) e Ajugalactona (KOREEDA et al., 1970).

O processo de ativação das células epidérmicas esta conectado com extensas divisões celulares (WIGGLESWORTH, 1972), o que o faz facilmente sujeito a vários tipos de efeitos não específicos antimitóticos, antimetabólicos e inibidores do crescimento em geral (SLÁMA, 1978). A ativação das PGs está estreitamente dependente da nutrição. O jejum, as carências nutricionais e a fagoinibição produzem efeitos similares a ação antihormonal específica uma vez que o sistema endócrino não foi convenientemente ativado (SLÁMA, 1978). Além disto, ocorre uma retroalimentação entre as atividades JH e protoracica que pode ser positiva ou negativa dependendo do sistema, por exemplo, aplicado em estágios críticos o JH exerce efeitos positivos sobre a atividade protoracica de certos sistemas (KRISHNAKUMARAN & SCHEINEIDERMAN, 1965) e

inibitórios sobre a atividade protoracica e apólise em larvas de *Galleria* (SLÁMA, 1975) e *Dermestes* (SLÁMA & HODKOVÁ, 1975).

3) Agonistas do JH

Os efeitos de compostos que mimetizam a ação do JH já foram observados em várias espécies de insetos (STAAL, 1975; MORGAN et al., 1975). Os primeiros compostos isolados com este tipo de ação foram denominados juvabiona (SLÁMA & WILLIAMS, 1965) e juvociminas (BOWERS & NISHIDA, 1980). Uma das dificuldades neste estudo é que quando o JH penetra na hemocele e certos tecidos, como C.G e epiderme, é atacado por enzimas inativantes que previnem sua ação prolongada. Uma das alternativas para evitar as defesas metabólicas dos insetos foi a síntese de análogos do JH não suscetíveis a ação destas enzimas (STOKA, 1987). Interessantes resultados foram obtidos com análogos do JH em diferentes laboratórios (LAW et al., 1966; BOWERS, 1968; BOWERS, 1969; ROMANUK et al., 1967; HEINRICK et al., 1973), que realizaram a síntese e avaliação de centenas destes compostos com alta atividade específica, alta estabilidade, baixo custo e grande seletividade para certas ordens de insetos.

Estudos com vetores da doença de Chagas (WIGGLESWORTH, 1969; WIGGLESWORTH, 1973; BARRET, 1974; PATTERSON, 1973; PATTERSON & SCHWARZ, 1977; MOUSSATCHE et al., 1970; PINCHIN et al., 1978; OLIVEIRA FILHO et al., 1984) resultaram em interessante conhecimento da relação entre estrutura e atividade dos análogos do JH nos insetos triatomíneos, revelando que diferenças no isomerismo e balanço polar\apolar são mais importantes para a atividade do análogo de JH que a presença de certos substituintes.

Os compostos com efeitos mais prolongados ou persistência (PATTERSON, 1973) possuem as seguintes características:

1) Rápida passagem através da cutícula, atingindo níveis adequados para a produção de efeito juvenilizante.

2) Estrutura que resista aos ataques da esterase JH e da epoxihidratase.

3) Produtos que não possuem ligações ester ou grupos epoxidados em sua estrutura molecular possuem grande estabilidade e persistência evitando os processos metabólicos de defesa.

Os análogos do JH também possuem atividade ovicida impedindo que os ovos choquem (PATTERSON & SCHWARZ, 1977; OLIVEIRA FILHO et al., 1984). Os insetos tratados com análogos do JH são menos suscetíveis a infecção intestinal com *T. cruzi*. Estudos realizados com *P. megistus* revelam que insetos alimentados em pacientes chagásicos apresentaram um índice de infecção de 44.9% em ninfas normais e 6.5% em ninfas trata-das tópicamente com JH (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al., 1975). É importante assinalar que alguns analogos do JH não possuem idêntica eficiência em diferentes espécies de hemipteros (PINCHIN et al., 1978).

4) Antagonistas do JH

Os insetos pterigotas possuem um mecanismo fisiológico que desliga seletivamente a atividade do CA no penúltimo estágio larval (WIGGLESWORTH, 1972; SLÁMA, 1978). Este mecanismo não é especificamente antijuvenil pois os tecidos retêm plenamente a suscetibilidade os JH (SLÁMA., 1975). A allatectomia resulta em formação prematura do último estágio com as futuras consequências da metamorfose (PLUGFELDER, 1958).

Protetelia é o resultado da ação anti-CA ou anti-JH com a consequente formação de insetos adultóides. O efeito oposto é a metatelia, que é definida pelo excesso de atividade do CA ou pelo tratamento de larvas com JH ou análogos resultando na formação de insetos juvenóides (NOVÁK, 1975).

A mais importante condição endócrina na origem dos protetélicos e metatélicos, se induzida por ação antihormonal específica ou não, está no fato de que ecdisona e JH interagem especificamente a nível de tecidos periféricos e/ou do sistema nervoso central, por meio de um mecanismo de retroalimentação, capaz de regular as etapas de desenvolvimento do inseto (SLÁMA, 1978).

Os fundamentos teóricos para o cálculo da ação antiallatotrópica e antijuvenil em adultos são fornecidos pelos sintomas fisiológicos da diminuição da atividade do JH natural (diapausa) ou artificial (alatectomia). A allatectomia resulta em inibição seletiva do desenvolvimento ovariano enquanto as funções nutricionais permanecem preservadas, ocorrendo hipertrofia no corpo da fêmea. Similarmente uma acumulação de material de reserva ocorre durante o período prédiapausa adulto (ENGELMANN, 1970).

A atividade do CA pode ser inibida por carências nutricionais ou completamente prevenida pelo jejum (JOHANSSON, 1958; NOVÁK, 1970; ENGELMANN, 1970). Em fêmeas adultas de espécies onde a diapausa é uma parte do programa de desenvolvimento, uma inibição similar da atividade do CA pode ser obtida meramente pela manipulação das condições ambientais de temperatura e fotoperiodismo (DE WILDE, 1975). Esta inativação do CA não ocorre necessariamente por uma ação específica antialatotrópica, uma vez que o tratamento com JH exógeno ou similares exerce efeitos estimulatórios sobre o crescimento ovariano mesmo em fêmeas não alimentadas ou completamente em jejum, o que demonstra a existência de algum material de reserva no corpo gorduroso (SLÁMA, 1978).

O processo de desenvolvimento ovariano representa um metabolismo eficiente com larga demanda de energia e substratos e, devido a isto extremamente sensível a todos os tipos de inibidores metabólicos não específicos, agentes antimetabólicos e compostos tóxicos em geral. Desta forma uma larga raridade de inibidores não específicos podem mimetizar os efeitos antijuvenis sobre o desenvolvimento ovariano.

Nesta classe os principais produtos estudados são os compostos denominados como precoceno I (2-methoxi-2,2-dimetilchromeno) e precoceno II (6,7-dimethoxi-2,2-dimetilchromeno), descobertos na planta *Ageratum houstonianum*. Com estes produtos foram realizados numerosos estudos de aspectos fisiológicos como muda e reprodução levando à proposta do seu uso como a 4ª geração de inseticidas. O Precoceno 2 induz a metamorfose precoce agindo como um antialatotrópico (UNNITHAN et al., 1977; PENNER et al., 1978) que produz atrofia das células parenquimatosas do CA. O CA possui uma alta atividade de monoxigenase, que transforma o precoceno 2 em 3,4 epóxide e 3,4 epóxiprecoceno, produtos letais para o inseto (BROOKS et al., 1979; PRATT et al., 1980; BOWERS et al., 1981).

Teóricamente todos os tecidos que possuem monoxigenase são vulneráveis ao Precoceno 2, como por ex. os tecidos intestinais de *R. prolixus*, onde os efeitos citotóxicos do Precoceno levam a uma fagoinibição (TARRANT & CUPP., 1978; AZAMBUJA et al., 1981a; AZAMBUJA et al., 1981b; AZAMBUJA et al., 1982). Além do *R. prolixus*, outros triatomíneos são sensíveis aos efeitos do precoceno li, como por exemplo *Panstrongylus megistus* (OLIVEIRA FILHO et ai., 1980; JUBERG et al., 1982), *Triatoma dimidiata* (TARRANT et al., 1982) e *Triatoma infestans* (RONDEROS & STOKA, 1984). O produto também atua sobre as PGs e CNSc (AZAMBUJA et al., 1981a; MASNER et al., 1979) levando a uma diminuição da muda, do oogênese e a ausência de cópula em adultóides e curta expectativa de vida, provavelmente servindo como controle para a doença de Chagas (STOKA, 1987).

5) Químioesterilizantes

Os compostos mais estudados são os Benzilfenóis e os Benzil-1,3-Benzodiazoles (JURD et al., 1979), que se demonstram altamente efetivos como esterilizantes de fêmeas de mosquitos (LANGLEY et al., 1982; VAN MELLEARR et al., 1983), nas quais o desenvolvimento ovariano não foi restaurado pela administração de ecdisteróides ou JH (DYTE, 1972; CERF, 1972). Até o momento seus efeitos em triatomíneos não é conhecido.

6) Ação antineurotópica

A ação antineurotrópica embora possa não ser necessariamente antihormonal, deve causar sérias consequências antihormonais nos componentes subordinários do sistema neuroendócrino (SLÁMA, 1978). Existem numerosos exemplos na endocrinologia de insetos que demonstram o impacto do estímulo nervoso na atividade hormonal como por ex. os efeitos do contato com a humidade na pupação de *Sarcophaga peregrina* (OTHAKI, 1966), o papel dos impulsos nervosos no controle hormonal da reprodução das fêmeas adultas de baratas (ENGELMANN, 1970) e a ativação hormonal pelos sinais nervosos da distensão abdominal em *R. prolixus* (WIGGLESWORTH, 1964). Estes efeitos devem representar parte da regulação homeostática na estimulação hormonal e inibição nervosa de certos processos de desenvolvimento (VAN DER KLOOT, 1961; HODKÓVA, 1976). Existem ainda mecanismos correspondentes envolvendo interações puramente químicas (WIGGLESWORTH, 1964; DAVEY & HUEBNER, 1974; DE WILDE, 1975). Uma ação antihomeostática deve incluir efeitos inibitórios ou estimulatórios no sistema, dependendo se afeta reações de retroalimentação negativa ou positiva respectivamente (SLÁMA, 1978).

7) Ação fagoïnibidora e antihormonal

Qualquer substância que reduza a taxa de alimentação de insetos necessariamente interrompe a cadeia neuroendócrina de ação, por uma inibição não específica de algum processo de desenvolvimento hormonalmente estimulado (SLÁMA, 1978). A ação fisiológica de vários fagoïnibidores de origem vegetal baseia-se na ação repelente ou antimetabólica (BECK, 1965; FRAENKEL, 1969) de compostos inseticidas obtidos de plantas tais como a nicotina, piretrinas e rotenonas (JACOBSON & CROSBY, 1971). A estrutura química destes compostos ativos geralmente envolve alcaloides, glucosídeos, compostos heterocíclicos, estruturas aromáticas metoxiladas, lactonas isoprenóides, cumarinas, terpenóides e esteróides (HEROUT, 1970; MUNAKATA, 1975).

As inibições relacionadas a alimentação representam um complexo de efeitos farmacológicos (irritação dos órgãos sensórios, inibição do

metabolismo digestivo, competição por substratos enzimáticos, etc). Alguns fagoïnibidores produzem trocas de desenvolvimento que sugerem distúrbios especiais na integridade neuroendócrina (SLÁMA, 1978) como por exemplo a Azadiractina, composto capaz de causar a formação de metatéticos em *Pieris brassicae* e ocasionalmente protetéticos (RUSCOE, 1972).

É necessária a determinação dos seguintes critérios mínimos para especificar a ação antihormonal dos potenciais candidatos fagoïnibidores à agentes antihormonais (SLÁMA, 1978):

1) O tempo de ecdise protetética ocorre nos limites do último estágio nos induzidos por ação antialotrópica, ecdisona ou antijuvenil e mais prolongada nos casos de carência nutricional e fagoïnibição.

2) Nas inibições ontogenéticas antiecdisona induzidas ocorrem hipertrofia somática, fagoïnibição e desenvolvimento inibido.

3) A inibição do crescimento ovariano quando é devida a fagoïnibição ocorre paralelamente ao crescimento subnormal do corpo feminino.

4) Os efeitos dos fagoïnibidores estão mais associados a morte e limitação do crescimento, enquanto os efeitos antihormonais normalmente acarretam consequências letais imediatas.

5) Protetéticos não específicos aparecem após a exposição de vários estádios ao agente fagoïnibidor, enquanto características realmente antihormonais são efetivas em um único estágio de desenvolvimento.

Em princípio as inibições de desenvolvimento causadas por fagoïnibidores são meramente consequências de distúrbios severos na coordenação das funções neuroendócrinas com os sinais nutricionais apropriados. Sua interferência com o processo de transformação dos sinais

ambientais pode também ocorrer não especificamente em algum nível da cadeia neuroendócrina de ação.

6) Dose utilizada

Um interessante aspecto dos efeitos de substâncias capazes de interferir sobre o desenvolvimento, crescimento e reprodução de insetos, diz respeito aos diversos efeitos obtidos por diferentes doses de uma mesmo composto. De fato, como assinala SLÁMA (1978), é extremamente difícil determinar a natureza específica dos vários tipos de inibição do desenvolvimento, as quais podem ser também não específicas, ou seja, produzidas por inibição geral do desenvolvimento e crescimento do inseto. Especial atenção deve ser dada aos fagoinibidores por sua interferência com os elos nutricionais envolvidos na ativação das glândulas endócrinas (SLÁMA, 1978).

GARCIA & REMBOLD (1984) e GARCIA et al (1984) estudaram os efeitos da azadiractina A sobre o desenvolvimento de ninfas de 4 ° estágio de *R. prolixus*. A administração oral do composto levou os autores a estabelecer um protocolo dose-resposta para o efeitos fagoinibidor e inibidor da muda, concluindo que as doses efetivas (DE50) capazes de inibir 50% destes parâmetros biológicos possuem entre si uma diferença de 650 vezes. Estes resultados demonstram que as atividades fagoinibidora e inibidora da muda da azadiractina são fisiologicamente distintas e independentes entre si .

De acordo com STOKA (1987) a estratégia para o controle de populações de pragas é um controle integrado. Nenhum produto deve ser utilizado unicamente, graças a seleção de indivíduos resistentes na população afetada. Diferentes métodos de controle (compostos químicos, patógenos e predadores) e estudos sócio-econômicos das comunidades endêmicas, devem ser sinérgicamente utilizados para controlar a transmissão da doença de Chagas. O controle deve ser realizado em bases ecológica, bioquímica, fisiológica e toxicológica (STOKA, 1987).

2.8. Azadiractina

O triterpenóide azadiractina foi isolado de sementes da árvore tropical *Azadirachta indica* por BUTTERWORTH e MORGAN (1968). Sua fórmula estrutural definitiva (fig.5), que se assemelha muito à ecdisona, foi finalmente elucidada em 1985 (KRAUS et al., 1987; BILTON et al., 1985). Na Ásia e na África, a *A. indica* e a *Melia azadirach*, ambas plantas da família *Meliaceae*, são amplamente utilizadas na medicina (KOUL et al., 1989) e no controle de pragas agrícolas (REMBOLD, 1984). A azadiractina é reconhecida como um composto com propriedades fagoinibidora e interruptora do crescimento em insetos e nematódeos (WARTHEN, 1979; JACOBSON, 1986; REMBOLD, 1987; 1989). Além disto a Azadiractina é considerada um agente controlador bioracional para populações de insetos graças a sua alta eficiência contra pragas e sua aparente não toxicidade para vertebrados (LARSON, 1987).

Um dos primeiros trabalhos realizados com a *A. indica*, foi desenvolvido por PRADHAN e colaboradores em 1962, demonstrando que sua semente causa uma inibição da alimentação da alimentação em *Locusta migratória* (PRADHAN et al, 1962). Outros autores mostraram que o extrato da semente, dependendo da espécie do inseto, pode causar inibição do crescimento, perda da fecundidade e aumento da mortalidade (STEFFENS & SCHUMUTTERER, 1982; ZEBITZ, 1984).

Trabalhando com *spodoptera litoralis*, MEISNER et al (1983) observaram que larvas submetidas a dieta composta de folhas tratadas por pulverização, com extrato metanólico seco apresentaram perda de peso quando comparadas a insetos alimentados com dieta normal. O composto determinou um forte efeito fagoinibidor e evidenciou ser também um regulador do crescimento dessa espécie, uma vez que que o tratamento inibiu a pupação e promoveu distúrbios na muda.

REMBOLD et al (1980), tentando isolar compostos de *A. indica* que pudessem causar distúrbios de desenvolvimento e metamorfose, independente

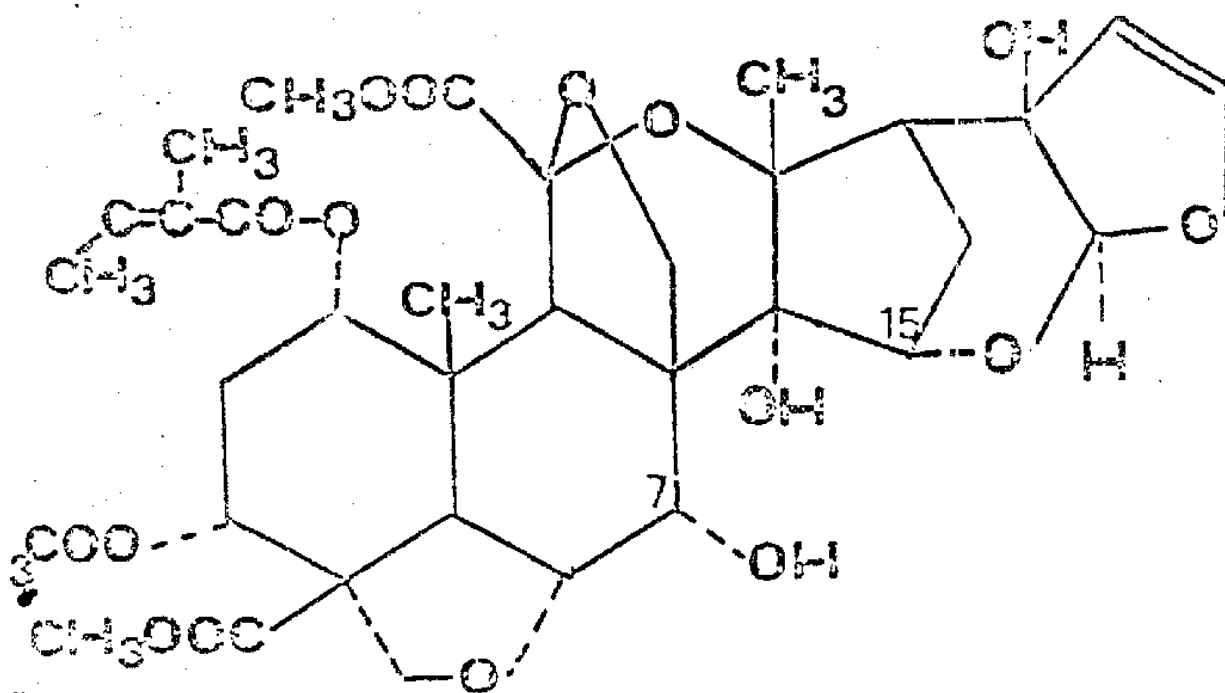


Figura 5- Fórmula estrutural da azadiractina (Koul et al, 1989).

da fagoïnibição, purificaram e obtiveram uma série de frações que induziam atraso no desenvolvimento larval e deformação de pupas e adultos de *Ephestia kuchniella* e *Apis mellifera*. Em *Ephilachna verivestis*, o tratamento promoveu alta percentagem de mortalidade. Mais tarde, purificando azadiractina por cromatografia líquida de alta pressão, estes autores demonstraram que o composto é um potente regulador do crescimento de insetos, possuindo esta propriedade independentemente da atividade fagoïnibidora, uma vez que em sua forma pura não demonstrou nenhuma atividade de inibidor da alimentação nestas 3 espécies holometabólicas (REMBOLD et al., 1982).

Trabalhando com o último estágio ninfal de *L. migratória*, SIEBER & REMBOLD (1983), observaram que o consumo de alimento era influenciado pela azadiractina de forma dependente da concentração da substância na dieta, e que as ninfas submetidas à injeção do composto apresentavam ganho de peso corporal normal associado a uma inibição da ecdise pelo bloqueio da síntese de ecdisteróides. Além disto comprovou-se uma alteração da ovogênese em *L. migratória*, concluindo-se que o composto interferia na regulação neuroendócrina e diminuía a síntese de ecdisteróides (REMBOLD & SIEBER, 1981).

GARCIA & REMBOLD (1984) demonstraram o efeito da azadiractina sobre o desenvolvimento do 4º estágio de *R. prolixus*. A administração oral do composto levou os autores a estabelecer uma dose resposta para o efeito fagoïnibidor e a inibição da muda, calculando assim as doses efetivas (DE50) que inibem 50% destes 2 parâmetros biológicos, e concluindo que a diferença entre elas foi de 650 vezes, dado este que enfatiza a independência e distinção fisiológica das atividades fagoïnibidora e inibidora da muda da azadiractina.

2.8.1. Fagoïnibição

Azadiractina ou extratos contendo azadiractina a partir de sementes demonstram um óbvio efeito fagoinibidor. Existem diferenças, entretanto, na potência destes efeitos, dependendo da concentração do princípio ativo e das espécies de insetos tratadas (SCHMUTTERER, 1988). O efeito fagoinibidor do composto foi demonstrado em diversas espécies de insetos, principalmente em larvas de lepidopteros (NAKANISH, 1980; RUSCOE, 1972; WARTHEN et al., 1978; REDFERN et al., 1981). O gafanhoto do deserto, *Schistocerca gregaria*, por exemplo, prefere morrer a alimentar-se em plantas tratadas (SCHMUTTERER, 1985). A concentração necessária para causar 100% de fagoinibição nesta espécie é de 40 ug/l (BUTTERWORTH & MORGAN, 1968). Um efeito fagoinibidor primário, dependente dos órgãos sensórios da boca, e um efeito fagoinibidor secundário devem ser diferenciados. O último é observado não somente após a ingestão de alimento tratado, mas também após a aplicação tópica e injeção do princípio ativo (SCHMUTTERER, 1985).

Em *R. prolixus*, a azadiractina inibe a alimentação de uma forma claramente dose-dependente (GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al., 1984). A partir destes estudos determinou-se que a dose efetiva (DE50) requerida para fagoinibição é de 25 ug/ml de sangue. Azadiractina B e 7-acetil-azadiractina são tão potentes quanto azadiractina A, no que diz respeito a inibição da alimentação. Além disto o composto não revelou efeitos tóxicos agudos em doses maiores que 50 ug/ml de sangue (GARCIA et al., 1984).

Uma vez demonstrado que o ATP estimula a ingestão pelo *R. prolixus*, tanto de sangue (FRIEND & SMITH, 1977) quanto de repasto artificial (AZAMBUJA et al., 1982), AZAMBUJA (1985) mostrou que o efeito fagoinibidor da azadiractina pode ser revertido pela adição de ATP ao repasto sanguíneo, mantendo-se constantes as concentrações de azadiractina A. Desta forma sugere-se que a azadiractina A bloqueia os quimiorreceptores que normalmente respondem aos fagoestimulantes (AZAMBUJA, 1985).

2.8.2. Interrupção do desenvolvimento (inibição da muda)

Azadiractina é um potente inibidor da muda e do desenvolvimento de insetos. Este efeito, de grande importância prática para o controle de populações de insetos, foi observado em Orthoptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (SCHMUTTERER, 1987, 1988; BIDMON et al., 1986; BUTTERWORTH & MORGAN, 1968; DORN, 1986, 1987; REMBOLD, 1980; GARCIA & REMBOLD, 1984; MANSOUR et al., 1987).

Azadiractina aparentemente inibe o desenvolvimento e a muda induzida por ecdisteróides em insetos holometabolos (STEETS, 1975) e hemimetabolos (SIEBER & REMBOLD, 1983). BECKAGE et al (1988) assinalam que a injeção de azadiractina em larvas de *Manduca sexta* parasitadas por *Cotesia congregata* afeta adversamente o desenvolvimento do endoparasito. Alguns ostracóides (SCHMUTTERER, 1987) e nematóides (SCHMUTTERER, 1988) são também sensíveis.

GARCIA et al (1984) observaram em 5° estágio de *R. prolixus*, que todos os indivíduos paralizam seu desenvolvimento quando ingerem azadiractina à 1.0 ug/ml de sangue, e, a existência de uma relação dose dependente para a indução de inibição da ecdise (GARCIA & REMBOLD, 1984). A DE50 para inibição da muda do 4° estágio larvar foi de 40 ng de azadiractina A/ml de sangue e de 15 ng de azadiractina B/ml de sangue. Entretanto foi necessária uma dose de 450 ng de 7-acetil-azadiractina A/ml de sangue para se obter a inibição da muda, uma concentração 30 vezes maior do que a necessária para se obter o mesmo efeito com a azadiractina B. Estes dados demonstram que a 7-acetilação da azadiractina A levou a uma mudança estrutural que causou uma grande perda da atividade de inibição da muda. É provável que a acetilação bloqueie elementos estruturais da azadiractina A que são importantes para a absorção intestinal do composto ou para o efeito inibidor da muda por si próprio (GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al., 1984).

GARCIA et al (1984) também observaram que a ED50 para inibição da muda por azadiractina e análogos foi de 60 a 1800 vezes menor que a ED50 para a inibição da alimentação. Estes dados suportam a hipótese de que

os efeitos antimuda e fagoinibidores da azadiractina e análogos são distintos entre si, assim como o seu modo de ação.

Ao lado destes efeitos inibitórios da muda, observou-se um marcante prolongamento da duração do estágio, seguida por morte, o que enfatiza a força da atividade inibitória sobre a muda deste composto. Somente poucas ecdises foram observadas 6 meses após um simples tratamento, e após no mínimo 6 realimentações com sangue livre de azadiractina (GARCIA et al., 1984, 1990).

É geralmente aceito que o *R. prolixus* passa por um período crítico cerebral (HCP) para ecdise em relação ao seu tempo de alimentação. Alguns dias após a alimentação o cérebro não é mais necessário para que o inseto mude (KNOBLOCK & STEEL, 1987; 1989). Este período depende de um fator originário da cabeça (hormônio cerebral) (WIGGLESWORTH, 1934, 1940), que idêntico ao PTH devido aos seus efeitos estimulatórios sobre as glândulas protorácicas (PGs), que secretam os ecdisteróides (GILBERT et al., 1980). Se azadiractina exerce seus efeitos fisiológicos na muda por um atraso ou inibição da biossíntese dos ecdisteróides em *R. prolixus*, o momento da aplicação será essencial e somente uma aplicação deste composto no início do período imtermuda irá causar seus efeitos fisiológicos na ecdise. Assim, se azadiractina for aplicada após o HCP, quando o programa regulatório cerebral controlador da próxima muda já estiver iniciado, o inseto mudará normalmente. Visando estabelecer o limite do período sensível para azadiractina, a resposta do 4º estágio do *R. prolixus* para inibição da muda foi determinado por GARCIA et al (1986; 1987), que demonstraram que a azadiractina induz a uma drástica inibição da muda quando inoculada em um período que vai de antes da alimentação até o 3º dia após a alimentação, enquanto que o tratamento entre os dias 7 e 10 após a alimentação não exerce efeito sobre a ecdise. A inoculação do composto entre os dias 4 e 6 causa somente efeitos parciais de inibição da ecdise, resultados estes que demonstram que o período sensível à azadiractina é coincidente com o HCP, que é de 5 dias no 4º estágio de *R. prolixus* (WIGGLESWORTH, 1972). GARCIA et al (1986; 1987) realizaram também um paralelo entre o período sensível à azadiractina e o momento no qual a mitose epidermal inicia-se,

demonstrando que nos insetos tratados com azadiractina o índice mitótico epidermal é muito baixo e que estes animais não sintetizam uma nova cutícula.

Uma vez determinado que a azadiractina bloqueia a síntese da cutícula, a qual é dependente dos hormônios ecdisteróides, uma série de experimentos foram realizados para determinar se a azadiractina modifica a produção de ecdisteróides. Primeiramente foi demonstrado que o atraso e a inibição da ecdise nas larvas tratadas com azadiractina podem ser revertidos pela terapia com ecdisona (GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al., 1987; 1990). A seguir mensurou-se, por RIA, os níveis de ecdisteróides na hemolinfa das larvas controles e tratadas com azadiractina. O 4º estágio larvar de *R. prolixus* possui um baixo nível de ecdisteróides após a alimentação e que se mantém estabilizado até o dia 4. O nível dos ecdisteróides começa a aumentar no 5º dia, atingindo um patamar máximo durante o período intermuda, no 6º dia, começando a decair rapidamente para níveis mínimos durante a ecdise (GARCIA et al., 1986; 1987). A análise dos níveis de ecdisteróides nas larvas tratadas com azadiractina revelou que os níveis hormonais foram drasticamente reduzidos e permaneceram baixos durante todo o período experimental (GARCIA et al., 1986; 1987).

O efeito direto da azadiractina sobre as PGs foi estudado em experimentos *in vitro* usando o 4º estágio larvar de *R. prolixus*. Uma alta síntese espontânea de ecdisteróides pode ser observada em meio de incubação contendo PGs isoladas. Doses de azadiractina em torno de 1 ug/ml, capazes de causar 100% de inibição da muda, quando adicionadas ao meio de cultura, não interferem significativamente na taxa de síntese de ecdisteróides de PGs isoladas. A adição de doses farmacológicas do composto (acima de 5 ug/ml) no meio de cultura contendo PGs, entretanto, foi capaz de causar uma significativa inibição da síntese de ecdisteróides (GARCIA E.S., dados não publicados). Uma vez que azadiractina foi incapaz, em doses fisiológicas, de decrescer a produção de ecdisteróides *in vitro*, sua ação direta sobre as PGs, pode ser descartada, em favor de uma outra hipótese, a influência indireta da azadiractina sobre a muda, através de uma ação sobre as CNSc, deprimindo

a produção de PTH e conseqüentemente a produção de ecdisteróides pelas PGs.

GARCIA et al (1990), utilizando técnicas de transplante de cabeça descritas por KNOBLOCK & STEEL (1989), demonstraram que azadiractina, à 1 ug/ml de sangue, se ingerida pelo 5º estágio de *R. prolixus* afeta a produção de PTH como foi demonstrado pela redução ou ausência do estímulo aos níveis de ecdisteróides nos experimentos de decapitação e transplante de cabeça. As larvas hospedeiras, quando decapitadas 5 dias após a alimentação, demonstraram declínio do nível de ecdisteróides, enquanto as larvas não tratadas neste estágio mantinham seus níveis hormonais (GARCIA et al., 1990). Demonstrou-se também que transplantes de cabeça de doadores não tratados 4-5 dias após a alimentação para larvas decapitadas sustentavam a produção de ecdisteróides pelas PGs. Cabeças oriundas de doadores tratados com azadiractina foram inábeis manter um nível constante de ecdisteróides, o qual declinou imediatamente após o transplante, assim como o ocorrido em insetos decapitados não tratados. O transplante de cabeças originárias de doadores não tratados, 5 dias após a alimentação, estimulou a produção de ecdisteróides em receptores tratados com azadiractina (GARCIA et al., 1990). Estas descobertas sugerem fortemente que azadiractina interfere com a liberação do PTH pelo cérebro da larva de RHODNIUS, e conseqüentemente afeta a liberação de ecdisteróides a partir das PGs, causando êtase ecdisial (GARCIA et al., 1990). Esta hipótese é ainda suportada pelo fato de que após a aplicação de azadiractina em *L. migratória*, a liberação de proteínas neurosecretórias é completamente abolida e estas proteínas ficam acumuladas (SUBRAHMANYAM et al., 1989).

2.8.3. Efeitos na reprodução

A azadiractina é um efetivo esterelizante. Após a ingestão de material ativo, fêmeas de várias espécies de insetos, como por exemplo *Leptinotarsa decemlineata*, são esterelizadas em alto nível, muitas vezes

completamente (STEETS, 1976; SCHMUTTERER, 1987). Nesta espécie, o tempo de vida das fêmeas tratadas é prolongado, mas o consumo de alimento decai consideravelmente. A fertilidade dos ovos, como um todo, não é influenciada pela azadiractina (SCHMUTTERER, 1988).

Cada um dos 2 ovários telotróficos do *R. prolixus* possuiu 7 ovariolos contendo oócitos em vários estágios de desenvolvimento. Após a alimentação e acasalamento, inicia-se a deposição da gema e esta acumula-se nos oócitos terminais (T) aumentados. A ingestão de 1 ug de azadiractina/ml de sangue previne significativamente a deposição da gema durante os 7 primeiros dias após a alimentação e os oócitos T demonstram somente um pequeno aumento (GARCIA et al., 1987; FEDER et al., 1988).

Consequentemente, em fêmeas adultas de *R. prolixus*, uma simples dose de azadiractina A decresce consideravelmente a produção de ovos quando adicionada ao sangue nas concentrações de 1.0 e 5.0 ug/ml de sangue. A dose de 0.1 ug/ml aparentemente não possui efeitos sobre a oviposição (FEDER et al., 1988; GARCIA et al., 1990). Experimentos de longo prazo demonstram que os efeitos da azadiractina A após uma 1ª alimentação com 5.0 ug/ml de sangue, permanecem por 3 alimentações com sangue fresco livre do composto, ou seja por cerca de 120 dias após o tratamento. Os insetos que receberam azadiractina A em doses de 1.0 ug/ml de sangue, conseguem somente uma reversão parcial da deposição dos ovos após 4 meses do tratamento (GARCIA et al., 1990). Os OVOS colocados por fêmeas tratadas com a dose de 1.0 ug/ml não foram afetados em sua viabilidade; entretanto, ovos colocados por fêmeas que receberam o composto na dose de 5.0 ug/ml de sangue apresentaram somente 45% de eclodibilidade, indicando que a azadiractina A altera o desenvolvimento embrionário em altas concentrações (GARCIA et al., 1990).

Os efeitos esterelizantes da azadiractina foram descritos em várias ordens de insetos (REMBOLD & SIEBER, 1981; KOUL, 1990; REMBOLD, 1984), e podem ser explicados pela inibição dos hormônios que estão envolvidos na regulação ou da síntese de vitelogenina ou na maturação ovariana. Um destes hormônios pode ser o JH, secretado pelo C.A. É interessante notar que azadiractina suprime o JH em *L. migratória*

(REMBOLD, 1984). Desde que a vitelogenese em *R. prolixus* é dependente do JH, foi demonstrado que o JH aplicado exógenamente reverte os efeitos inibitórios da azadiractina na produção dos ovos (FEDER & GARCIA, dados não publicados). Logo, parece que o JH está envolvido na ação da azadiractina sobre a reprodução do *R. prolixus*, provavelmente agindo através do controle neuroendócrino do C.A. (DAVEY, 1980). Por outro lado, azadiractina também diminui os níveis de ecdisteróides nas fêmeas adultas de *L. migratória* (REMBOLD & SIEBER, 1981) e *R. prolixus* (FEDER et al., 1988). Os últimos autores ainda mostraram que a azadiractina também inibe a produção de ecdisteróides *in vitro* pelos ovários de *RHODNIUS*. Entretanto o papel dos ecdisteróides na vitelogenese permanece como uma questão em aberto nos insetos hemipteras. A explicação para os efeitos a longo prazo da azadiractina na reprodução do *R. prolixus* (GARCIA et al., 1990) é um problema a ser solucionado por futuras experiências.

2.8.4. Efeitos sobre a viabilidade dos insetos

A viabilidade dos insetos é frequentemente reduzida após a aplicação de dosagens de azadiractina insuficientes para alterar a muda (SCHMUTTERER, 1988). Os adultos resultantes de tal tratamento são, inábeis para copular, como os machos de *Oncopeltus fasciatus* (DORN, 1986; DORN et al., 1987) ou reconhecer o ferormônio masculino, como *Ceratitits capitata* (STEFFENS & SCHMUTTERER, 1982). Além disto, adultos dessa mosca e de *Phormia terrae-novae* diminuem sua habilidade para voar (BAYER, 1986; WILPS, 1987).

2.8.5. Farmacocinética e metabolismo

A observação de que a azadiractina possui efeitos a curto e longo prazo sobre o desenvolvimento e reprodução do *R. prolixus* sugere que a absorção, sequestro pelos tecidos e detoxicação deste composto deve ser

alcança o cérebro, é possível que uma pequena quantidade constante de azadiractina seja continuamente liberada na hemolinfa e que mantenha-se uma constante concentração ligada a cabeça, em especial nas CNSc. Se isto for verdade, é provável que as CNSc fiquem expostas a azadiractina por um extenso período de tempo impedindo a liberação do PTH, e consequentemente o estímulo a síntese de ecdisteróides pelas PGs e o processo de muda (GARCIA et al., 1989c).

2.8.6. Efeitos sobre o sistema imune

Os insetos possuem uma variedade de mecanismos que reconhecem e eliminam bactérias e parasitos (BOMAN & HULTMARK, 1981; RATCLIFFE et al., 1984), basicamente divididos em celulares (hemócitos envolvidos em fagocitose, formação de nódulos ou encapsulação) e humorais (polipitídeos antibacterianos), assim como o reconhecimento de não próprio (aglutininas e prófenoloxidase) e cooperação celular contra diversos tipos de patógenos (RATCLIFFE & ROWLEY, 1983; PENDLAND et al., 1988).

Investigações sobre a imunidade humoral em *R. prolixus*, revelaram que a inoculação de bactérias induz a atividades de lisozima e antibacteriana na hemolinfa livre de células (AZAMBUJA et al., 1985; 1986; 1989; AZAMBUJA & GARCIA, 1987). A inoculação de células de *Enterobacter cloacae* em *Rhodnius* tratados com azadiractina induz a estas atividades em níveis claramente menores que os alcançados por insetos não tratados (AZAMBUJA et al., 1991).

AZAMBUJA et al (1991) demonstraram que o 5º estágio de *R. prolixus* possui um número constante de hemócitos durante 2 semanas após a alimentação e que a inoculação de *E. cloacae* causa um imediato aumento deste número em THC por 7 dias, seguido por declínio após este período de tempo. A ingestão de azadiractina previne este aumento em THC (AZAMBUJA et al., 1991). Os autores observaram também que a infecção primária obtida pelo inóculo de *E. cloacae*, não é destruída pelos

processos de defesa nos insetos tratados com azadiractina, enquanto que nos insetos não tratados o nível de eliminação bacteriana na hemolinfa foi constante e a bactéria foi completamente eliminada da hemolinfa em 10 dias após a alimentação. A eliminação da bactéria foi coincidente com o número máximo de hemócitos da hemolinfa. Estes resultados sugerem que os hemócitos foram diminuídos após o tratamento com azadiractina e que a bactéria ainda estava presente nos insetos tratados com o composto (AZAMBUJA et al., 1991). Neste trabalho ficou demonstrado também que a azadiractina reduz grandemente a habilidade da infecção bacteriana em iniciar a formação de agregados de hemócitos na hemolinfa (AZAMBUJA et al., 1991).

Poucos aspectos do controle humoral e celular da imunidade de insetos são conhecidos e a interrelação entre os sistemas neuroendócrino e imune necessita de profundas investigações. JONES (1965), trabalhando com experimentos de ligadura em *R. prolixus*, demonstrou que os ecdisteróides podem regular o número de hemócitos, o volume da hemolinfa e induzir a diferenciação hemocítica. HOFFMANN (1970) observou que as PGs estimulam a produção e diferenciação de hemócitos em *Locusta*. Provavelmente azadiractina é capaz de influir sobre o sistema imune do *R. prolixus* através de suas ações no sistema neurosecretor deste inseto.

2.8.7. Utilização Médico-Veterinária

MILLER & CHAMBERLAIN (1989), demonstraram o efeito preventivo da azadiractina sobre o desenvolvimento de dípteros parasitas de interesse médico veterinário, visando a utilização do composto para minorar os prejuízos sanitários e econômicos causados por estas parasitoses.

2.8.8. Modo de ação

Os efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento e reprodução de várias espécies de insetos, são principalmente devidos a sua interferência com os ecddisteróides hemolinfáticos (REDFERN et al., 1981; SIEBER & REMBOLD, 1983; SCHLÜTER et al., 1985; GARCIA et al., 1986; DORN et al., 1986; GARCIA et al., 1991; REMBOLD et al., 1987) e os níveis de JH (REMBOLD, 1984; REMBOLD et al., 1983, 1987). Esta interferência ocorre como consequência da inibição que este composto exerce sobre a liberação de material neurosecretório (SUBRAHMANYAM & REMBOLD, 1989; SUBRAHMANYAM et al., 1989; REMBOLD, 1989) e do PTH (GARCIA et al., 1990).

2.9. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (Fig.6), é um protozoário parasita digenético que se apresenta sob a forma de tripomastigota no sangue do hospedeiro vertebrado e cujos corpos alongados e achatados se afinam em ambas as extremidades, especialmente na anterior, por onde sai o flagelo. Em sua evolução apresenta 2 hospedeiros, sendo um invertebrado e o outro vertebrado, assumindo as formas amastigota, tripomastigota sanguíneo, esferomastigota, epimastigota e tripomastigota metacíclico (PESSOA, 1977).

A doença de Chagas, tripanossomose do continente americano produzida por este parasito, determina no homem quadros clínicos com características e gravidade muito variáveis, destacando-se a cardiopatia chagásica com seu cotejo sintomático e elevada mortalidade (REY, 1973).

CARLOS CHAGAS encontrou pela primeira vez este flagelado no intestino de insetos triatomíneos do gênero *Panstrongylus megistus* em Lassance, Minas Gerais (Brasil), e os fez inocular em macacos, descrevendo assim o agente etiológico em todas as suas fases evolutivas. Além disso, Chagas diagnosticou e estudou clinicamente o primeiro caso humano da doença que leva seu nome (CHAGAS, C., 1911). Posteriormente, teve ainda a oportunidade de comprovar a existência de animais

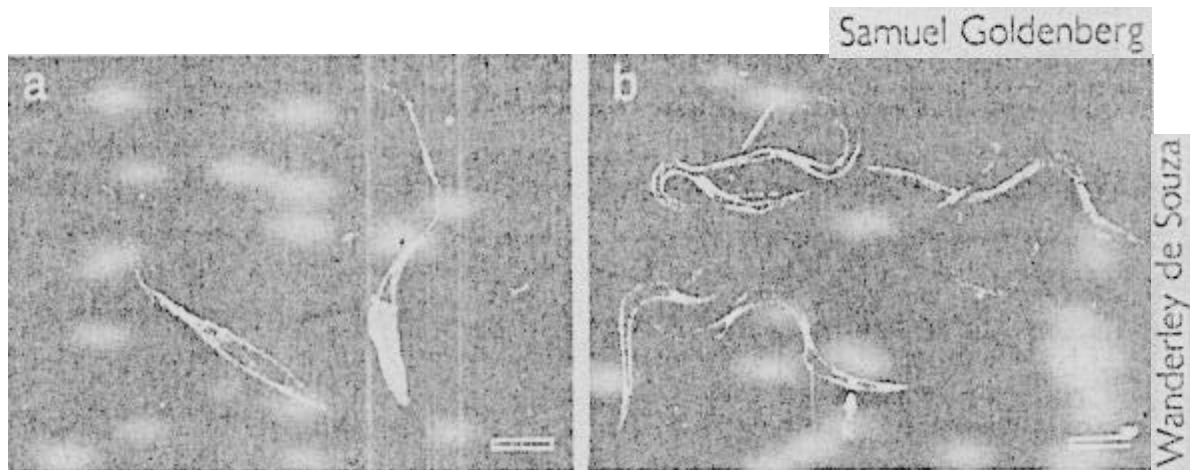


Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas (a) e tripomastigotas (b) de *T. cruzi* com o cinetoplasto localizado na região posterior do parasito.

vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasito, com o que se esclareceram os aspectos básicos do ciclo epidemiológico (REY, 1973).

A doença de Chagas constitui, pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução, um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e em várias repúblicas sul-americanas (PESSOA, 1977). CARLOS CHAGAS (1911) considerava a moléstia que tem seu nome "como uma das infecções tropicais mais maléficas, quer como causa imediata de grande letalidade, especialmente das crianças das zonas contaminadas, quer como determinante de uma condição mórbida crônica que inutiliza o indivíduo pra a atividade vital, quer como um fator importante de degeneração humana".

2.9.1. Taxonomia

O *T. cruzi* (CHAGAS, 1909) está hoje caracterizado de forma exata na super classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Tripanossomatidae, gênero Trypanosoma, sub-gênero Schizotrypanum, secção Stercorária, com a seguinte definição: Tripomastigotas relativamente pequenos (12 a 20 micra) e tipicamente em forma de C; cinetoplasto volumoso, perto da extremidade posterior do corpo, que é curta e pontiaguda. A multiplicação intracelular é tipicamente no estágio de amastigotas no hospedeiro mamífero e extracelular no inseto (HOARE & WALLACE, 1966).

2.9.1. Ciclo evolutivo do *T. cruzi*

O *T. cruzi* assume diferentes tipos morfológicos e funcionais durante o seu ciclo de vida. Este protozoário parasita alterna-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados e em formas replicativas (epimastigotas no inseto e amastigotas no hospedeiro mamífero) e

infectivas (tripomastigotas metacíclicos do inseto e da corrente circulatória do vertebrado).

2.9.3. Ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado

O ciclo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado representa a integração de fenômenos biológicos resultantes da fase de circulação do parasita no sangue (tripomastigotas sanguíneos), o seu ciclo intracelular (amastigotas), a resposta imune do hospedeiro, as peculiaridades da população infectante e uma multiplicidade de fatores ambientais que podem influenciar o curso da infecção (BRENER, 1979).

O *T. cruzi* é o único tripanosoma que não se multiplica diretamente no sangue circulante do hospedeiro definitivo, e sim, no interior das células do seu organismo. Este aspecto fundamental da biologia do parasito provoca as mais íntimas relações hospedeiro/parasita, as quais ao longo de um tempo de infecção que pode ser muito prolongado, geram reações complexas que até o momento são entendidas de modo incompleto (BRENER, 1979). CHAGAS (1909) sugeriu que as formas intracelulares parasitárias seriam de multiplicação e latência. A existência de parasitos no interior do citoplasma das células do hospedeiro, outras que não os macrófagos, dificulta ou impede a efetividade das defesas antiparasitárias e constitui-se uma limitação ao tratamento quimioterápico. Ao se multiplicarem no interior das células, os parasitos provocam sua destruição, liberando produtos irritantes ou que podem funcionar como antígenos provocando variadas e complexas reações no hospedeiro (BRENER, 1979).

Um grande número de mamíferos de várias ordens pode ser infectado pelo *T. cruzi* (PESSOA, 1977), incluindo o homem, animais domésticos, reservatórios silvestres e animais de laboratório. Anfíbios e aves são refratários a infecção por este protozoário. A resistência natural das aves à infecção e a capacidade do soro destes animais de lisar formas sanguíneas do parasito são fenômenos dependentes da ativação do

complemento por via alternada e independem da ação de anticorpos (KIERSZENBAUN et al., 1976).

No vertebrado a diferenciação ocorre intracelularmente. O processo envolve a transformação dos tripomastigotas metacíclicos, que infectam o mamífero por via contaminativa através das excretas (fezes e urina) que o redúvidéo expele próximo ao local da picada durante o repasto sanguíneo, em amastigotas e, após a proliferação do parasito sob esta forma, a transformação para tripomastigotas sanguíneos (WILLIAMS, 1985), que rompem a célula hospedeira e se locomovem através da corrente circulatória para posteriormente invadir células dos mais variados tecidos, onde irão continuar sua multiplicação de novo sob a forma amastigota (BRENNER, 1979).

Os tripomastigotas metacíclicos encontrados nas excretas dos triatomíneos, penetram em grande número nas células do ponto de inoculação (pele ou mucosas) onde multiplicam-se ativamente sob a forma amastigota. DIAS (1934) comprovou que as células parasitadas são as do tecido conjuntivo (leucócitos polimorfonucleares e macrófagos). O ciclo intracelular dura cerca de 5 dias, após o que as formas amastigotas já são encontradas no interior das fibras musculares. As células amastigotas desse foco primário modificam-se em tripomastigotas que invadem a corrente circulatória para nela permanecer por alguns dias. Uma grande parte delas é destruída no sangue; aquelas que escapam a destruição realizam novas localizações em diferentes órgãos (músculos, baço, fígado, gânglios, coração, etc) e, no interior das células retículo-endoteliais, transformando-se em amastigotas e constituindo focos secundários e generalizados. Destes focos secundários as formas amastigotas, após multiplicação e novas invasões, evoluem para a forma flagelada, e voltam ao sangue periférico para recomeçar o ciclo (PESSOA, 1977).

2.9.4. ciclo evolutivo no hospedeiro invertebrado

Mais do que 110 espécies de insetos hematófagos da família Reduviidae e sub-família Triatominae atuam como vetores da doença de Chagas. Na América Latina, o *T. cruzi* é transmitido por estes hematófagos que colonizam casas pobres emergindo à noite de fendas na parede e alimentando-se dos moradores adormecidos (BRENNER, 1973; GARCIA & AZAMBUJA, 1991). O mecanismo normal de infecção do inseto vetor é a picada no homem e animais. Desta forma tem sido observada a infecção dos triatomíneos que se alimentam em indivíduos no período agudo da infecção, bem como daqueles que se apresentam em fase crônica. Nos primeiros a infecção do inseto é mais fácil em virtude do maior número de parasitos circulantes no sangue. Os tripanossomas sofrem ao longo do tubo digestivo do inseto transformações que tem como resultado o aparecimento de formas infectantes no intestino posterior (PESSOA, 1977).

Desde os trabalhos originais de CHAGAS (1909), reconhece-se a existência de um autêntico ciclo do *T. cruzi* no vetor, incluindo a morfogênese dos estágios intermediários e a formação de tripomastigotas metacíclicos infectantes.

DIAS (1934) descreveu detalhadamente o ciclo, assinalando uma correlação quase esquemática entre os vários estágios evolutivos do parasito e os segmentos anatômicos do tubo digestivo do inseto e dividiu os fenômenos de evolução em 3 fases: estomacal, intestinal ou duodenal e retal. Assim no estômago os tripomastigotas sanguíneos se transformam em formas arredondadas, com ou sem flagelo livre, e epimastigotas, com o princípio da migração do blefaroplasto para a parte anterior do organismo, enquanto alguns degeneram e muitos permanecem inalterados; no intestino médio realiza-se a multiplicação do parasita sob a forma de epimastigotas de dimensões muito variadas, geralmente grandes. Esta é a fase do ciclo aparentemente responsável pela manutenção da infecção do vetor; no reto ocorre a diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. As formas parasitárias aderentes as paredes do intestino posterior apresentam-se sob o aspecto de nectomonas (epimastigotas livres no conteúdo retal), haptomonas (epimastigotas aderentes) e tripomastigotas metacíclicos (PESSOA, 1977). Todos os

tripanosomas estudados ligam-as a alguma superfície orgânica no inseto vetor, a qual irão parasitar. O processo se inicia através do flagelo que frequentemente expande sua membrana, aumentando a área de contato com o substrato celular (MOLYNEUX et al., 1987). Normalmente a ligação dos flagelados as superfícies cuticulares do intestino do inseto formam placas semelhantes a hemidesmosomas (MOLYNEUX et al., 1987). A ligação do *T. cruzi* as superfícies do epitélio das glândulas retais é também feita através de hemidesmosomas. Tanto as formas epimastigotas quanto as tripomastigotas *metacíclicas* ligam-se através do flagelo ao epitélio das glândulas retais escavando sua superfície. A metaciclogênese tem lugar, *in situ*, após a torção e alongamento do corpo da forma epimastigota (ZELEDON et al., 1984; BOKER & SCHAUB, 1984). Os mecanismos de ligação dos tripanosomatídeos são marcadamente similares *in vivo* e *in vitro* e também os mecanismos da transformação dos epimastigotas de *T. cruzi* para tripomastigotas metacíclicos podem ser refletidos *in vitro* (MOLYNEUX et al., 1987). Os epimastigotas em transformação aderem-se as superfícies antes de sua transformação em tripomastigotas metacíclicos (BONALDO et al., 1988; GOLDENBERG, 1990). Entretanto a importância da ligação do parasita na diferenciação é questionada, uma vez que, em algumas cepas, epimastigotas de *T. cruzi* aderidos *in vitro* não necessariamente irão realizar a metaciclogênese. Adicionalmente, estudos metabólicos com marcadores demonstram que polipeptídeos específicos são expressos somente durante a ligação dos parasitas (BONALDO et al., 1988). Entretanto não existem evidências de que estes polipeptídeos expressos durante o período de ligação estejam envolvidos neste processo quando naturalmente ocorrendo no veter (GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

Os tripomastigotas metacíclicos se acumulam no reto e são eliminados nas fezes junto com os epimastigotas não transformados (PESSOA, 1977). A infecção não é hereditária nos triatomíneos e os flagelados podem evoluir nos túbulos de Malpighi e na cavidade geral. As glândulas salivares não se mostram parasitadas (DIAS, 1934).

SCHAUB & LÖSCH (1988) comparando populações do *T. cruzi* antes e após a alimentação dos insetos vetores (*T. infestans*) demonstraram a eliminação de metacíclicos através da urina do triatomíneo e também que

as populações do protozoário presentes nesta excreção originam-se da parede retal, a qual atravessam numa percentagem de 50%, instalando-se em seguida nos túbulos de Malpighi. SCHAUB (1988) observou a transmissão direta do *T. cruzi* entre triatomíneos por canibalismo em *Dipetalogaster maximus* e coprofagia em *T. infestans* e assinalou a importância destes achados na epidemiologia da doença de Chagas.

BRACK (1968), relatou a existência de uma forma evolutiva peculiar, o esferomastigota, organismo arredondado com o flagelo circundando o corpo. Segundo BRACK ocorrem no vetor 2 ciclos paralelos: em um os esferomastigotas se transformam diretamente em tripomastigotas metacíclicos e no outro os esferomastigotas se transformam em epimastigotas curtos, capazes de se multiplicar e diferenciar novamente em esferomastigotas, e epimastigotas longos, com grande mobilidade mas incapazes de se diferenciar. BRACK acredita que a suposição corrente de que os tripomastigotas metacíclico derivam-se dos epimastigotas é devida ao fato de que estas últimas formas, graças a sua grande mobilidade, alcançam o reto antes do aparecimento das formas infectantes.

MSHELBWALA & ORMEROD (1973) e ALVARENGA (1977) confirmam a existência dos esferomastigotas e sua participação no ciclo do *T. cruzi*. ALVARENGA trabalhando com várias cepas de *T. cruzi* em *T. infestans*, concluiu que os tripomastigotas sanguíneos dão origem tanto a epimastigotas quanto a esferomastigotas, estando estas últimas formas evolutivas presentes desde o estômago até o reto. Os tripomastigotas metacíclicos seriam aparentemente formados a partir de epimastigotas ou esferomastigotas (ALVARENGA, 1977).

A transformação das formas sanguíneas ocorre com mais frequência quando existe pouco sangue no estômago, ou quando os parasitas se localizam diretamente no intestino médio, logo após o repasto sanguíneo (BRENNER, 1979).

BRENNER (1972) observou que logo após a ingestão de sangue, os tripomastigotas sanguíneos rapidamente se diferenciam em organismos

arredondados que apresentam tendência a se parrear ou formar massas de parasitos agregados, nos quais os limites celulares ficam indistintos, ocorrendo uma aparente desorganização das organelas que contém DNA. Estes achados podem representar um importante e negligenciado aspecto do ciclo evolutivo do *T. cruzi* (fusão de parasitos com troca de material genético) ou apenas um fundo de saco destinado a uma parte da população incompetente para evoluir no invertebrado (BRENNER, 1979).

2.9.5. Relação parasita/hospedeiro entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros invertebrados

Como assinala WILLIAMS (1985), os mecanismos de diferenciação do *T. cruzi* nos muitos e diferentes sítios em que se desenvolve nos seus hospedeiros reflete sua adaptação a variações ambientais cíclicas. Embora a investigação sobre os mecanismos de controle da diferenciação em *T. cruzi* esteja ainda nos estágios iniciais, algumas informações podem ser retiradas do fenômeno de diferenciação em outras células eucariotas, particularmente de membros da ordem Kinetoplastida. A diferenciação celular em Protozoa e eucariotos desenvolvidos resulta na produção de certas proteínas específicas provenientes de um certo número de proteínas codificadas no genoma. Este processo é o resultado de expressão gênica seletiva que pode ser controlada em vários níveis (destruição seletiva de DNA, controle da transcrição e pós-transcrição) (WILLIAMS, 1985).

CASTELLANI et al (1967) e FERNANDEZ & CASTELLANI (1968) demonstraram que em meios de cultura contendo *T. cruzi*, uma variável porcentagem de epimastigotas diferencia-se em tripomastigotas metacíclicos durante a fase estacionária, provavelmente em resposta a exaustão de nutrientes ou acumulação de produtos tóxicos.

Estudos com inibidores metabólicos mostram que a síntese proteica e a síntese do RNA são indispensáveis a diferenciação do *T. cruzi* (FERNANDEZ & CASTELLANI., 1968).

Vários fatores relacionados a população parasitária ingerida, peculiaridades biológicas do vetor, microambiente do tubo digestivo e condições ambientais influenciam o ciclo do *T. cruzi* no invertebrado e são muitas vezes decisivos na implantação do parasitismo (BRENNER, 1979).

ZELEDÓN (1976) assinalou a insuscetibilidade de certos triatomíneos ao *T. cruzi*, acentuando que essa refratariedade deve ser encarada sobre o "conceito nutricional" diferente da "resistência" que implica a existência de mecanismos imunológicos de defesa, ou seja, a inativação do parasita seria devida a ausência de fatores essenciais ou estímulos fisiológicos adequados, ou mesmo a presença de substâncias inibitórias no trato digestivo do triatomíneo. Muitos destes fatores estariam ainda mal definidos.

O crescimento e a metaciclogênese de diferentes cepas e clones de *T. cruzi* no inseto vetor, depende entre outras coisas da natureza do parasito. Exemplificando, a infecção de *D. maximus* com 2 diferentes clones de *T. cruzi* produz diferentes níveis de desenvolvimento pois as diferentes populações possuem diferentes momentos de crescimento dos parasitos. Por outro lado somente um dos clones sofre a transformação epimastigota-tripomastigota (GARCIA & DVORAK, 1982). Resultados similares foram observados em clones de *T. cruzi* infectando *R. prolixus* (GARCIA et al., 1984). A cepa do parasito, ou melhor, a constituição da população de *T. cruzi*, pode influir sobre o ciclo da infecção. PEREIRA da SILVA (1959) sugeriu que apenas as formas largas seriam competentes para evoluir no invertebrado, ao passo que as formas delgadas sofreriam degeneração após sua ingestão. A suscetibilidade a infecção pelo *T. cruzi* pode também depender da espécie do triatomíneo. DIAS (1940) demonstrou que usando uma mesma cepa do parasita, a infecção experimental de 90,4% em *P. megistus* e 54,7% em *R. prolixus*. Foi também sugerido que a origem geográfica do parasito e do vetor constituiria importante fator no ciclo, e que cepas locais do parasito seriam mais adaptadas a espécies normalmente transmissoras da região que as espécies exóticas (DIAS, 1940).

DIAS (1940) demonstrou que uma cepa venezuelana do *T. cruzi* era mais infectante para o *R. prolixus* da Venezuela do que para as espécies *T. infestans* e *P. megistus* oriundas do Brasil. RYCKMAN (1965) mostrou que os triatomíneos da América do Norte infectados com cepas norte-americanas apresentavam infecções mais intensas que as observadas com cepas sul-americanas do parasito. ZELEDÓN (1974), na Costa Rica, reportou casos humanos da doença de Chagas, nas quais o xenodiagnóstico resultou positivo apenas com a espécie local *T. dimidiata*, e não com espécies não autóctones como o *R. prolixus* e o *T. infestans*.

Por outro lado exemplares de triatomíneos normalmente suscetíveis ao *T. cruzi* podem apresentar refratariedade a infecção pelo parasito. PHILLIPS & BERTRAM (1967) observaram que de um grupo de triatomíneos que não se infectaram após um primeiro repasto sanguíneo em animais experimentalmente inoculados, apenas 13% contraíram a infecção após um segundo repasto, e que alguns insetos não se infectaram mesmo após ingerirem sangue parasitado por 3 a 5 vezes. Os mesmos autores demonstraram que a descendência de triatomíneos que não se infectaram experimentalmente foi significativamente menos suscetível ao *T. cruzi* que a População geral da colônia de insetos submetidos as mesmas condições, obtendo-se para as 2 populações índices de infecção de, respectivamente, 57% e 80,5%. Tais dados sugerem que a suscetibilidade ao parasitismo por *T. cruzi* possa representar uma característica genética. Além desses fatores aparentemente inerentes, outros elementos podem desempenhar papel importante no ciclo do *T. cruzi* no vetor (BRENNER, 1979).

Sugere-se que o número de parasitos ingerido pelo inseto vetor é crítico na determinação da natureza de infecção subjacente. O estabelecimento da infecção no intestino médio é possível em um inseto alimentado com sangue contendo somente poucos tripomastigotas de *T. cruzi*. Está demonstrado que tripomastigotas de *T. cruzi* de 2 diferentes cepas possuem uma dose mínima de infecção de 5 parasitas para infectar *D. maximus* e que o nível de infecção dos insetos, 30 dias após a alimentação, é proporcional a concentração de tripomastigotas presentes

no repasto sanguíneo (GARCIA & DVORAK, 1982). Também está demonstrado, por inoculação de diferentes números de tripomastigotas sanguíneos diretamente no estômago de *T. infestans*, que um mínimo de 3 parasitas é hábil para infectar no mínimo 12% dos insetos em 20 dias de infecção, enquanto 10 parasitas infectam 63% dos insetos em 15 dias (ALVARENGA & LEITE, 1982).

PHILLIPS & BERTRAM (1967) observaram que a suscetibilidade do *R. prolixus* à infecção pelo parasita diminui com o aumento da idade e tamanho das ninfas estudadas. Embora ninfas de 5° estágio ingerissem quantidades de sangue significativamente maiores em média (279,0 ng) do que ninfas de 1° estágio (5,8 ng) com conseqüente aumento do número de parasitos ingeridos, os insetos de 5° estágio mostram-se menos suscetíveis. Como a digestão sanguínea nas ninfas de 5° estágio se processa em ritmo cerca de 20 vezes mais rápida que os estádios mais jovens, os autores sugerem que esta rápida transformação do material ingerido possa ser prejudicial ao desenvolvimento do parasito. Uma explicação alternativa seria dada pela ocorrência de profundas modificações fisiológicas quando da transformação dos estádios ninfais em insetos adultos (PHILLIPS & BERTRAM, 1967). A este respeito dados recentes vieram lançar algumas luzes que esclareceram certos mecanismos que ocorrem no tubo digestivo do inseto e que possuem influência sobre o desenvolvimento do parasito (GARCIA & AZAMBUJA, 1991). GARCIA & GILLIAM (1980) trabalhando com *R. prolixus* e utilizando pepstatina, um inibidor da principal proteínase do tubo digestivo deste inseto, demonstraram que a inibição total da atividade caseolítica intestinal do triatomíneo não causa diferenças significativas no número de flagelados presentes neste microambiente e concluíram que não existe correlação entre a digestão proteica e o nível ou tipo de infecção intestinal.

GARCIA et al (1989a) comparando a atividade lítica e proteolítica no tubo digestivo de insetos tratados ou não com azadiractina, revelaram não haver diferenças estatisticamente significantes entre os 2 grupos, tanto no que diz respeito a ação hemolítica como também sobre a atividade proteolítica das enzimas catepsina B e D, concluindo assim que o desenvolvimento do *T. cruzi* ocorre independentemente destes fenômenos.

Esta insensitividade as proteases digestivas do intestino do vetor é comum a outras tripanossomoses, por exemplo: *T. rangelli* em *R. prolixus* (HECKER et al., 1990). Entretanto, em termos de importância para o desenvolvimento e diferenciação do parasito, alguns papéis do repasto sanguíneo e das proteases induzidas no tubo intestinal podem ser descartados em favor de algumas outras secreções liberadas no trato digestivo. Recentemente um fator hemolítico no intestino de *R. prolixus* foi descrito (AZAMBUJA et al., 1985). Este fator causa lise da membrana eritrocítica com consequente liberação da hemoglobina para ação das proteases no intestino médio. Este fator lítico foi purificado e vários tripanossomatídeos a ele expostos, *in vitro*. *Leptomonas Sp*, *crithidia Sp*, *Herpetomonas Sp* e várias cepas de *T. cruzi* foram lisadas em diferentes cinéticas de lise. O clone Dm-28c do *T. cruzi* demonstrou ser 2 ou 3 vezes mais resistente que a cepa Y ao agente lítico (AZAMBUJA et al., 1989a; AZAMBUJA et al., 1989b). Desde que a atividade lítica possui uma ação diferencial sobre os parasitos, isto deve fornecer uma vantagem seletiva para o desenvolvimento no vetor de certas cepas do *T. cruzi* sobre outras. Esta hipótese é confirmada pelo fato de que a cepa Y possui um nível muito menor de desenvolvimento (GARCIA et al., 1984), e que o clone Dm-28c, mais resistente ao agente lítico, desenvolve-se muito bem no trato digestivo de *Rhodnius* (GARCIA et al., 1989). Efeitos similares foram observados em *Glossina palpalis* afetando tripanosomas africanos (STILES et al., 1990).

O trato digestivo dos triatomíneos é considerado como um ambiente hostil ao *T. cruzi*, capaz de alterar a infecção no vetor, o que explicaria a indução para as transformações morfo-fisiológicas do protozoário como um mecanismo adaptativo a este ambiente desfavorável. É provável que o desenvolvimento do *T. cruzi* deva ser dependente e possivelmente controlado por aspectos indefinidos da química e bioquímica ambiental no intestino do inseto vetor (GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

Um dos fatores que pode influenciar a interação entre o *T. cruzi* e seu vetor foi demonstrado por PEREIRA et al (1981) que observaram a

presença de lectinas com diferentes atividades existentes no estômago, intestino médio e hemolinfa de *R. prolixus* e também de receptores de lectina detectáveis em epimastigotas, mas não em tripomastigotas de *T. cruzi*. A presença de distintas atividades de lectina no intestino de *R. prolixus* e sua seletiva reação com o *T. cruzi* deve representar um papel regulatório nas interações entre o parasito e o vetor durante os vários estágios do ciclo de vida. As lectinas devem afetar o desenvolvimento durante os vários estágios do ciclo de vida dos tripanosomas no intestino do inseto vetor. O estabelecimento de infecções intestinais por trypanosoma é prevenido pela secreção de lectinas em *Glossina morsitans* (WELBURN et al., 1989). Também está demonstrado que a maturação dos trypanosomas é estimulada pela lectina hemolinfática e intestinal de Tsetse. Entretanto, se as lectinas podem influenciar a multiplicação e diferenciação do *T. cruzi* no inseto vetor como sugerido por PEREIRA et al (1981) é ainda uma hipótese puramente teórica.

Até o momento poucos estudos avaliaram os possíveis efeitos da infecção por *T. cruzi* sobre o triatomíneo vetor. D'ALESSANDRE & MANDELL (1969) e ANEZ & EAST (1984) demonstraram que a infecção por *T. cruzi* ou *T. rangelli* em *R. prolixus* causa uma redução de frequência de alimentação. JUAREZ (1970) observou que *T. infestans* infectados com *T. cruzi* podem ingerir mais sangue antes da muda que indivíduos não infectados e sugeriu que esta seria uma forma de compensar o sequestro de nutrientes feito pelos tripanossomatídeos. BITKOWSKA et al (1982) detectaram alterações na composição de aminoácidos livres na hemolinfa de *T. phyllosomia* e na resposta imune de *R. prolixus* infectados com *T. cruzi*. SCHAUB (1988) conclui que em contraste com *T. rangelli* e *B. triatominae*, *T. cruzi* não exerce efeitos no desenvolvimento e mortalidade de barbeiros criados em condições ótimas. Entretanto nas populações naturais fatores estressantes como jejum, alimentação limitada e superpopulação aumentam os níveis de mortalidade de *T. infestans* infectados com *T. cruzi* em comparação com os exemplares não tratados (SCHAUB, 1988).

A ausência de simbioses é uma outra causa de desenvolvimento retardado, mas as influências manifestam-se nos últimos estádios e não

nos primeiros (BRENER, 1979). Vários simbioses como a *Nocardia* e outras bactérias Gram positivas já foram assinaladas no conteúdo intestinal de triatomíneos (CERISOLA et al., 1971; GEIGY et al., 1953). Substâncias sintetizadas pelos simbioses, por exemplo vitaminas do complexo B, creatinina, RNA e ácido adenilico, são em algumas circunstâncias essenciais para o desenvolvimento dos insetos e ocorrência de ecdises normais. A possibilidade de liberação de substâncias que exercem algum efeito local sobre o conteúdo intestinal dos triatomíneos levou MÜHLPHORDT (1959) a investigar a reprodução e diferenciação do *T. cruzi* em *R. prolixus* apresentando *Nocardia rhodnii* e exemplares livres da bactéria. Aparentemente, a reprodução do *T. cruzi* foi mais abundante nos exemplares sem simbioses, mas a diferenciação epimastigota-tripomastigota foi idêntica nos 2 grupos de insetos. Um estudo com várias espécies de triatomíneos mostrou que enquanto *R. prolixus* necessita da *Nocardia* para o seu desenvolvimento, exemplares do gênero *Triatoma* se desenvolvem normalmente sem simbioses. Dessa forma, uma vez que é conhecida a influência decisiva da *Nocardia* sobre o desenvolvimento de alguns triatomíneos não é ilógico postular que este actinomiceto possa interferir no desenvolvimento do *T. cruzi* em seu inseto vetor. A significância, se existe, deste microorganismo sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* necessita ainda de maiores informações para seu esclarecimento. Essas observações fornecem os modelos adequados para o estudo da influência do fenômeno do mutualismo simbiote/vetor sobre a evolução do parasita (BRENNER, 1979).

A influência da temperatura sobre o período que vai desde o repasto infectante à eliminação de flagelados pelo vetor foi sistematicamente estudada por PHILLIPS (1960). Em *R. prolixus* a eliminação de parasitas se iniciou em 7 dias à 20°C, 3 dias à 25°C e 2 dias à 30 ou 35°C, permitindo concluir que havia uma relação entre o desenvolvimento do parasita e a temperatura. Aceitando esta relação, ZELEDÓN (1976) sugere que períodos curtos, como 2 dias, entre o repasto sanguíneo e o aparecimento de flagelados nas fezes possa se dever mais a um peristaltismo acelerado dos insetos com a eliminação dos tripomastigotas ingeridos do que propriamente um ciclo realizado em tão curto prazo. NEVES (1971) mostrou que em temperaturas extremas de 5-15°C

ou 36-37°C o ciclo praticamente não se completa, sendo as temperaturas de 23 à 27°C as que melhor favorecem o ciclo evolutivo do *T. cruzi* no vetor. As observações de DIAS (1934) segundo a qual o jejum prolongado dos insetos infectados torna os flagelados imóveis, somam-se as de PHILLIPS & BERTRAM (1967) demonstrando que apenas a metade das ninfas de triatomíneos mantidas em jejum por 7 semanas conservam-se infectadas, tendo as demais se tornado negativas. Entretanto, LUZ & BORBA (1969) observaram que exemplares de *T. infestans* infectados, continuam eliminando flagelados pelas fezes por cerca de 812 dias após a infecção, apesar de períodos prolongados de jejum. Já STEKELEY et al (1971) assinalaram um decréscimo do nível de infecção em triatomíneos aos 90 dias, quando comparado ao exame realizado aos 30 dias. BRENNER (1979) observa que embora o problema da perda da infecção tenha importantes inferências de ordem epidemiológica e no diagnóstico da doença de Chagas, este aspecto da evolução do *T. cruzi* continua controverso. Também o ritmo de eliminação e a quantidade de tripomastigotas metacíclicos nas fezes de triatomíneos infectados tem sido pouco investigado.

Estudando a relação entre as formas de *T. cruzi* nas fezes de exemplares de *R. prolixus* e a infecção produzida em camundongos, MSHELBAWALA & ORMEROD (1973) observaram que não ocorre relação estrita entre número de formas móveis nos inóculos e a posterior parasitemia, período pré-patente ou mortalidade; no entanto constataram relação entre este número e a mortalidade acumulativa, assim como o ID50 (dose que infecta 50% dos animais). Estes 2 últimos parâmetros atingem um máximo após 6 semanas de infecção. O rápido aumento da infectividade entre a 2ª e a 4ª semana de infecção está correlacionado com a elevação da percentagem de tripomastigotas metacíclicos formados neste período. Tais dados mostram que é possível estabelecer uma metodologia que permita um tratamento estatístico adequado para o estudo da infectividade dos tripomastigotas que evoluem no vetor, apesar das dificuldades de uma abordagem quantitativa em um sistema complexo como o constituído pela relação *T. cruzi*/hospedeiro invertebrado (BRENNER, 1979).

Estudando o mecanismo de eliminação dos estágios infectantes por triatomíneos, ZELEDÓN et al (1977) e mais recentemente SCHAUB (1988) confirmaram e ampliaram antigas observações de DIAS (1934), comprovando que a maioria dos tripomastigotas metacíclicos eliminados após o repasto sanguíneo está contida na urina, e não nas fezes. Aparentemente a rápida absorção da fase líquida do sangue ingerido produz um aumento da eliminação de urina pelos túbulos de Malpighi, que arrasta para o exterior as formas infectantes aderidas a parede do reto. Foi também investigada a possibilidade de que a urina possa produzir um aumento da diferenciação local de epimastigotas para tripomastigotas, mas com resultados inconclusivos (ZELEDON et al, 1987). A fisiologia e outras características biológicas das formas de *T. cruzi* eliminadas pelas fezes dos vetores são também pouco conhecidas. ZELEDÓN (1974) demonstrou que os tripomastigotas metacíclicos, ao contrário das formas sanguíneas e de cultura podem penetrar através da pele íntegra de camundongos, sugerindo a sua adaptação aos mecanismos de infecção na natureza. De acordo com MSHELBWALA & ORMEROD (1973) os amastigotas eliminados pelas fezes dos triatomíneos infectados por *T. cruzi* podem contribuir para a infectividade do material eliminado, fato que embora não apresente importância epidemiológica, tem que ser levado em conta nos estudos de infectividade realizados em condições do laboratório (BRENNER, 1979).

Considerando que o habitat do parasita no vetor **está** constituído, ao menos por algum tempo, pelo sangue ingerido em digestão e elementos locais como a flora bacteriana intestinal, é fácil compreender que se especule sobre a importância da fonte alimentar na evolução do *T. cruzi*.

Infectando exemplares de *R. prolixus* em camundongos inoculados com *T. cruzi* e alimentados em seguida em galinhas camundongos, coelhos e lacertídeos, URDANETA-MORALES (1973) conclui que os índices de infecção não foram afetados pela natureza do sangue ingerido, não havendo evidências de fatores líticos ou tóxicos que pudessem interferir na evolução do parasita. SHERLOCK & ALMEIDA (1973) fazendo sugar várias espécies do triatomíneos em animais infectados (camundongo, cão e tatu) concluíram que a fonte de repasto sanguíneo influencia os índices de infecção. Entretanto, segundo ZELEDÓN (1976), estes dados não são conclusivos já que várias cepas estavam envolvidas nas observações.

ALVARENGA & BRENNER (1977) demonstraram a infecção por *T. cruzi* em exemplares de *T. infestans* e *D. maximus* após ingerirem suspensão de tripomastigotas coletados de animais e suspensos em salina absolutamente sem sangue. Este fato aparentemente indica que ao contrário da crença generalizada, o *T. cruzi* não necessita de sangue para evoluir no vetor e que fatores necessários a sua reprodução e diferenciação podem ser obtidos em substâncias excretadas ou secretadas no tubo digestivo do inseto. No entanto sabe-se já a muito tempo que existem no sangue fatores indispensáveis para a sobrevivência do parasito (PESSOA, 1977). Entre eles a hematina é particularmente necessária, não se conhecendo espécie alguma que não necessite desse elemento de fonte exógena; o ácido ascórbico, fornecido pelos eritrócitos, também é indispensável para o metabolismo normal dos tripanosomatídeos (PESSOA, 1977).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estabelecimento da colônia de *R. prolixus*

Neste trabalho foram utilizados insetos selecionados no 5^o estágio ninfal, da colônia de *R. prolixus*, mantidos e criados no Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Estes foram, até o momento de sua seleção, alimentados com sangue humano citratado em comedouro artificial segundo método descrito por GARCIA et al (1975).

Durante toda a fase experimental, estes insetos permaneceram no insetário à uma temperatura média de 28°C à 60-70% de umidade relativa.

3.2. Procedimento alimentar

Grupos de triatomíneos foram alimentados com sangue citratado de camundongos infectados com *T. cruzi*, através de uma membrana de borracha (GARCIA et al., 1984). Uma amostra de azadiractina contendo 90% do composto, gentilmente cedida pelo Dr H. Rembold do Instituto Max Planck (Alemanha), foi diluída em etanol-salina 1:4 e adicionada ao sangue na concentração de 1.0 ug/ml imediatamente antes da alimentação. Somente insetos plenamente alimentados foram usados nos experimentos; os insetos parcialmente alimentados foram descartados.

3.3. Infecção com *T. cruzi*

Foi utilizado o clone Dm-28c, rotineiramente mantido no Laboratório de Expressão Gênica do DBBM segundo método descrito por CONTRERAS et al (1988) e AYMERICH & GOLDENBERG (1989).

Para uma melhor reprodução das condições naturais da infecção por *T. cruzi*, repetimos em laboratório o ciclo biológico do protozoário através de passagens alternadas do parasito em insetos e camundongos albinos. Inicialmente o clone Dm-28c obtido do meio de cultura (L.I.T) foi inoculado intraperitonealmente em camundongos albinos. Em 20-30 dias após o inóculo, momento do pico de crescimento sanguíneo do protozoário neste hospedeiro, imobilizamos os camundongos envolvendo-os em tela de nylon e os colocamos em contato direto com o triatomíneo. Cerca de 15 dias após esta alimentação direta sobre o hospedeiro, retiramos todo o tubo digestivo dos insetos, homogeneizamos cuidadosamente em 5 ml de tampão fosfato-salina e inoculamos esta amostra intraperitonealmente em camundongos albinos sadios. Através da repetição rotineira deste procedimento tornou-se possível obter populações de *T. cruzi* altamente adaptadas a ambos os hospedeiros e capazes de atingir um alto nível de infecção.

3.4. Infecção intestinal e quantificação de parasitos

Em diferentes intervalos de tempo após a exposição dos triatomíneos ao sangue infectado com *T. cruzi*, todo o trato intestinal (estômago, intestino e reto) foi removido e cuidadosamente homogenizado em 1.0 ml de tampão fosfato-salina (PBS; PH 7.2). O número total de parasitas foi estabelecido utilizando-se o hemocítômetro de Neubauer.

3.5. Coleta de parasitos da urina e fezes

Para coletar tripanossomas da urina pura ou de uma mistura de fezes e urina, cada inseto foi colocado após a alimentação em um aparato experimental previamente descrito por GARCIA et al (1989). Basicamente o

inseto foi colocado em coletor de excretas que consiste em tubo plástico Eppendorf de 1.5 ml, previamente perfurado em sua base, inserido em outro tubo e colocado a 28°C. As excretas, com ou sem parasitos, foram coletadas do 2° tubo Eppendorf após incubação por toda a noite à temperatura mencionada. O número total de parasitos foi estabelecido utilizando-se o hemocitômetro de Neubauer.

3.6. Estimativa da atividade hemolítica intestinal em *R. prolixus*.

Para a quantificação da atividade hemolítica, utilizamos o procedimento descrito por AZAMBUJA (1985) no qual o grau de hemólise foi determinado pela medida da quantidade de hemoglobina liberada dos eritrócitos no meio de incubação, tendo sido expresso em percentagem de hemólise. Basicamente, a cada tubo foi adicionado 0.1 ml de uma suspensão de eritrócitos e 0.1 a 0.4 ml do material bruto ou purificado, ou ainda das diferentes amostras testadas. Após a mistura, os tubos foram incubados a 37°C por 2 a 4 horas e, posteriormente, centrifugados a 3.000 g por 10 minutos. A percentagem de hemólise foi determinada pela dosagem de hemoglobina no sobrenadante e comparada com a hemólise total (0.1 ml de eritrócitos adicionados em 0.4 ml de tampão e 0.1 ml desta solução foi adicionado em 1.5 ml do reagente de cianometahemoglobina), padronizado para 0.5 de absorvância a 546 nm. Uma unidade de hemólise foi definida como a quantidade do material testado necessária para liberar hemoglobina de 50% dos eritrócitos em 4 horas de incubação a 37°C. A concentração de hemoglobina nas preparações foi medida pelo método da cianometahemoglobina (KAMPEN & ZIJLSTRA, 1961).

3.7. Estimativa da atividade proteolítica intestinal em *R. prolixus*.

A mensuração da atividade proteolítica do trato digestivo do *R. prolixus* foi realizada através do procedimento descrito por HOUSEMAN et al (1978; 1982) para catepsina B, baseado na hidrólise de Bana, e catepsina D, baseado na hidrólise de hemoglobina.

Para avaliar a atividade enzimática da catepsina B, retiramos o pós-mesentérico de 5° estádios do *R. prolixus* e os homogeneizamos em

solução de NaCl 15 M. após uma centrifugação a 9.000 g por 10 minutos o sobrenadante foi retirado, congelado e submetido a um tampão de incubação (DTT 1.5 mM, EDTA 3mM, fosfato de potássio 0.1 M) com pH 5.5 a 4°C. Em seguida esta solução sofreu uma pré-incubação por 5 minutos a 30°C, seguida por uma adição de 25 ul de Bana dissolvido em dimetil sulfoxido e agitação e 30°C por 10 minutos. Para paralisar a reação foi adicionado 1.0 ml de reagente corante e após uma espera de 10 minutos realizada a leitura em uma absorvância de 520 nm.

No Caso da catepsina D, os posmesenteros retirados aos insetos foram homogeneizados em solução de NaCl 0.15 M, centrifugados a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante congelado foi incubado em tampão Glicina-Hcl 0.2 M em pH 2.8 à 30°C por 5 minutos. Em seguida adicionamos hemoglobina (20 mg/ml) e incubamos esta solução por 4 horas a 30°C. O material resultante recebeu a adição de 0.6 ml de TCA e sofreu centrifugação a 15.000 g por 10 minutos. A leitura realizou-se a uma absorvância de 280 nm de material solúvel em TCA.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da ingestão concomitante de azadiractina A e infecção com *T. cruzi* através do repasto sanguíneo

Dois importantes pontos devem ser enfatizados ao se comparar os resultados obtidos nos grupos controle e experimental. Primeiramente, enquanto as larvas controle mudaram para adultos em cerca de 25 dias após a alimentação, houve uma sobrevivência normal, sem muda, nas larvas experimentais que esta em conformidade com descobertas anteriores (GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al, 1984, 1986, 1987; REMBOLD & GARCIA, 1986; FEDER et al, 1988) e demonstra o efeito inibitório da azadiractina sobre o controle endócrino do desenvolvimento do inseto (Figura 7). Em segundo lugar, ocorre um claro e relativamente rápido efeito sobre o desenvolvimento e sobrevivência do parasita. O número de parasitas por inseto aumenta no grupo controle em cerca de uma ordem de magnitude em três semanas após a infecção. Entretanto nas larvas tratadas com azadiractina este valor decresce até que em 30 dias após a alimentação existe um nível mínimo de infecção, o mesmo se observando em 50 dias, o que representa aproximadamente 1/3 do tempo de vida total do inseto.

4.2. Efeito do pré-tratamento com azadiractina A na sobrevivência do *T. cruzi* em *R. prolixus*

Este experimento demonstra que o prétratamento do hospedeiro artrópode com azadiractina também interfere na sua infecção pelo parasita. Vinte dias após a aplicação do camposto, ambos em grupos receberam uma nova alimentação com sangue, desta vez infectado. Três semanas depois (40 dias após a primeira alimentação) todos os insetos do grupo controle já tinham mudado para adultos e os valores de parasitemia alcançavam um valor maior que o dobro da infecção original. No grupo experimental nenhum dos insetos realizou muda, permanecendo no quinto estágio e os valores de parasitemia apresentavam-se bem próximos aos limites mínimos de detecção. Acrescentamos que a droga mantinha seus efeitos ainda com 60 dias após a infecção (Figura 8).

4.3. Efeito da azadiractina A sobre a vitalidade do *T. cruzi* em *R. prolixus*.

Este experimento demonstra que a azadiractina pode curar o artrópode após a infecção por *T. cruzi* ter se estabelecido completamente. Quarenta dias após a primeira alimentação (20 dias após a administração de azadiractina) o grupo experimental apresentou-se praticamente livre da infecção pelo parasita. Por outro lado fica também evidenciado que a supressão do processo de muda para adulto, por si só não explica completamente os efeitos da azadiractina, uma vez que os adultos previamente infectados demonstram-se sensíveis aos seus efeitos deletérios sobre a infecção (Figura 9).

4.4. Efeito de diferentes doses de azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* em *R. prolixus* .

Pode-se ver que a azadiractina em baixas concentrações não possui efeitos no desenvolvimento do clone Dm28c do *T. cruzi*, se compararmos este grupo com o grupo controle (Figura 10). A dose de 0.1 ug/ml de sangue possui somente efeitos inibitórios parciais sobre a infecção. Entretanto a dose de 1.0 ug/ml de sangue causa um efeito drástico sobre o desenvolvimento dos tripanosomas, inibindo a infecção até os limites mínimos de detecção. Através destes resultados podemos estimar que a dose efetiva de azadiractina capaz de inibir 50% da infecção (ED50) é de 0.25 ug/ml de sangue.

4.5. Efeito, a longo prazo, da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* em *R. prolixus*.

Este experimento demonstra claramente a persistência dos efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento do protozoário em seu inseto vetor após a aplicação de uma única dose do composto. Enquanto os insetos do grupo controle mudaram para adultos em cerca de 25 dias após a primeira alimentação, no grupo experimental, observaram-se somente algumas poucas mudas imaginais após a terceira alimentação sem a droga. Paralelamente, os insetos do grupo controle mantiveram um alto nível constante de infecção durante todo o período experimental, enquanto nos insetos tratados com a azadiractina o número de parasitas detectáveis manteve-se próximo a zero (Figura 11).

4.6. Efeito da azadiractina sobre as atividades hemolítica e proteolítica do trato digestivo do *R. prolixus*

A atividade lítica do estômago aumentou durante os dois primeiros dias após o repasto sanguíneo, permanecendo constante até o oitavo dia,

quando então caiu novamente a níveis semelhantes aos do dia zero (figura 12). Não existe uma diferença estatística significativa na atividade hemolítica dos grupos controle e experimental, durante 10 dias após a alimentação.

Um comportamento similar foi observado para as características das enzimas proteolíticas no intestino de insetos dos grupos controle e experimental (figura 13). A atividade proteolítica aumentou a partir de um nível baixo no dia zero, mantendo-se então em um valor constante após 2 (catepsina B) e 4 (catepsina D) dias após a alimentação, sem um subsequente decréscimo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimental.

Estes resultados demonstram que os efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* no trato intestinal do *R. prolixus*, não são devidos a alguma interferência do composto sobre as principais enzimas digestivas até agora conhecidas no tubo digestivo deste vetor.

4.7. Efeito da azadiractina sobre a eliminação do *T. cruzi* pelas excretas do *R. prolixus*.

Neste experimento demonstramos que a presença do *T. cruzi* na urina e fezes do *R. prolixus* pode ser detectada em alto nível, cerca de 50 dias após a infecção no grupo controle (A). A eliminação dos parasitas foi mais ou menos constante durante este período, exceto pelo dia 20. Entretanto, praticamente não se encontraram parasitas no grupo tratado com azadiractina (B) durante todo o período experimental (Figura 14).

4.8. Avaliação "in vitro" do efeito da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi*.

Não foi observada diferença significativa na concentração de parasitas/ml entre as amostras experimentais e controle, o que demonstra que, mesmo em altas concentrações a azadiractina não exerce ação tóxica sobre as formas replicativas do *T. cruzi*, quando em meio de cultura (Tabela 1).

Os dados deste experimento indicam, que assim como no meio de replicação, a azadiractina não exerce efeitos tóxicos sobre o *T. cruzi* quando no meio de metaciclogênese. Os parasitas não foram afetados em sua sobrevivência, desenvolvimento e transformação para formas infectivas (Tabela 2).

As formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, não foram significativamente afetadas pela presença de azadiractina A, mesmo em altas concentrações durante horas após o início da incubação. O decréscimo da quantidade de parasitas no sangue dos camundongos infectados, após a sua coleta, ocorreu em níveis semelhantes tanto nos grupos controle quanto nos tratados (Tabela 3).

Estes três últimos experimentos demonstram que as formas replicativas e infectivas do *T. cruzi* mantidas em meio de cultura ou incubadas são insensíveis a exposição, mesmo em altas doses, de azadiractina, o que evidencia claramente que o composto não é tóxico para este protozoário e que seu efeito sobre o desenvolvimento deste parasita em seu vetor deve-se provavelmente a mudanças na fisiologia e controle hormonal do artrópode.

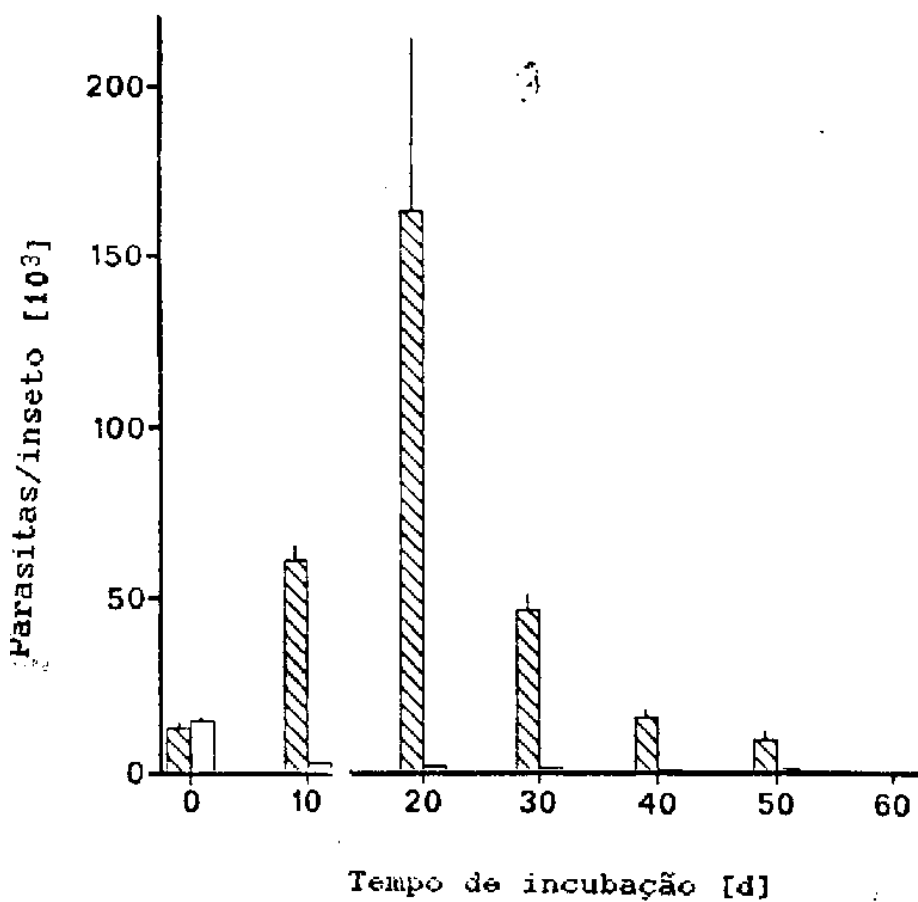


Figura 7- Histograma mostrando número de parasitas intestinais presentes no homogenato intestinal total de *R. prolixus*. Seis a oito larvas de 5° estágio de *R. prolixus* foram utilizadas em cada dia testado. Para os grupos controle (▨), o sangue continha uma quantidade definida (6×10^4 /ml) de tripomastigotas. O grupo experimental (□) foi concomitantemente alimentado com a mesma quantidade de *T. cruzi* a uma concentração da droga de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de sangue.

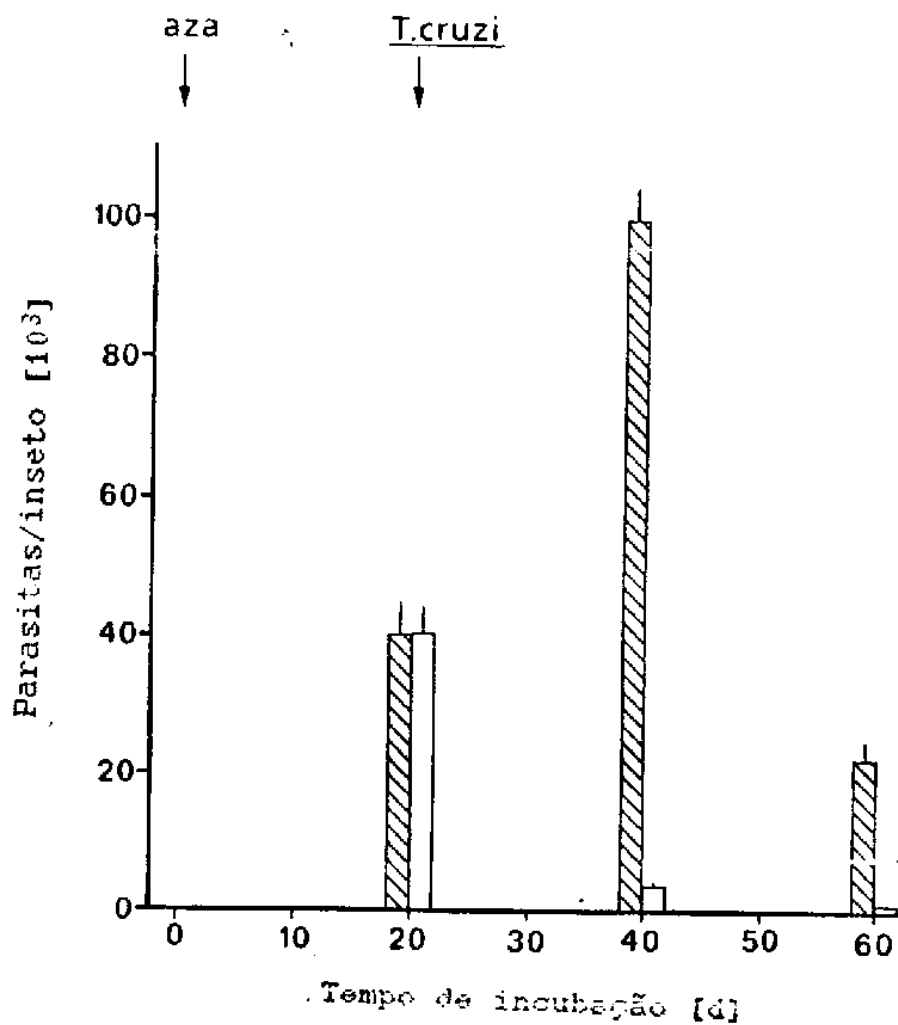


Figura 8- Histograma mostrando o número de parasitas presentes no homogenato intestinal total de *R. prolixus*. No dia zero os grupos controle (▨) e experimental (□) receberam sangue sem parasitas; o grupo experimental recebeu o alimento adicionado com uma dose de 1.0 µg de azadiractina/ml de sangue. A infecção com o *T. cruzi* (8×10^4 parasitas/ml de sangue) realizou-se na alimentação seguinte, 20 dias depois.

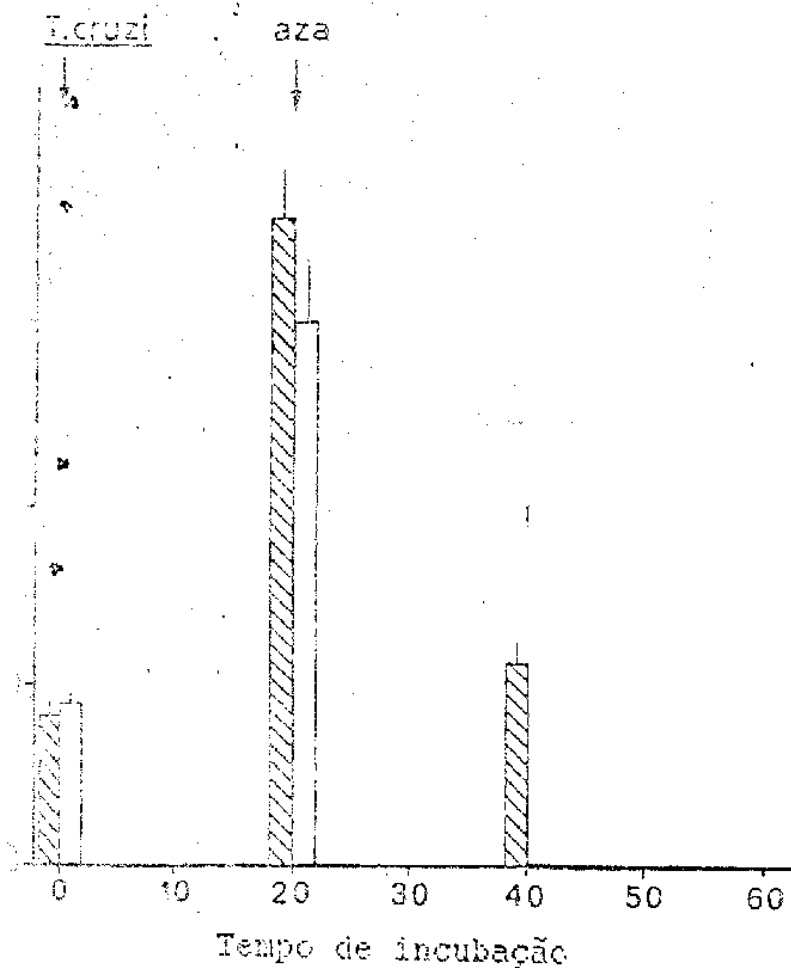


Figura 9- Histograma mostrando o número de parasitas presentes no homogenato intestinal total de *R. prolixus*. Neste caso ambos os grupos foram infectados com o protozoário no dia zero (6×10^4 parasitas/ml de sangue). Vinte dias depois receberam uma nova alimentação sem parasitas, com o grupo experimental (□) recebendo também azadiractina (1.0 µg/ml de sangue). Ambos os grupos apresentavam o mesmo nível de infecção e realizaram a muda para adultos.

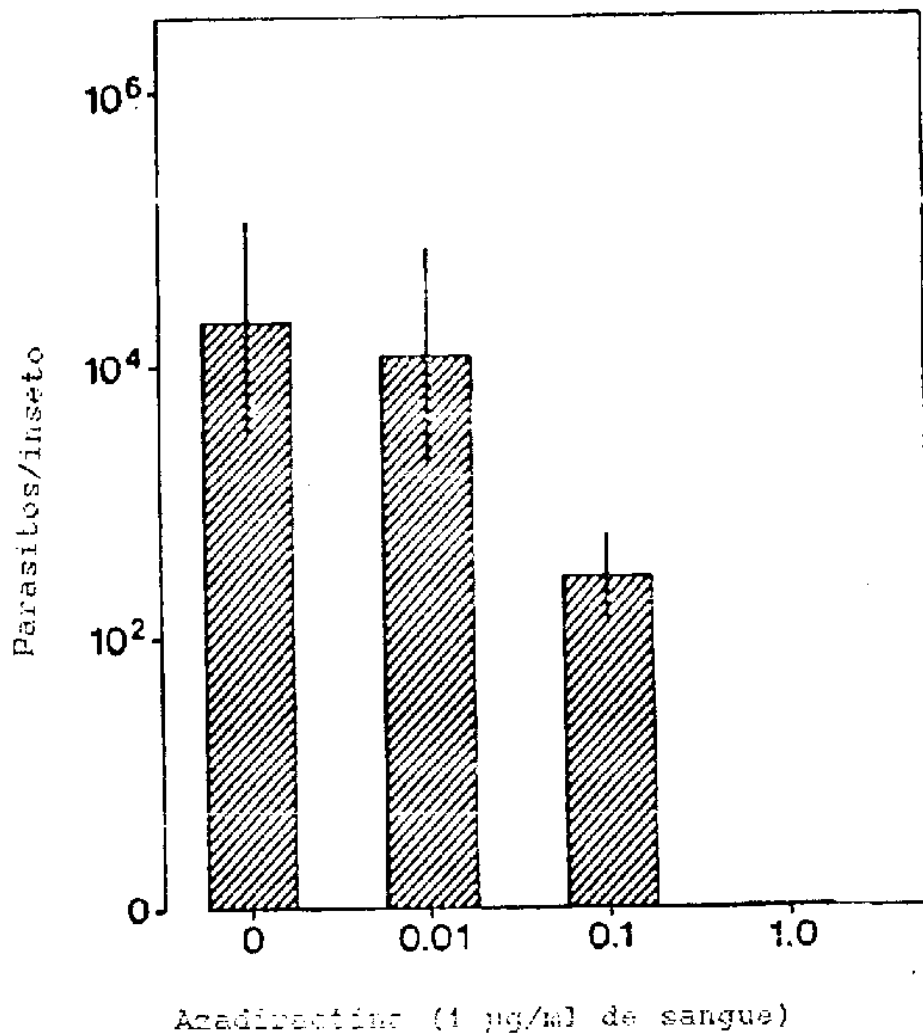


Figura 10- Histograma mostrando os efeitos da azadiractina, nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1.0 µg/ml de sangue, na infecção de larvas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentadas em sangue contendo 20×10^4 tripomastigotas/ml de sangue, 30 dias após a alimentação. Cada valor representa a média da concentração de parasitas em 6-8 indivíduos infectados ($\times 10^4$ parasitas/ml de sangue).

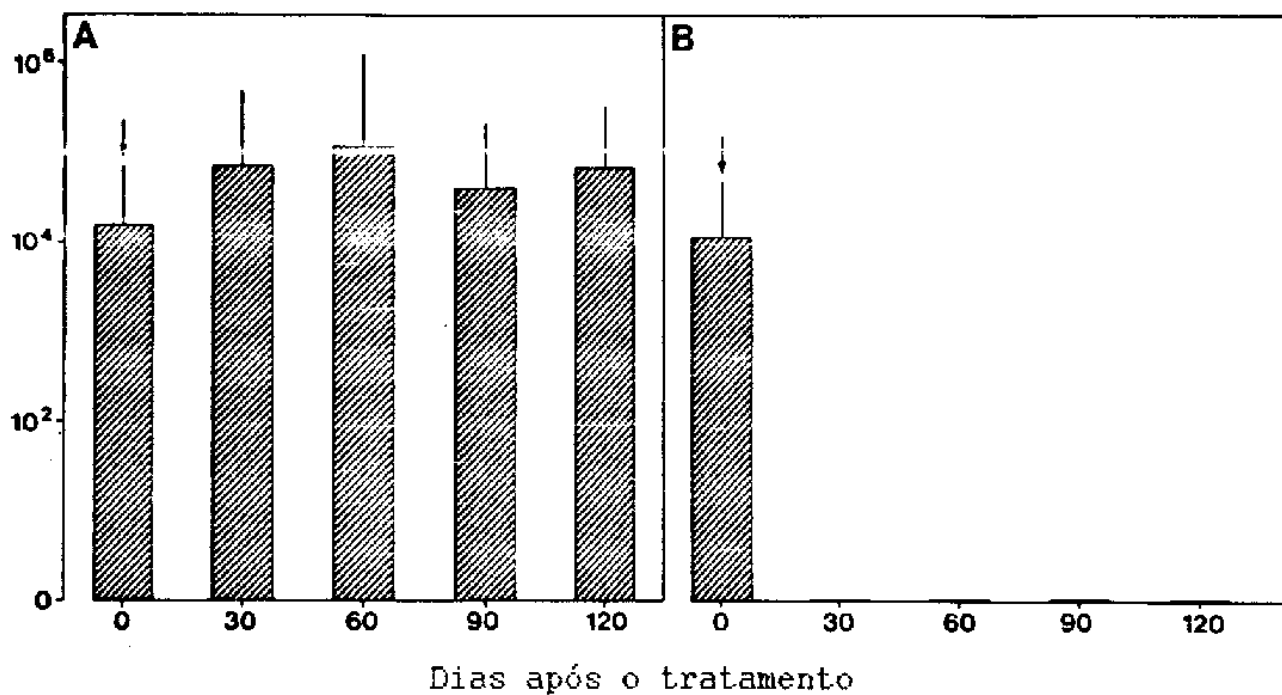


Figura 11- Histograma mostrando os efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento, a longo prazo, do *T. cruzi* no tubo digestivo de *R. prolixus*. Larvas de 5º estágio de *R. prolixus* foram infectadas com 30×10^4 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* através do repasto sanguíneo contendo ou não $1.0 \mu\text{g/ml}$ de azadiractina. Ambos os grupos, controle (A) e experimental (B), foram realimentados 30, 60 e 90 dias depois com sangue infectado ($20\text{-}30 \times 10^4$ parasitas/ml) sem a adição do composto. Após cada alimentação, de 8 a 10 insetos de cada grupo foram dissecados para a quantificação dos parasitas.

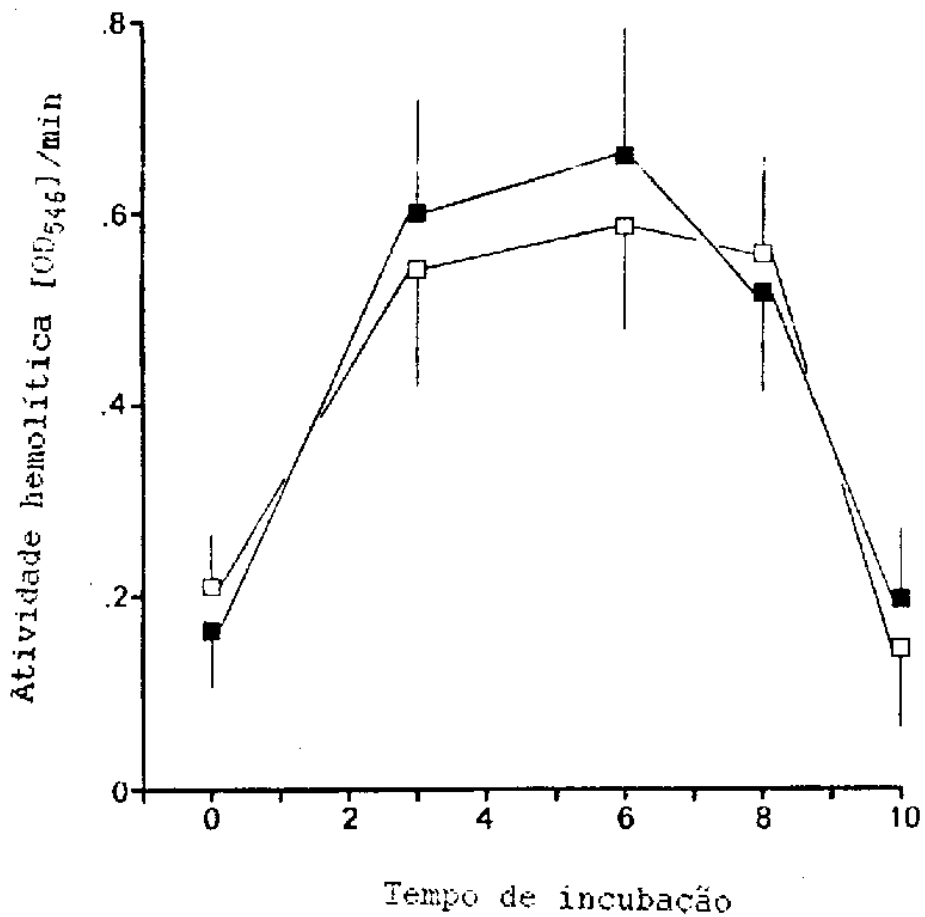


Figura 12- Efeito da azadiractina A (1 $\mu\text{g/ml}$) sobre a atividade hemolítica do trato digestivo de fêmeas adultas de *R. prolixus*. Cada ponto nas duas curvas representa a média de quatro animais (\pm S.D.). Os grupos controle (\square) e experimental (\blacksquare) foram alimentados 8 dias após a muda imaginal.

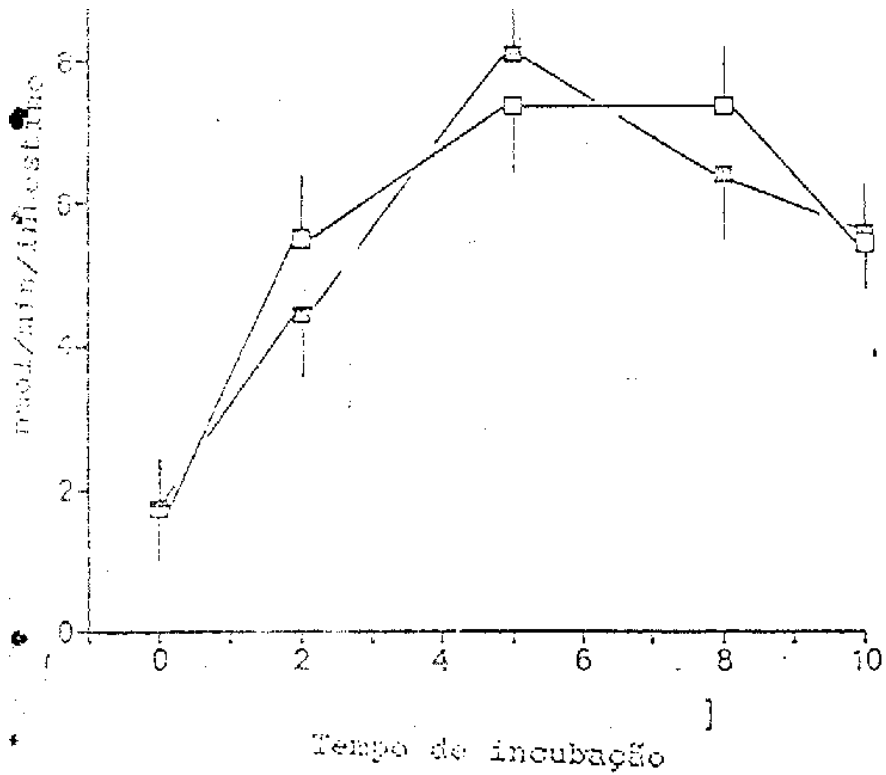
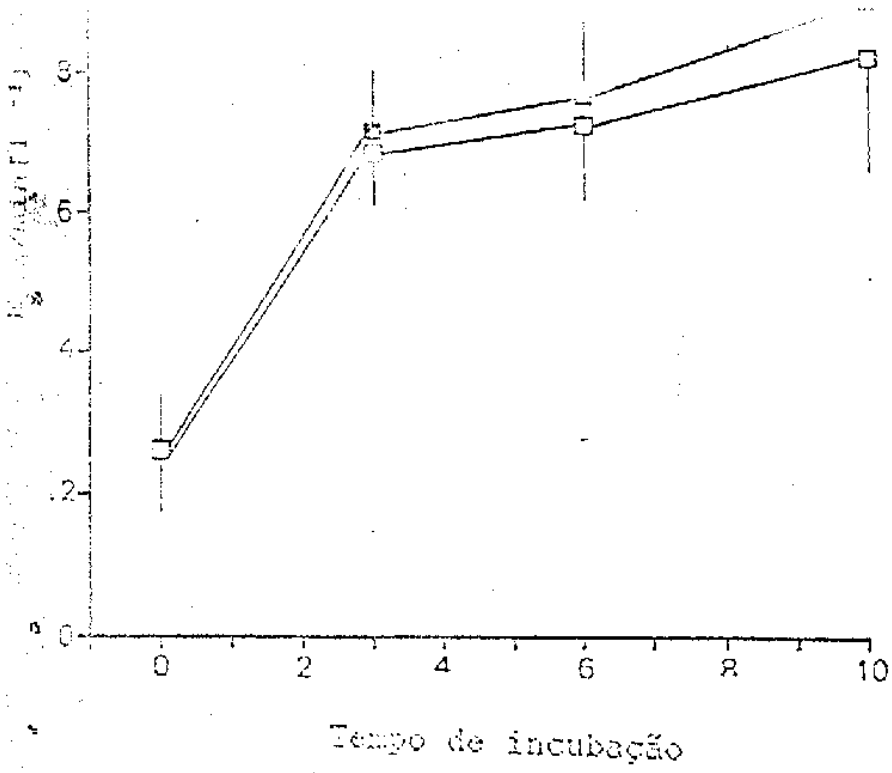


Figura 13- Efeito da azadiractina (1 µg/ml) sobre a atividade proteolítica do trato digestivo de fêmeas adultas de *R. prolixus*. Cada ponto nas duas curvas representa a média, para catepsina B (A) e catepsina D de quatro animais (\pm S.D.). O intestino médio dos grupos controle (□) e experimental (○) representados na 12 foram usados para este experimento.

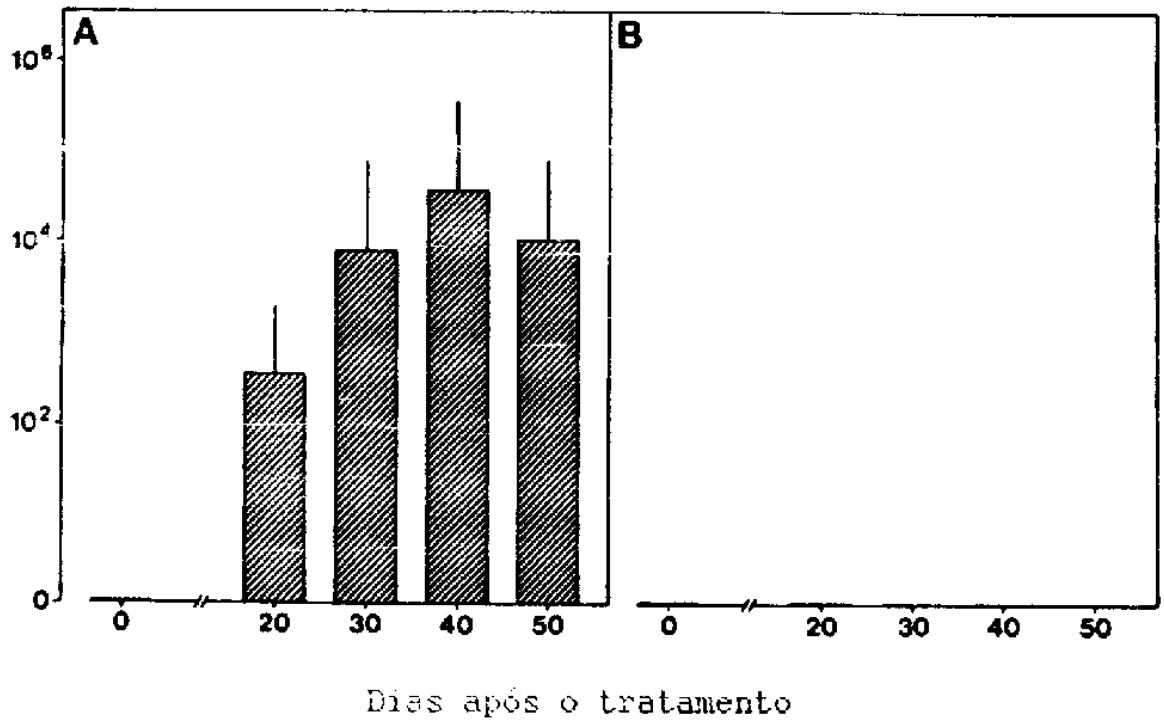


Figura 14- Histograma mostrando o nível de eliminação dos parasitas através da urina e fezes do 5º estágio larvar de *R. prolixus*. Os insetos foram alimentados com sangue infectado (20×10^4 tripomastigotas/ml de sangue) contendo (B) ou não azadiractina (A) a $1.0 \mu\text{g/ml}$ de sangue. Oito a dez insetos de cada grupo foram realimentados com sangue infectado nos dias 20, 30, 40 e 50 após a primeira alimentação, e a seguir colocados no coletor de excretas a 28°C (ver Material e Métodos). Vinte e quatro horas após a realimentação estas excretas foram retiradas do coletor e colocadas no hemocitômetro de Neubauer para que se procedesse a contagem dos parasitas ali presentes.

Campus	Horas após o inóculo				
	48	72	96	120	144
A1	0.5	1.1	2.8	3.5	5.5
A2	0.8	1.2	3.4	5.2	6.4
C1	0.9	1.5	3.5	5.1	9.1
C2	0.7	1.2	3.7	4.9	7.8

Tabela 3- Crescimento e desenvolvimento do *T. cruzi* em meio de cultura (LIT) contendo azadiractina A.

Quatro amostras de cultura do protozoário "in vitro" foram utilizadas, cada uma com 2 ml de meio (A1 e A2: experimentais; C1 e C2: controles). Os tubos experimentais receberam azadiractina na concentração de 10.0 µg/ml de meio. Cada valor representa a concentração de parasitas/ml (107). A concentração inicial de parasitas foi de 5×10^6 parasitas/ml.

Grupos	Horas após o inóculo		
	24	48	72
controle	111(28)=139	102(96)=198	36(193)=229
experimental	143(52)=195	112(101)=213	58(206)=264

I Epimastigotas (Tripomastigotas)

Tabela 2- Efeito da azadiractina sobre a metaciclogênese do *T. cruzi* "in vitro" (meio TAUGAAG).

Formas replicativas do *T. cruzi* (epimastigotas) retiradas do meio de cultura (LIT), foram introduzidas no meio para metaciclogênese e divididas em dois grupos: controle e experimental (azadiractina na concentração de 10.0 µg/ml de meio). O inóculo inicial de parasitas no meio de metaciclogênese foi da ordem de 2.90×10^5 parasitas/ml (1.7% de formas tripomastigotas). O índice de metaciclogênese foi medido em diferentes momentos após o inóculo. Cada valor representa a concentração de parasitas e a percentagem de formas replicativas/infectivas (epimastigotas/tripomastigotas) por ml de meio (média de 2-3 alíquotas).

Grupos	Horas após o início da incubação	
	2	4
controle	48.0	21.0
E1	42.0	19.0
E2	56.0	25.0

Tabela 3- Efeito da azadiractina sobre as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*.

Ao sangue coletado de camundongos albinos machos infectados com *T. cruzi* em alto grau de parasitemia (84×10^4 parasitas/ml de sangue) foram adicionadas duas diferentes doses de azadiractina (E1: $10.0 \mu\text{g/ml}$ e E2: $1.0 \mu\text{g/ml}$). A seguir este material foi incubado em banho maria\shaker e a quantidade de parasitas avaliada em diferentes momentos após o início da incubação. Cada valor representa a quantidade de parasitas/ml ($\times 10^4$) da média de duas amostras.

5. DISCUSSÃO

As tripanosomíases humanas transmitidas por insetos vetores, como a doença de Chagas, são disseminadas através de um sistema parasito/hospedeiro altamente especializado. O parasito em seu ciclo evolutivo e reprodutivo adaptou-se tão bem ao hospedeiro invertebrado quanto ao mamífero. O *T. cruzi* sofre duas diferenciações no intestino do vetor invertebrado. A primeira é a transformação dos tripomastigotas ingeridos com o repasto sanguíneo em epimastigotas, que são as formas multiplicativas do parasita, e a segunda é a diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectivas no hospedeiro invertebrado (GARCIA et al., 1984, 1986; ZELEDON, 1987; GARCIA & AZAMBUJA, 1991). Os tripanosomas aderem-se primariamente a parada retal, de onde são liberados através das fezes. Este comportamento reflete uma alta especificidade do parasita pelo seu hospedeiro invertebrado, e no interior deste hospedeiro pela parede retal ou mais especificamente pelas glândulas retais. Se a diferenciação ou o desenvolvimento do parasito, ou ambos, são bloqueados, a infecção não pode estabelecer-se no inseto vetor (GARCIA et al., 1991).

Um interessante campo de estudo refere-se a existência de algumas substâncias químicas com estrutura bem definida que interferem na relação do *T. cruzi* com seu inseto vetor. Em primeira instância achamos importante reportar os dados de literatura que evidenciam os efeitos do sistema hormonal sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* em seu hospedeiro invertebrado. Um dos mais importantes aspectos da ação hormonal é o mecanismo através do qual os hormônios produzem seus efeitos a nível

molecular. Através do processo de evolução, os hormônios assim como seus receptores localizados nos tecidos alvos podem sofrer alterações estruturais no curso do tempo e da coordenação destas mudanças em ambas as estruturas, a interação hormônio/receptor eleva o seu nível de resposta fisiológica. Um exemplo deste processo em insetos é o JH, que exerce um duplo papel fisiológico, atuando no processo de muda nos estágios juvenis e como fator gonadotrópico em fêmeas adultas; entretanto nos mais primitivos insetos contemporâneos (apterigotas) este hormônio somente regula a reprodução cíclica no inseto adulto, desde que estes insetos dificilmente realizam muda. Isto sugere que a função primitiva básica do JH era a ação gonadotrópica, a qual implicou o aparecimento de receptores para tipos de JH idênticos ou diferentes em diferentes tecidos. Algo de similar deve ocorrer com a ecdisona, hormônio indispensável ao processo de muda nos estádios ninfais e pupais e que possui também uma ação gonadotrópica em algumas espécies de dipteros, neste caso sendo produzida nos ovários da fêmea do inseto, além de exercer importante papel no desenvolvimento embrionário comprovado em algumas espécies (STOKA, 1987). Este hormônio é capaz ainda de exercer efeitos letais e supressivos sobre o ciclo sexual de protozoários parasitos do trato alimentar de alguns insetos, durante o período de muda (CLEVELAND & NUTTING, 1955). Similarmente, insetos tratados com análogos do JH são menos suscetíveis a infecção intestinal por *T. cruzi*, já tendo sido observado por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al (1975), trabalhando com ninfas de *P. megistus*, que insetos normais alimentados em pacientes chagásicos apresentam um índice de infecção 44.9%, enquanto aqueles tópicamente tratados com análogos do JH apresentam um índice de infecção de apenas 6.5%. Ao que parece o processo cíclico de produção e secreção dos principais hormônios dos insetos é capaz de efetuar alterações fisiológicas as quais o *T. cruzi* adaptou-se ao longo do seu processo evolutivo de adaptação ao seu hospedeiro invertebrado. Desta forma, modificações no equilíbrio endócrino do artrópode que alterem o seu delicado balanço hormonal seriam capazes de interferir direta ou indiretamente sobre o ciclo do protozoário neste vetor. Assim, substâncias químicas capazes de atuar sobre o sistema endócrino dos insetos revestem-se de especial importância como instrumentos de trabalho que possivelmente podem

elucidar aspectos ainda mal compreendidos sobre o crescimento desenvolvimento deste parasito em seu hospedeiro invertebrado.

Por meio dos experimentos que realizamos para o desenvolvimento desta tese, demonstramos que a azadiractina, fornecida por via oral misturada ao repasto sanguíneo, inibe o desenvolvimento do *T. cruzi* em seu vetor invertebrado, o *R. prolixus* (GARCIA et al., 1989). O momento da aplicação da droga ou do parasita ao inseto não é importante para a obtenção de uma drástica inibição da infecção. A ingestão concomitante de azadiractina e *T. cruzi* (figura 7), o prétratamento do inseto com azadiractina para uma posterior tentativa de infecção com o protozoário (figura 8) e a administração da azadiractina após o estabelecimento da infecção (figura 9) resultam igualmente em uma forte inibição ao desenvolvimento do parasita em seu hospedeiro invertebrado. Adicionalmente comprovamos que uma única dose do composto é capaz de exercer este efeito inibitório por no mínimo 120 dias, tempo total do experimento realizado, o que equivale a cerca de 2/3 do tempo de vida do inseto em sua fase adulta. Este efeito inibidor a longo prazo manifestou-se mesmo com 4 sucessivas tentativas de reinfecção durante os repastos sanguíneos fornecidos aos insetos neste período de tempo (figura 10).

Na sequência de nossos experimentos conseguimos demonstrar também que a azadiractina decresce significativamente a eliminação de parasitas pela urina e fezes do triatomíneo por no mínimo 50 dias após a infecção (figura 13). O fato dos parasitos não terem sido descobertos nestas excretas sugere que os insetos tratados com azadiractina não são bons vetores para a doença de Chagas.

Em vista destes resultados existem várias possibilidades que podem explicar os efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento do parasita. Inicialmente testamos a possibilidade do composto ser capaz de exercer efeitos sobre as principais atividades enzimáticas do tubo digestivo do *R. prolixus*, tais como a atividade hemolítica do estômago e as atividades proteolíticas das catepsinas B e D intestinais. A hemoglobina é a principal fonte nutritiva dos insetos hematófagos e a atividade

hemolítica do estômago é fundamental para a lise da membrana eritrocítica com a conseqüente exposição desta proteína sanguínea que então sofrerá a ação das duas enzimas proteolíticas dominantes no intestino e primariamente necessárias para a digestão da hemoglobina. Conseqüentemente, um efeito tóxico da azadiractina poderia se refletir em mudanças destes parâmetros enzimáticos que possivelmente interfeririam no desenvolvimento do protozoário por uma alteração das condições microambientais do intestino do inseto. Como demonstram as figuras 11 e 12 a azadiractina não exerce nenhum efeito sobre estas atividades enzimáticas do trato digestivo do *Rhodnius*. Assim concluímos de nossos resultados que o intestino não sofre intoxicação pela azadiractina e que esta hipótese não explica os efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi*.

Uma outra possibilidade seria a de um efeito tóxico direto do composto sobre o protozoário. Consideramos esta hipótese muito pouco provável em vista dos resultados que obtivemos pela exposição direta do parasita a droga através de sua edição em altas doses a meios de cultura comumente utilizados para a manutenção e replicação do *T. cruzi* (tabelas 1 e 2), pela incubação da azadiractina com sangue infectado com formas tripomastigotas (tabela 3) e pela inoculação intraperitoneal ou subcutânea, da azadiractina em camundongos albinos infectados com o protozoário (dados não publicados). Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram que as formas replicativa e multiplicativa do *T. cruzi* são insensíveis a exposição a azadiractina, mesmo em altas doses e por período de tempo prolongado.

Uma vez que a azadiractina comprovadamente não interfere com as principais atividades enzimáticas digestivas do trato intestinal do *R. prolixus* e não se demonstra tóxica para o *T. cruzi* através da inoculação em meios de cultura, da incubação com sangue infectado e da injeção "in vivo" em camundongos albinos contaminados, uma ação indireta através dos mecanismos de controle endócrino do triatomíneo parece ser a melhor hipótese para explicar o efeito inibidor da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* em seus hospedeiros artrópodes. Embora o modo de ação da azadiractina não esteja ainda esclarecido de um ponto de

vista molecular, sabe-se hoje com certeza que este composto possui um forte efeito inibidor sobre o controle neuroendócrino da liberação do PTH (GARCIA et al., 1990) e conseqüentemente interfere na produção de ecdisteróides e JH (GARCIA & REMBOLD, 1984; GARCIA et al., 1986). Uma vez que o sistema neuroendócrino dos insetos possui uma importante função reguladora sobre uma grande parte dos processos fisiológicos destes organismos e levando em conta que a presença, sempre em quantidades precisas, ou a ausência destes hormônios alternadamente em um período de tempo definido é de fundamental importância para a manutenção do equilíbrio destes sistemas fisiológicos compreende-se que um mecanismo tão delicado de controle orgânico provavelmente ao sofrer determinados tipos de interferência alteraria, de uma forma ainda não esclarecida, a relação altamente específica entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros invertebrados. Os trabalhos de CLEVELAND & NUTTING (1955), demonstrando a influência letal e inibidora da ecdisona sobre o ciclo sexual de protozoários parasitas do trato intestinal de várias espécies de insetos, e de PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al (1975) que revelaram o efeito inibidor da aplicação tópica em triatomíneos de análogos do JH sobre a capacidade infectiva do *T. cruzi*, fornecem importantes evidências de que a sistema de regulação neuroendócrino dos triatomíneos exerce influência fundamental sobre o ciclo do *T. cruzi* em seus hospedeiros artrópodes. Neste caso, as alterações causadas pela azadiractina sobre a regulação neuroendócrina dos triatomíneos interfeririam com o desenvolvimento do *T. cruzi* no trato intestinal destes insetos. Alternativamente, a azadiractina deve causar mudanças no trato digestivo dos triatomíneos que tornam este microambiente inaceitável para a sobrevivência do tripanosoma e estabelecimento da infecção no inseto vetor. A este respeito, NOGUEIRA et al (1991) observou alterações morfológicas induzidas pela azadiractina nas células intestinais de *R. prolixus*, entre as quais se destacam a redução do número das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio e da flora intestinal, assim como também uma desorganização da membrana pseudoperitrofica ou perimicrovilar. De qualquer forma, ambas as hipóteses, interferência indireta através de modificações no sistema de regulação neuroendócrino ou direta por alterações celulares intestinais, estão possivelmente relacionadas e assumem que a azadiractina provoca

mudanças no microambiente intestinal capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento do *T. cruzi* em seu inseto vetor.

6. CONCLUSÕES

Embora várias classes de substâncias químicas possam interferir com a muda de vários insetos, a azadiractina é o mais potente inibidor do desenvolvimento de insetos por associação com o mecanismo de controle endócrino (GARCIA et al., 1991). Através de procedimentos cirúrgicos clássicos de extirpação e transplante de cabeças, GARCIA et al (1990) demonstraram que os efeitos primários da azadiractina envolvem inibição da liberação do PTH durante o HCP do processo de muda dos estádios imaturos do *R. prolixus*. A potente atividade antimuda deste composto está associada com uma longa persistência de tecidos ligados a azadiractina nos órgãos endócrinos. Efeitos adicionais podem ser observados e aparentemente estão associados a efeitos secundários resultantes de modificações fisiológicas ou bioquímicas nos insetos tratados com azadiractina. Dentre estes efeitos destaca-se o fato de que a azadiractina abole a infecção por *T. cruzi* do trato intestinal de um de seus hospedeiros invertebrados, o *R. prolixus*. Um paralelo entre os efeitos no balanço hormonal do hospedeiro e a inibição ao desenvolvimento dos tripanosomas é sugerido pelos nossos resultados. Uma outra possível explicação postula que a inibição ao desenvolvimento dos tripanosomas no trato digestivo de seu hospedeiro invertebrado esteja associada com modificações no microambiente intestinal que previnam o estabelecimento e morfogênese do protozoário.

Em vista destas considerações, os resultados que obtivemos ao longo deste trabalho demonstram que:

- 1) A azadiractina, fornecida por via oral misturada ao repasto

sanguíneo, inibe o desenvolvimento do *T. cruzi* em seu vetor invertebrado, o *R. prolixus* (GARCIA et al., 1989). O momento da aplicação da droga ou do parasita ao inseto não é importante para a obtenção de uma drástica inibição da infecção. A ingestão concomitante de azadiractina e *T. cruzi* (figura 7), o prétratamento do inseto com azadiractina para uma posterior tentativa de infecção com o protozoário (figura 8) e a administração da azadiractina após o estabelecimento da infecção (figura 9) resultam igualmente em uma forte inibição ao desenvolvimento do parasita em seu hospedeiro invertebrado.

2) Uma única dose do camposto é capaz de exercer este afeito inibitório por no mínimo 120 dias, tempo total do experimento realizado, o que equivale a cerca de 2/3 do tempo da vida do inseto em sua fase adulta. Este efeito inibidor a longo prazo manifestou-se mesmo com 4 sucessivas tentativas de reinfecção durante os repastos sanguíneos fornecidos aos insetos neste período de tempo (figura 10).

3) A azadiractina decresce significativamente a eliminação de parasitas pela urina e fezes do triatomíneo por no mínimo 50 dias após a infecção (figura 13). O fato dos parasitos não terem sido descobertos nestas excretas sugere que os insetos tratados com azadiractina não são bons vetores para a doença de Chagas.

4) A azadiractina não exerce nenhum efeito sobre as principais atividades enzimáticas do trato digestivo do *Rhodnius* (figuras 11 e 12). Assim concluímos de nossos resultados que o intestino não sofre intoxicação pela azadiractina e que esta hipótese não explica os efeitos da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi*.

5) As formas replicativa e multiplicativa do *T. cruzi* são insensíveis a exposição a azadiractina, mesmo em altas doses e por período de tempo prolongado (tabelas 1, 2 e 3).

6) Uma ação indireta através dos mecanismos de controle endócrino do triatomíneo parece ser a melhor hipótese para explicar o efeito inibidor da azadiractina sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* em seus hospedeiros artrópodes.

7) Alternativamente, a azadiractina deve causar mudanças no trato digestivo dos triatomíneos que tornam este microambiente inaceitável para a sobrevivência do tripanosoma e estabelecimento da infecção no inseto vetor. NOGUEIRA et al (1991) observou alterações morfológicas induzidas pela azadiractina nas células intestinais da *R. prolixus*, entre as quais se destacam a redução do número das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio e da flora intestinal, assim como também uma desorganização da membrana pseudoperitrofica ou perimicrovilar.

8) A azadiractina abole a infecção por *T. cruzi* do trato intestinal de um de seus hospedeiros invertebrados, o *R. prolixus*. Um paralelo entre os efeitos no balanço hormonal do hospedeiro e a inibição ao desenvolvimento dos tripanosomas é sugerido pelos nossos resultados. Uma outra possível explicação postula que a inibição ao desenvolvimento dos tripanosomas no trato digestivo de seu hospedeiro invertebrado esteja associada com modificações no microambiente intestinal que previnam o estabelecimento e morfogênese do protozoário. Ambas as hipóteses, interferência indireta através de modificações no sistema de regulação neuroendócrino ou direta por alterações celulares intestinais, estão possivelmente relacionadas e assumem que a azadiractina provoca mudanças no microambiente intestinal capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento do *T. cruzi* em seu inseto vetor.

7. BIBLIOGRAFIA CITADA

ABU-HAKIMA, R. & DAVEY, K. G., 1979. A possible relationship between ouabain sensitive ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) dependent ATPase and the effect of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect. Biochem.*, 9: 195.

ADLER, S. & THEODOR, O., 1926. The mouthparts, alimentary tract and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 20: 109-142.

AL-IZZI, M. A. & HOPKINS, T. L., 1982. Effects of 25-azasteroids on development and reproduction of the southwestern corn borer *Diatraea grandiosella* Dyar. *J. Insect. Physiol.* 28: 267-271.

ALLEGRET, M. P., 1952. Conditionnement précoce de la métamorphose chez *Galleria mellonella* L. *C. R. Acad. Sci.*, 234: 1641-1643.

ALVARENGA, N. J., 1977. Evolução do *Trypanosoma cruzi* no trato digestivo de *Triatoma infestans*. Tese, 55 p. Universidade Federal de Minas Gerais.

ALVARENGA, N. J. & BRENER, Z., 1977. Development of *Trypanosoma cruzi* in the vector in the absence of blood. Reunião sobre "Biologia do *T. cruzi*", Caxambu-Brasil.

ALVARENGA, N. J. & LEITE, M. A. B., 1982. Injection of *Trypanosoma cruzi* into the gut of triatomine bugs: number required to infect the vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76: 708-710.

ANEZ, N. & EAST, J. S., 1984. Studies of *Trypanosoma rangelli* Tejera, 1920. II. Its effects on feeding behaviour of triatomine bugs. *Acta. Trop.*, 41: 93-95.

AQUI, N., 1975. Activation of prothoracic glands by brains *in vitro*. *J. Insect. Physiol.*, 21: 903-913.

AQUI, N., 1976. Attempts to establish insect endocrine system *in vitro*. In: *Invertebrate Tissue Culture.*, Maramorosch, K., ed. New York: Academic Press, pp 133-160.

AQUI, N., GRANGER, N. A., GILBERT, L. I. & BOLLENBACHER, W. E., 1979. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: *in vitro* assay of a single neurosecretory cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5694-5698.

AQUI, N., KIMURA, Y. & FUKAYA, M., 1972. Action of the prothoracic gland on the insect integument *in vitro*. *Appl. Entomol. Zool.*, 7: 71-78.

AYMERICH, S. E. & GOLDENBERG, S., 1989. The kariotipe of *Trypanosoma cruzi* DM-28c: comparison with other *Trypanosoma cruzi* strains and Trypanosomatids. *Exp. Parasitol.*, 69: 107-115.

AZAMBUJA, P., 1985. Aspectos fisiológicos de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) I. Substâncias inibidoras da alimentação. II. Fatores hemolíticos e antibacterianos induzidos. Tese de Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

AZAMBUJA, P., BOWERS, W. S., RIBEIRO, J. M. C. & GARCIA, E. S., 1982. Antifeedant activity of precocenes and analogues on *Rhodnius prolixus*. *Experientia.*, 38: 1054.

AZAMBUJA, P., FREITAS, C. C. & GARCIA, E. S., 1985. Induction of antibacterial activity in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 57: 133-134.

AZAMBUJA, P., FREITAS, C. C. & GARCIA, E. S., 1986. Evidence and partial characterization of an inducible antibacterial factor in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 32: 807-812.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S., 1987. Characterization of inducible lysozyme activity in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.*, 20: 175-179.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S & FURTADO, A. F., 1981a. Action de précocene II sur le retard de la mue te la métamorphose chez *Rhodnius prolixus* (Hétéroptère). *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 292: 1173-1175.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S., RATCLIFFE, N. A. & WARTHEN Jr, D., 1991. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. *J. Insect. Physiol.*, 37: 771-777.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S. & RIBEIRO, J. M., 1981b. Effects of ecdysone on the metamorphosis and ecdysis prevention by precocene II in *Rhodnius prolixus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45: 100-104.

AZAMBUJA, P., GUIMARÃES, J. A. & GARCIA, E. S., 1983. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: Evidence and partial characterization. *J. Insect. Physiol.*, 29 (11): 833-837.

AZAMBUJA, P., MELLO, C. B., D'ESCOFFIER, L. N. & GARCIA, E. S., 1989a. In vitro cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards trypanosomatids. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.*, 22: 597-599.

AZAMBUJA, P., MELLO, C. B. & GARCIA, E. S., 1989b. Immunity to *Rhodnius prolixus*: inducible peptides against bacteria and trypanosomes. In: *Host Regulated Developmental Mechanisms in Vector Arthropods*, Borovsky, D. & Spielman, A., eds, pp. 270-276. Vero Beach, Florida.

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* (Hemiptère). *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. Sci. 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., PORCHERON, P. & DRAY, F., 1978. Dosages radioimmunologiques des ecdysteroids et des hormones juveniles au cours des deux derniers stades larvaires de *Rhodnius prolixus* (Stal) Insecte Hemiptere, Reduviidae. *C. R. Sci. Paris. D.*, 287: 523.

BALASHOV, Y. S., 1972. Blood-sucking ticks (Ixodoidea)- Vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Ent. Soc. Amer.*, 8: 161-376.

BAPTIST, B. A., 1941. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Q. J. Microsc. Sci.*, 29: 833.

BARRET, F. M., 1974. Effect of topical application of a juvenile hormone mimic on the duration of moulting cycle in the fifth instar *Rhodnius*. *J. Insect. Physiol.*, 20: 1507.

BARTH, R., 1952. Estudos anatômicos e histológicos sobre a sub-familia Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 50: 69-157.

BAYER, U., 1986. Auswirkungen von Niemkern-Extrakten auf unterschiedliche Entwicklungsstadien von *Ceratitis capitata* unter

besonderer Berücksichtigung von Sterilität und Fekundität der Adulten.
Dipl. thesis, University of Giessen, F. R. G.

BEAULATON, J., PORCHERON, P., GRAS, R. & CASSIER, P., 1984.
Cytophysiological correlations between prothoracic gland and hemolymph
ecdysteroid concentrations in *Rhodnius prolixus* during the fifth larval
instar: further studies in normal and decapitated larvae. *Gen. Comp.
Endocrinol.*, 53: 1.

BECK, S. D., 1965. Resistance of plants to insects. *Ann. Rev. Entomol.*,
10: 207-232.

BECK, S. D., 1972. Reversal development and cellular aging in an insect.
Science., 178: 1210-1211.

BECK, S. D., 1980. *Insect Photoperiodism.*, 2nd ed. New York, Academic
Press.

BECKAGE, N. E., METCALF, J. S., NIELSEN, B. D. & NESBIT, D. J., 1988.
Disruptive effects of azadirachtin on development of *Cotesia congregata*
in host tobacco hornworm larvae. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 9: 47-
65.

BERLIND, A., 1977. Cellular dynamics in invertebrate neurosecretory
systems. *Int. Rev. Cyt.*, 49: 172-251.

BERREUR, P., PURCHERON, P., BERREUR-BONNEFANT, J. & DRAY, F., 1979.
External factors and ecdysona release in *Calliphora erythrocephala*.
Experientia., 35: 1031.

BERRY, S. J. & RASENIK, M. M., 1981. Control of prothoracicotropic hormone release in lepdoptera. *Sci. Pap. Instit. Org. Phys. Chem. Wroclaw Tech. Univ.*, N° 22. Conf 7. pp 37-56.

BIDMON, H. J., KAUSER, G., MOBUS, P. & KOOLMAN, J., 1987. Effect of azadirachtin on blowfly larvae and pupae. *Proc. 3rd. Neem. Conf.* (Nairobi, 1986).

BILTON, J. N., BROUGHTON, H. B., JONES, P. S., LEY, S. V., LIDERT, Z., MORGAN, E. D., RZEPA, H. S., SHEPPARD, R. N., SLAWIN, A. M. Z. & WILLIAMS, D. J., 1987. An X-ray crystallographic, mass spectroscopic, and nmr study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives. *Tetrahedron.*, 43: 2805-2815.

BITKOWSKA, E., DZBENSKI, T. H., SZADZIEWSKA, M. & WEGNER, Z., 1982. Inhibition of xenograft rejection reaction in the bug *Triatoma infestans* during infection with protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J. Invertebrate. Pathology.*, 40: 186-189.

BOKER, C. A. & SCHAUB, G. A., 1984. Scanning electron microscopic studies of *T. cruzi* in the rectum of this vector *T. Infestans*. *Z. Parasitenkd.*, 70: 459-469.

BOLLENBACHER, W. E., AQUI, N., GRANGER, N. A. & GILBERT, L. I., 1979. *In vitro* activation of insect prothoracic gland by the prothoracicotropic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5148-5152.

BOLLENBACHER, W. E., AQUI, N., GRANGER, N. A. & GILBERT, L. I., 1980. Insect prothoracic glands in vitro: A system for studying the prothoracicotropic hormone. In: *Invertebrate Systems in vitro.*, Kurstak, E. & Maramorosch, K. K., eds. Amsterdam: Elsevier/North Holland, pp 253-271.

BOLLENBACHER, W. E. & BOWEN, M. F., 1983. The prothoracicotropic hormone. In: *Endocrinol. Insect.*, Liss, A. R., ed. New York, pp 89-99.

BOLLENBACHER, W. E. & GILBERT, L. I., 1981. Neuroendocrine control of insect postembryonic development: the prothoracicotropic hormone. In: *Neurosecretion : Molecules, Cells, Systems.*, Farner, D. S., ed. New York, Plenum, pp 363-372.

BOMAN, H. G. & HULTMARK, D., 1981. Cell-free immunity in insects. *Trends. Biochem. Sci.*, 6: 306-309.

BONALDO, M., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W. & GOLDENBERG, S., 1988. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.*, 106: 1349-1358.

BORST, D. W. & O'CONNOR, J. D., Arthropode molting hormone: Radioimmune assay. *Science.*, 178: 418-419.

BOWERS, W. S., 1968. Juvenile hormone: activity of natural and synthetic synergists. *Science.*, 161: 895.

BOWERS, W. S., 1969. Juvenile hormones: activity of aromatic terpenoid ethers. *Science.*, 164: 323.

BOWERS, W. S., 1976. Discovery of insects anti-juvenile hormones. In: *The Juvenile Hormones.*, pp 394-408. Gilbert, L. I., ed. New York, Plenum.

BOWERS, W. S., 1977. Anti-juvenile hormones from plants: chemistry and biological activity. In: *Natural and Protection of Plants.*, pp 129-156. Marini-Barttolo, ed. *Proc. Pontifical. Academy. of Sciences*, Vatican City, Italy.

BOWERS, W. S., 1981. How anti-juvenile hormones work. *Amer. Zool.*, 21: 737-752.

BOWERS, W. S., 1984. Insect-plants interaction: endocrine defenses. In: *Origins and Development of adaptations.*, Pitman, B., ed. London, Ciba Foundation Symposium 102: 119-137.

BOWERS, W. S. & NISHIDA, R., 1980. Juvocimenes: Potent juvenile hormone mimics from sweet basil. *Science.*, 209: 1030.

BRACK, C., 1968. Elektronmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Unter besonderes Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Überträger *Rhodnius prolixus*. *Acta. Trop.*, 25: 289-356.

- BRADLY, T. J., 1985. The excretory system: structure and physiology. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I., eds, 4: 431-465.
- BRENER, Z., 1972. A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate host. *J. Protzool.*, 19: 23-27.
- BRENER, Z., 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 27: 347-383.
- BRENER, Z. & ANDRADE, Z. A., 1979. O Parasito: Relações hospedeiro-parasito. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.*, Guanabara Koogan., ed. pp 1-36. Rio de Janeiro, Brasil.
- BROOKS, G. T., PRATT, G. E. & JENNINGS, R. C., 1979. The action of precocenes in milkweed bugs (*Oncopeltus fasciatus*) and locusts (*Locusta migratoria*). *Nature (London)*., 281: 572-579.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L., 1980. Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid. Res.*, 21: 505.
- BUTENANDT, A. & KARLSON, P., 1954. Über die isolierung eines metamorphosehormons der insekten in Kristallisierter form. *Z. Naturforsch.*, 9b: 389.

BUTTERWORTH, J. H. & MORGAN, E. D., 1968. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *Chem. Commun.*, 35: 23-24.

CASTELLANI, O., RIBEIRO, L. V. FERNANDES, J. F., 1967. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.*, 14: 447-451.

CERF, D. C. & GEORGHIOU, G. P., 1972. Evidence of cross-resistance to a juvenile hormone analogue in some insecticide-resistant houseflies. *Nature (London)*., 239: 401.

CLARK, K. U. & LANGLEY, P. A., 1963. studies on the initiation of growth and moulting in *Locusta migratoria migratoroides* R. and F. III. The role of the frontal ganglion. *J. Insect. Physiol.*, 9: 411-422.

CASSIER, P., 1979. The corpora allata of the insects. *Inst. Rev. Cytol.*, 57: 1-70.

CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R. W. & PRADO, C. E., 1971. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatominos. *Bol. Chil. Parasitol.*, 26: 57-58.

CHAGAS, C., 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n, sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1: 159-218.

CHAGAS, C., 1911. Nova entidade mórbida do homem; resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 3: 219-275.

- CHINO, H., SAKURAI, S., OHTAKI, T., IKEKAWA, N., MIYAZAKI, H., ISHIBASHI, M. & ABUKI, H., 1974. *Science.*, 183: 529-530.
- CHURCH, N. S., 1955. Hormones and the termination and reinduction of diapause in *Cephus cindus*. *Nort. Canad. J. Zool.*, 33: 339-369.
- CLEVELAND, L. R. & NUTTING, W. L., 1955. Supression of cycles and death of the protozoa of *Cryptocercus* resulting from change of hosts during moulting period. *J. Exp. Zool.*, 130: 485.
- CONTRERAS, V. T., ARAUJO-JORGE, T. C., BONALDO, M. C., THOMAS, N., BARBOSA, H. S., MEIRELLES, M. N. L. & GOLDENBERG, S., 1988. Biological aspects of the DM-28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metaciclogenesis in chemically definid media. *Mem. Inst. Oswaldo cruz.*, 83: 123-133.
- COUDRON, T. A., LAW, J. H. & KOEPPE, J. K., 1981. Insect hormones. *TIBS.*, 6(9): 248-251.
- D'ALESSANDRO, A. & MANDEL, S., 1969. Natural infections and behaviour of *Trypanosoma rangelli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *J. Parasitol.*, 55: 846-852.
- DAVEY, K. G., 1980. The physiology of reproduction in *Rhodnius* and other insects: some questions. In: *Insect Byology in the Future.*, Locke, M. & Smith, D. S., eds. pp. 325-344. Academic Press, New York.

- DAVEY, K. G. & HUEBNER, E., 1974. The response of the follicle cells of Rhodnius prolixus to juvenile hormone and antigonadotropin in vitro. Can. J. Zool., 52: 1047-1412.
- DE KORT, C. A. & GRANGER, N. A., 1981. Regulation of the juvenile hormone titer. Annu. Rev. Entomol., 26:1.
- DE WILDE, J., 1975. An endocrine view of metamorphosis, polymorphism and diapause in insects. Am. Zool., 15: 13-27.
- DENTON, R. M., BROWN, R. W. & BELSHAM, G. J., 1981. A partial view of the mechanism of insulin action. Diabetologia., 21: 347.
- DIAS, E., 1934. Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 28: 1-110.
- DIAS, E., 1940. Xenodiagnósticos seriados em cães infectados com amostras venezuelanas de Schizotrypanum cruzi. Bras. Med., 54: 854-861.
- DOGRA, G. S., 1973. Neurosecretion in Rhodnius prolixus and the problem of endocrine control of reproduction. An. Entomol. Soc. Am., 66(5): 1011-1021.
- DORN, A., 1986. Effects of azadirachtin on reproduction and egg development of the heteropteran Oncopeltus fasciatus Dallas. Z. angew. Ent., 102: 313-319.

DORN, A., RADEMACHER, J. M. & SENH, E., 1987. Effects of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *J. Insect. Physiol.*, 32: 321-238.

DUCEMAN, B. W., ROSE, K. M. & JACOB, S. T., 1981. Activation of purified hepatoma RNA polymerase I by homologous protein kinase NII. *J. Biol. Chem.*, 256: 10755.

EDWARDS, P. J. & WRATTEN, S. D., 1981. Ecologia das interações entre insetos e plantas. In: *Temas de Biologia.*, EDUSP., ed. São Paulo/Brasil. Vol 27, 71 pp.

ENGELMANN, F., 1970. *The physiology of insect reproduction.*, 307 pp. Pergamon Press Inc.

ERLICH, P. R. & RAVEN, P. H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution.*, 18: 588-608.

FEDER, D., VALLE, D., REMBOLD, R. & GARCIA, E. S., 1988. Azadirachtin-induced sterelization in mature females of *Rhodnius prolixus*. *Z. Naturforsch.*, 43c: 908-913.

FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O., 1968. Effect of drugs that inhibit the protein and nucleic acid synthesis of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Int. Pharmacol. Meeting*, 3° ed., 1: 93-104.

FEYEREISEN, R., LAGUEAUX, M. & HOFFMANN, J. A., 1976. Dynamics of ecdysone metabolism after ingestion and injection in *Locusta migratoria*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29: 319.

FEYEREISEN, R., FRIEDEL, T. & TOBE, S. S., 1981. Farnesoic acid stimulation of C₁₆ juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of adult female *Diploptera punctata*. *Insect. Biochem.*, 11: 401.

FRAENKEL, G., 1959. The raison d'être of secondary plant substances. *Science.*, 129: 1466-1470.

FRAENKEL, G., 1969. Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. *Ent. Exp. & Appl.*, 12: 473-486.

FRIEND, W. G. & SMITH, J. J. B., 1977. Feeding in *Rhodnius prolixus*: Increased sensitivity to ATP during prolonged food deprivation. *J. Insect. Physiol.*, 21: 1081-1084.

FUJISHITA, M. & ISHIZAKI, H., 1981. Circadian clock and prothoracicotropic hormone secretion in relation to the larval-larval ecdysis rhythm of the saturniid *Samia chyntia ricini*. *J. Insect Physiol.*, 27: 121-128.

FUKUDA, S., 1941. Role of prothoracic gland in differentiation of the imaginal characters in the silkworm pupae. *Annot. Zool. Japan.*, 20: 9-13.

FURTADO, A. F., 1976. Etude histophysiologique des cellules neurosécrétices de la pars intercerebralis de larves femelles de *Panstrongylus megistus* (Heteroptera: Reduviidae). *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 283: 183.

GALBRAITH, M. N. & HORN, D. H. S., 1966. An insect-molting hormone from a plant. *Chem. Commun.*, 905.

GALUN, R., 1975. Behavioral aspects of chemoreception in blood-sucking invertebrates. In: *Sensory Physiology and Behaviour*. GALUN, R., HILLMAN, P., PARNAS, I. & WERMAN, R., eds. pp 211-221, New York: Plenum.

GARCIA, E. S., 1987. The digestion of Triatominae. In: *Chagas Disease Vectors (Anatomic and Physiological Aspects)*. BRENNER, R. R. & STOKA, A. M., eds. 2: 48-57.

GARCIA, E. S. & AZAMBUJA, P., 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* in insect vector. *Parasitology.*, 7 (9): 240-244.

GARCIA, E. S., AZAMBUJA, P., FORSTER, H. & REMBOLD, H., 1984. Feeding and molt inhibition by azadirachtins A, B and 7-acetyl-azadirachtin A in *Rhodnius prolixus* nymphs. *Z. Naturforsch.*, 39c: 1155-1158.

GARCIA, E. S. & DVORAK, J. A., 1982. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the insect *Dipetalogaster maximus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31: 359-362.

GARCIA, E. S., FEDER, D., LIMA GOMES, J. E. P. & AZAMBUJA P., 1987. Effects of precocene and azadirachtina in *Rhodnius prolixus*: some data

on development and reproduction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 87 (Suppl. III): 67-73.

GARCIA, E. S., GARCIA, M. L. M., MACARINI, J. D. & UBATUBA, F. B., 1975. Influência do número de hemácias no volume de sangue sugado por larvas de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Bras. Biol.*, 47: 537-545.

GARCIA, E. S. & GILLIAM, F. C., 1980. *Trypanosoma cruzi* development is independent of protein digestion in the gut of *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.*, 66: 1052-1053.

GARCIA, E. S., GONZALEZ, M. S. & AZAMBUJA, P., 1991. Effect of azadirachtin in *Rhodnius prolixus*: data and hypotheses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 86 (Suppl II): 107-111.

GARCIA, E. S., GONZALEZ, M. S. & AZAMBUJA, P. & REMBOLD, H., 1989a. Chagas disease and its insect vector. Effect of azadirachtin A on the interaction of a triatominae host (*Rhodnius prolixus*) and its parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Z. Naturforsch.*, 44c: 317-322.

GARCIA, E. S., GONZALEZ, M. S. & REMBOLD, H., 1989b. Chagas disease and its insect vector. Curing effect of azadirachtin A in the triatominae host, *Rhodnius prolixus*, from its parasite, *Trypanosoma cruzi*. In: D. Borobsky & A. Spielman, eds, Vero Beach, Florida. 363-370.

GARCIA, E. S. & GUIMARÃES, J. A., 1979. Proteolytic enzymes in *Rhodnius prolixus* midgut. *Experientia.*, 35: 305.

GARCIA, E. S., GUIMARÃES, J. A. & PRADO, J. L., 1978. Purification and characterization of a sulfhydryl-dependent protease from *Rhodnius prolixus* midgut. *Arch. Biochem. Biophys.*, 188: 315.

GARCIA, E. S., LUZ, N., AZAMBUJA, P. & REMBOLD, H., 1990. Azadirachtin depresses release of prothoracicotropic hormone in *Rhodnius prolixus* larvae: Evidence from head transplantations. *J. Insect. Physiol.*, 36: 679-682.

GARCIA, E. S. & REMBOLD, H., 1984. Effects of azadirachtin on ecdysis of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.* 30: 939-941.

GARCIA, E. S., SUBRAHMANYAM., B., MULLER, Th. & REMBOLD., 1989c. Absorption, storage, organ distribution, and excretion of dietary (22,23-3H₂)dihydroazadirachtin A in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 35: 743-749.

GARCIA, E. S., UHL, M. & REMBOLD, H. 1986. Azadirachtin, a chemical probe for the study of moulting process in *Rhodnius prolixus*. *Z. Naturforsch.*, 41c: 771-775.

GARCIA, E. S., VIEIRA, E., LIMA GOMES, J. E. P. & GONÇALVES, A., 1984. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi*/invertebrate host. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 79 (Suppl): 33-37.

GEE, J. D., WHITEHEAD, D. L. & KOOLMAN, J., 1977. Steroids stimulate secretion by insect Malpighian tubules. *Nature (London).*, 269: 238.

GEERING, K., 1975. Haemolytic activity in the blood clot of *Aedes aegypti*. *Acta Trop.*, 32: 145-151.

GEIGY, R., HALFF, L. A. & KOCKER, V., 1953. Untersuchungen über die physiologischen beziehungen zwischen einer Übertrager der Chagas Krankheit *Triatoma infestans* und dessen darmsymbionten. *Schweiz. Mediz. Wochens.*, 83: 928-930.

GIBBS, D. & RIDDIFORD, L. M., 1977. Prothoracicotropic hormone in *Manduca sexta*: Localization by a larval assay. *J. Exp. Biol.*, 66: 255-266.

GILBERT, B., 1976. Possible use of juvenil 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 insect*. Academic 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.

GILBERT, L. I., BOLLENBACHER, W. E., AQUI, N., GRANGER, N. A., SEDLAK, B. J., GIBBS, D. & BUYS, C. M., 1981. The prothoracicotripes: source of the prothoracicotropic hormones. *Amer. Zool.*, 21; 641-653.

GILBERT, L. I., GOODMAN, W. & BOLLENBACHER, W. E., 1977. Biochemistry of regulatory lipids and sterols in insects. In: *International Review of Biochemistry. Biochemistry of Lipids II.*, Goodwin, T. H., ed. Baltimore: University Park Press, pp 1-50.

GILBERT, L. I. & KING, D. S., 1973. Physiology of growth and development: Endocrine aspects. In: *The Physiology of insecta.*, Rockstein, M., ed. New York: Academic Press, 1: 249-370.

GOLDENBERG, S., 1990. In: *Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design.* Azabian, N. & Cerami, A., eds, pp. 1-6, Wiley-Liss.

GOLDSWORTHY, G. J. & MORDUE, W., 1974. Neurosecretory hormones in insects. *J. Endocrinol.*, 60: 529-558.

GOODING, R. H., 1969. Studies on proteinases from some blood-sucking insects. *Proc. Entomol. Soc. Ontario.*, 100: 139.

GOODING, R. H., 1977. Digestive processes of hematophagous insect. XIV. Haemolytic activity in the midgut of *Glossina morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). *Can. J. Zool.*, 55: 1899-1905.

GOODMAN, W., O'HERN, P. A., ZAUGG, R. H. & GILBERT, L. L., 1978. Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from the hemolymph of the fourth instar tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 11: 225.

GOODWIN, T. W., HORN, D. H. S., KARLSON, P., KOOLMAN, J., NAKANISHI, K., ROBBINS, W. E., SIDDALL, J. B. & TAKEMOTO, T., 1978. Ecdysteroids: a new generic term. *Nature (London)*, 272: 122.

GORSKI, J., WELSHONS, W. V. & SAKAI, D., 1984. Remodeling the estrogen receptor model. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 36: 11.

GRANGER, N. A. & BOLLENBACHER, W. E., 1981. Hormonal control of insect metamorphosis. In: *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology*, Gilbert, L. E. & Frieden, E., eds. 2nd ed. New York: Plenum, pp 105-137.

GRONENEYER, H. & PONGS, O., 1980. Localization of ecdysterone on polytene chromossomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 2108.

HABORNE, J. B., 1977. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London.

HACHLOW, V., 1931. Zur Entwicklungsmechnik der Schmetterlinge. *Roux. Arch. Entw. Mech. Organ.*, 125: 26-49.

HAGEDORN, H. H., O'CONNOR, J. D., FUCHS, M. S., SAGE, B., SCHLAELER, D.A. & BOHN, M. K., 1975. The ovary as a source ecdysone in a adult mosquito. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 3255-3259.

HECKER, H., SCHWARZENBACK, M. & RUDIN, W., 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangelli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res.*, 76: 311-318.

HEINRICH, G. & HOFFMEISTER, H., 1970. Bildung von Homoglykosiden als Inaktivierungsmechanismus bei *Calliphora erythrocephala*. *Z. Naturforsch.* 25: 358.

HEINRICK, C. K., STAAL, G. B. & SIDDALL, J. B., 1973. Alkyl 3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoates, a new class of potent insect growth regulator with juvenile hormone activity. *J. Agric. Food. Chem.*, 21: 354.

HELLMAN, K. & HAWKINS, R. I., 1964. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature (London)*., 201: 1008.

HELLMAN, K. & HAWKINS, R. I., 1965. Prolixin S and Prolixin G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus*. *Nature (London)*., 207: 265.

HENCHUK, T. T. & DAVEY, K. G., 1982. Some properties of Na⁺-K⁺ ATPase in the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect. Biochem.*, 12: 675.

HENCHUK, T. T. & DAVEY, K. G., 1985. The binding of juvenile hormone to membranes of follicle cells in the insect *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 63: 102.

HEROUT, V., 1970. Some relations between plants, insects and their isoprenoids. *Progr. Phyto. Chem.*, 2: 143-202.

HIKINO, H. & TAKEMOTO, T., 1974. Ecdysones of plant origin. In: *Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophyly*, Burdette, W. J, ed., Springer-Verlag, New York.

HIRUMA, K. & AQUI, N., 1977. Relationship between histological changes and functions of the neurosecretory cells in the brain of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. *Appl. Entomol. zool.*, 12: 42-49.

HOARE, C. A. & WALLACE, F. G., 1966. Developmental stages of Trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature (London)*., 212: 1385-1389.

HODKOVÁ, M., 1976. Nervous inhibition of corpora allata by photoperiod in *Pyrrhocoris apterus*. *Nature (London)*., 263: 521-523.

HOUSEMAN, J. G., 1978. A thiol-activated digestive proteinase from adults of *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.*, 56: 1140.

HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, E. R., 1980. Endoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Insect. Biochem.*, 10: 363.

HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, E. R., 1981. Exoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Insect. Biochem.*, 11: 579.

HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, E. R., 1982. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Insect. Biochem.*, 12: 651.

HURPIN, B., 1962. Alimentation, développement et fécondité chez les insects. *Ann. Nutr. Aliment.*, 16: 153-200.

ISHIZAKY, H. & ISHIKAWA, M., 1967. Purification of the brain hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Biol. Bull, Woods Hole.*, 133: 355-368.

JACOBSON, M., 1979. Prevention of crop losses due to insects throught the use of natural feeding deterrents. *Summary of a report presented at the 9th International Conference on Plant Protection*, Washington, DC, August 5-11, pp. 1-3.

JACOBSON, M., 1986. The neem tree: Natural resistance par excellence. In: *Natural Resistance of Plants to Pests. Roles of Allelochemicals*. Green, M. B. & Hedin, P. A., eds. ACS Symp. Ser. No. 296. pp. 220-232.

JACOBSON, M. & CROSBY, D. G., 1971. Naturally occuring insecticides. Marcel Decker, ed. New York. 585 pp.

JENNINGS, R. C., 1983. Insect hormones and growth regulators. *Pestic. Sci.*, 14: 327-333.

JERMY, T., 1966. Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. *Ent. Exp. & Appl.*, 9: 1-12.

JOHANSSON, A. S. M., 1958. Relation of nutrition to endocrine-reproductive functions in the milk-weed bug *Oncipeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygacidae). *Nyt. Mag. Zool.*, 7: 1-132.

JOHNSON, P. & REES, H. H., 1977. The mechanism of C-20 hydroxylation of ecdisone in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem. J.*, 168: 513-520.

JONES, J. C., 1965. The hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Biol. Bull. Woods. Hole.*, 129: 282-294.

JUAREZ, E., 1970. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Revista de Saúde pública.*, 4: 147-166.

JUBERG, J., GONÇALVES, T. C. M. & OLIVEIRA FILHO., 1982. Alterações morfológicas provocadas pela aplicação de precoceno II em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Bras. Biol.*, 42: 527.

JUDY, K. J., SCHOOLEY, D. A., DUNHAM, L. L., HALL, M. S., BERGOT, B. J. & SIDDALL, J. B., 1973. Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 1509-1513.

JURD, L., FYE, R. L. & MORGAN, J., 1979. New types of insect chemosterilants: benzyphenols and benzyl-1,3-benzodioxole derivatives as additives to housefly diet. *J. Agri. Food. Chem.*, 27: 1007.

KAMBYSELLIS, M. P. & WILLIAMS, C. M., 1971. *In vitro* development of insect tissues II. The role of ecdysone in the spermatogenesis of silkworms. *Biol. Bull.*, 141: 541-542.

KAMPEN, E. J. & ZIJLSTRA, W. G., 1961. Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta.*, 6: 538-544.

KARLSON, P. & SEKERIS, C. E., 1962. Zum tyrosinstoffwechsel der insekten. IX. Kontrolle des tyrosinstoffwechsels durch ecdyson. *Biochim. Biophys. Acta.*, 63: 489.

KASUGA, M., KARLSSON, F. A. & KAHN, C. R., 1982. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95000 dalton subunit of its own receptor. *Science*, 215: 185.

KIERSZENBAUN, F., IVANY, J. & BUDZKO, D. B., 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol.*, 30: 1-6.

KING, D. S., BOLLENBACHER, W. E., BORST, D. W., VEDECKIS, W. V., O'CONNOR, J. D., ITTYCHERIAH, P. I. & GILBERT, L. I., 1974. The secretion of ecdysone by the prothoracic glands of *Manduca sexta* *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 793-796.

KING, D. S. & GREENE, G. L., 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature (London)*, 307: 745-747.

KING, D. S. & SIDDAL, J. B., 1969. Conversion of alpha-ecdysone to beta-ecdysone by crustaceans and insects. *Nature (London)*, 221: 955.

KLAGES, G. & EMMERICH, H., 1980. High-affinity binding sites for juvenile hormone I in the larval integument of Drosophila hydei. Nature (London), 286: 282.

KNOBLOCK, C. A. & STEEL, C. G. H., 1987. Effects of decapitation at the head critical period for moulting on haemolymph ecdysteroid titres in final-instar male and female Rhodnius prolixus (Hemiptera). J. Insect. physiol., 12 (33): 967-972.

KNOBLOCK, C. A. & STEEL, C. G. H., 1989. The timing of release of prothoracicotropic hormone in relation to the head critical period during larval-adult development in Rhodnius prolixus (Hemiptera): Evidence from head transplantation experiments. J. Insect. Physiol., 35: 459-464.

KOBAYASHI, M. & YAMAZAKI, M., 1974. Bioassay for brain hormone. In: Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophily, Burdette, W. J., ed. Berlin: Springer-Verlag, pp 113-120.

KOEPPE, J. K., KOVALICK, G. E. & LAPOINT, M. C., 1981. In: Juvenile Hormone Biochemistry, Pratt, W. & Brooks, K., eds., Elsevier/North Holland, Amsterdam.

KONO, Y., 1973. Light and electron microscopic studies on the neurosecretory control of diapause incidence in Pieris rapae crucivora. J. Insect., 19: 255-273.

KONO, Y., 1973. Daily changes of neurosecretory type-II cell structure of Pieris larvae entrained to short and long days. J. Insect. Physiol., 21: 249-264.

KOPEC, S., 1917. Experiments on metamorphosis of insects. *Bull. Int. Acad. Cracovie.*, B: 57-60.

KOPEC, S., 1922. Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull, Woods Hole.*, 42: 322-342.

KOUL, O., ISMAN, M. B. & KETKAR, C. M., 1990. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Can, J. Bot.*, 68: 1-11.

KRAMER, S. J. & LAW, J.H., 1980. Control of juvenile hormone production: the relationship between precursor supply and hormone biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect. Biochem.*, 10: 569.

KRAMER, K. J., SANDBURG, L. L., KEZDY, F. J. & LAW, J. H., 1974. The juvenile hormone binding protein in the haemolymph of *Manduca sexta* Johnson (Lepidoptera: Sphingidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 493.

KRAUS, W., BOKEL, M., BRUHN, A., CRAMER, R., KLAIBER, I., KLENCK, A., NAGEL, G., POHNL, H., SADLO, H. & VOGLER, B., 1987. Structure determination by mnr azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *Tetrahedrom.*, 43: 2817-2830.

KRISHNAKUMARAN, A. & SCHNEIDERMAN, H. A., 1965. Prothoracicotropic activity of compounds that mimic juvenile hormones. *J. Insect. Physiology.*, 11: 1517-1532.

KROEGER, H., 1963. Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells. *Nature (London).*, 200: 1234.

KROEGER, H. & LEZZI, M., 1966. The regulation of gene action in insect development. *Annu. Rev. Entomol.*, 11: 1.

KOREEDA, M., NAKANISHI, K. & GOTO, M., 1970. Ajugalactone, an insect moulting inhibitor as tested by the Chilo dipping method. *J. Am. Chem. Soc.*, 92: 7512-7513.

KUBO, L., LEE, Y. W., BALOGH-NAIR, V., NAKANISHI, K. & CHAPYA, A., 1976. Synthesis of ajugarins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1976: 949-950.

LAVIE, D., JAIN, M. K. & SPHAN-GABRIELITH., 1967. A locust phagorepellent from two *Melia* species. *Chem. Commun.*, 56: 910-911.

LAFONT, R., BEYDON, P., SOMME-MARTIN, G. & BLAIS, C., 1980. High performance liquid chromatography of ecdysone metabolites applied to the cabbage butterfly *Pieris brassicae* L. *Steroids.*, 36: 185.

LANGLEY, P. A., TREWERN, M. A. & JURD, L., 1982. Sterilizing effects of benzyl-1,3-benzodioxole on the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Bull. Entomol. Res.*, 72: 473.

LARNER, J., GALASKO., G., CHENG, K., DE BOLIROACH, A. A., HUANG., L., DAGGY, P. & KELLOG, J., 1979. Generation by insulin of a chemical mediator that controls protein phosphorylation and dephosphorylation. *Science.*, 206: 1408.

LARSON, R. O., 1987. Development of Margosan-O, a pesticide from neem seed. In: *Proceedings of the International Neem Conference*, Nairobi, Kenya, July 10, 1986. pp. 243-250.

LAW, J. H., YUAN, C. & WILLIAMS, C. M., 1966. Synthesis of a material with high juvenile hormone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55:576.

LEES, A. D., 1955. *The physiology of diapause in arthropodes*. Cambridge, England: Cambridge University Press.

LENT, H., 1948. O gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE). *Rev. Bras. Biol.*, 8: 297-339.

LENT, H. & JUBERG, J., 1969. O gênero *Rhodnius* Stal, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Bras. Biol.*, 29: 487-560.

LEZZI, M. & GILBERT, L. I., 1972. Hormonal control of gene activity in polytene chromosomes. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.*, 3: 159.

LUZ, E. & BORBA, A. M., 1969. Sobre o tempo de permanência do *Trypanosoma cruzi* Chagas no *Triatoma infestans* Klug. *An. Fac. Med. Un. Paraná.*, 11-12: 147-157.

MANSOUR, F. A., ASCHER, K. R. S. & OMARI, N., 1987. Insecticidal effect of neem seed kernel extracts from different solvents on the predacious mite *Phytoseilus persimilis*, and the phytophagous mite *Tetranychus*

cinnabarinus, as well as the predatory spider *Chiracanthium mildei*.
proc. 3rd. Int. Neem. Conf. (Nairobi, 1986).

MARKS, E. P., 1976. The uses of cell and organs cultures in insect endocrinology. In: *Invertebrate Tissue Culture.*, Maramorosch, K., ed. New York: Academic Press pp 117-132.

MAROY, P., DENNIS, R., BECKERS, C., SAGE, L. & O'CONNOR, J. D., 1978. Demonstration of a ecdysteroid receptor in a cultured cell line of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 5035-6039.

MASNER, P., BOWERS, W. S., KALIN, M. & MUHLER, T., 1979. Effect of precocene II on the endocrine regulation of development and reproduction in the bug *Oncopeltus fasciatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37: 156.

MAYER, R. T., DURRANT, J. L., HOLMAN, G. M., WEIRICH, G. F. & SVOBODA, J. A., 1979. Ecdysone-3-epimerase from the midgut of *Manduca sexta* (L). *Steroids.*, 34: 555.

MEISNER, J., ASCHER, K. R. S. & ZUR. M., 1983. The residual effect of a neem seed kernen extract sprayed on fodder beet against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Phytoparasitica.*, 11: 51-54.

MILES, M. A., 1979. Transmission cycles and the heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. In: Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A., eds., *Biology of the Kinetoplastida*, London, N.Y., San Francisco. Academic Press, pp 117-196.

MILLER, A. M. & CHAMBERLAIN, W. F., 1989. Azadirachtin as a previcide against the horn stable fly and house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, 82 (5): 1375-1378.

MITSUI, T., RIDDIFORD, L. M. & BELLAMY, G., 1979. Metabolism of juvenile hormone by the epidermis of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Insect. Biochem.*, 9: 637.

MOLINEUX, D. H., WALLBANKS, K. R. & INGRAM, G. A., 1987. In: *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections.*, Chang, K. P. & Snary, D., eds, pp. 387-396. Springer-Verlag.

MORDUE, A. J., COTTE, P. K. & EVANS, K. A., 1985. Azadirachtin: its effect on gut motility, growth and moulting in *Locusta*. *Physiol. Entomol.* 10: 431-437.

MORGAN, P. B., LA BREQUE, G. C., WEIDHAAS, D. E. & BENTON, A., 1975. The effect of metoprene, an insect growth regulator, on *Musca domestica*. *Can. Entomol.*, 107: 413.

MOHOROSHI, S. & IIJIMA, T., 1969. Induction of supernumerous ecdysis by the injection of ecdysone in *Bombyx mori*. *Proc. Japan. Acad.*, 45: 314-317.

MOHOROSHI, S., ISHIDA, S. & SONE, M., 1972. The control of growth and development in *Bombyx mori*. XIII- Effects of ecdysterone on the development of the fifth instar instar and pupae. *Proc. Japan. Acad.*, 48: 263-267.

MONGEK, D. J. & LAW, J. H., 1982. Control of juvenil hormone biosynthesis: evidence for phosphorylation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme: A reductase of insect corpus allatum. *J. Biol. Chem.*, 257: 1921.

MOUSSA NCHE, H., LENT, H., KITAGAWA, M. & GILBERT, B., 1970. Insect juvenile hormone-like activity in a diterpene. *Rev. Bras. Biol.*, 30: 55.

MSHELWALA, A. S. & OBMEROD, W. E., 1973. Measurement of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* in faeces of *Rhodnius* by comparison of Dose-response curves. *J. Gen. Microbiol.*, 75: 339-350.

MUHLPHORDT, H., 1959. Der einfluss der Darmsymbioten von *Rhodnius prolixus* auf *Trypanosoma cruzi*. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 14: 357-398.

MUNAKATA, K., 1975. Insect antifeeding substances in plants leaves. *Pure. Appl. Chem.*, 42: 57-66.

NAKANISH, K., 1980. In sect antifeedants from plants. In: *Insect Biology in the Future*. Locke, M. & Smith, D. S., eds. pp. 603-612.

NEVES, D. P., 1971. influência da temperatura na evolução do *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 13: 155-161.

NIJHOUT, H. F., 1979. Stretch-induced molting in *Oncopeltus fasciatus*. *J. Insect. Physiol.*, 25: 277-281.

NOGUEIRA, N. F. S., GARCIA, E. S., GONZALEZ, M. S. & DE SOUZA, W., 1991. Morphological alterations induced by azadirachtin in the midgut cells of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 86 (Suppl. I): 251.

NOVÁK, V. J. A., 1975. *Insect Hormones.*, 2 ed., Chapman & Hall, London, 600 pp.

OLIVEIRA FILHO, A. M., PINCHIN, R., FIGUEIREDO, M. J. & MULLER, C. A., 1984. Blockage of embrionic development in *Panstrongylus megistus* by juvenile hormones analogues. *Insect. Sci. Appl.*, 5: 127.

OLIVEIRA FILHO, A. M., PINCHIN, R. & SANTOS, C. E., 1930. Activity of precocenes on the Chagas disease vector *Panstrongylus megistus*. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 545.

ORCHARD, I. & STEEL, C. G. H., 1980. Electrical activity of neurosecretory axons from the brain of *Rhodnius prolixus*: Relation of changes in the pattern of activity to endocrine events during the molting cycles. *Brain. Res.*, 191: 53-67.

OHTAKI, T., 1966. On the delayed pupation of the fleshfly *Sarcophaga peregrina* Robineau-Desvoidy. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 19: 97-104.

PATTERSON, J. W., 1974. The effect of the persistence of juvenile hormone mimics on their activity on *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 19: 1631.

PATTERSON, J. W. & SCHWARZ, M., 1977. Chemical structure, juvenile hormone activity and persistence within the insect of juvenile hormones mimics for *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 23: 121.

PENNER, M. P., ORSHAN, L. & DE WILDE., 1978. Precocene II causes atrophy of corpora allata in *Locusta migratoria*. *Nature (London)*., 272: 350-353.

PEREIRA DA SILVA, L. H., 1959. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 1: 95-118.

PEREIRA, M. E. A., ANDRADE, A. F. B. & RIBEIRO, J. M. C., 1981. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science.*, 211: 597-600.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., PETANA, W. B. & FIGUEIREDO, M. J., 1975. The evaluation of host efficiency and vector potential of laboratory juvenilized vectors of Chagas disease. I. Effects of developmental changes induced by juvenile hormone analogues in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae) on the susceptibility of the insects no gut infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Troo. São Paulo.*, 17: 97.

PESSOA, S. B. & MARTINS, A. B., 1977. *Trypanosoma cruzi* e molestia de Chagas. In: *Parasitologia Médica.*, Guanabara Koogan., ed. pp. 143-191, 10° ed. Rio de Janeiro, Brasil.

PHILLIPS, N. B., 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi* : aspects of the rearing, maintenance and testing of vector material, and of the origin and course of infection in the vector. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 54: 397-414.

PHILLIPS, N. R. & BERTRAM, D. S., 1967. Laboratory studies of *Trypanosoma cruzi* infections. In *Rhodnius prolixus*- larvae and adults. In: *Triatoma infestans*, *Triatoma proctata* and *Triatoma maculata*-adults. *J. Med. Entomol.*, 4: 168-174.

PINCHIN, R.; OLIVEIRA FILHO, A. H., FIGUEIREDO, H. J., MULLER, C. A., GILBERT, B., SZUMLEWICZ, A. P. & BENSON, W. W., 1978. Screening and structure activity relationship of synthetic juvenile hormone analogues for *Panstrongylus megistus*, a primary vector of Chagas' disease in Brazil. *J. Econ. Entomol.*, 71: 950.

PENDLAND, J. C., HEATH, M. A. & BOUCIAS, D. G., 1988. Function of a galactose-binding lectin from *Spodoptera exigua* larval hemolymph opsonization of blastopores from entomogenous hyphomycetes. *J. Insect. Physiol.*, 34: 533-540.

PLAGGE, E., 1938. Weitere Untersuchungen uber das Verpupungshormon bei Schmetterlingen. *Biol. Zbl.*, 58: 1-12.

PFLUGFELDER, O., 1958. Entwicklungsphysiologie der insekten. *Akademische Verlagsgesellschaft*, Geest & Portig K. G., Leipzig.

PRADHAN, S., JOTWANI, M. G. & RAI, B. K., 1962. The neem seed deterrent to locusts, *Indian Farming.*, 12: 7-11.

PRATT, G. E., JENNINGS., R. C., HAMNET, A. F. & BROOKS, G. T. 1980. Lethal metabolism of precocene I to a reactive epoxide by Locust corpora allata. *Nature (London).*, 320-323.

RAMIREZ-PEREZ, J., 1969. Estudio sobre la anatomia de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Venez. Sanidad. Assist. Social.*, 34: 11-98.

RATCLIFFE, N. A., LEONARD, C. & ROWLEY, A. F., 1984. Prophenoloxidase activation: Nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science.*, 226: 557-559.

RATCLIFFE, N. A. & ROWLEY, A. F., 1983. Recognition factors in insect hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 407-415.

REBOREDO, C. R., GUTIERREZ, A. M. & STOKA, A., 1984. Metabolismo e inactivación de Hormona juvenil en insectos triatominos. *Chagas.*, 1: 7.

REDFERN, R. E., WARTHEN, J. D., UEBEL, E. C. Jr. & MILLS, G. D. Jr., 1981. The antifeedant and growth-disrupting effects of azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and *Oncopeltus fasciatus*. In: *Natural Pesticides from the Neem Tree. Proc. 1st. Internat. Neem. Conf.*, Sctmutterer, H., Ascher, K. R. S. & Rembold, H., eds. pp. 129-136. Rottach-Egern. German Agency for Techn. Coop., Eschborn, Germany.

REMBOLD, H., 1980. Chemical aspects of plant resistance against insects. *Trans. Bose. Res. Inst.*, 43: 53-63.

REMBOLD, H., 1964. Secondary plant products in insect control with special reference to the azadirachtins. In: *Advances in Invertebrate Reproduction*. Engels, W., ed. Elsevier North Holland, New York. 3: 481-491.

REMBOLD, H., 1987. The azadirachtins- Potent insect growth inhibitors. *Mem. Inst. Oswaldo cruz.*, 82 (Suppl. III): 61-66.

REMBOLD, H., 1969. The azadirachtins- their potential for insect control. *Econ. Med. Plant. Res.*, 3: 903-907.

REMBOLD, H., FORSTER, H., CZOPPELT, C. H., RAO, P. J. & SIEBER, K. P., 1983. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. In: Schmutterer, H. & Ascher, K. R. S., eds. pp. 153-162. Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)., Germany.

REMBOLD, H., MULLER, T. & SUBRAHMANYAM, B., 1988. Tissue-specific incorporation of azadirachtin in the Malppghian tubulum of *Locusta migratoria*. *Z. Naturforsch.*, 43c: 903-907.

REMBOLD, H., SHARMA., K., CZOPPELT, C. & SCHMUTTERER, H., 1982. Azadirachtin: A potent insect growth regulator of plant origin. *Sonderdruck. aus. Bd.*, 93: 12-17.

REMBOLD, H. & SIEBER, K. P., 1981. Inhibition of oogenesis and ecdysteroid synthesis by azadirachtin in *Locusta migratoria migratorioides* (R + F). *Z. Naturforsch.*, 36c: 466-469.

REMBOLD, H., UHL, M. & MULLER, T., 1987. Effect of azadirachtin A on hormones titers during the gonadotrophic cycle of *Locusta migratoria*. In: *Natural Pesticides from the Neem Tree and others Tropical Plants.*, Schumutterer, H. & Ascher, K. R. S., eds., pp 289-298. GTZ, Eschborn.

REY, L., 1973. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: I. O Parasito. II. A Doença. III. Ecologia, epidemiologia e profilaxia. In: *Parasitologia*, Guanabara Koogan., ed , pp. 123-172. Rio de Janeiro, Brasil.

RIBEIRO, J. M. C., 1972. Antiserotonin-antihistaminic activities in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 26: 245-248.

RIBEIRO J. M. C & GARCIA, E. S., 1979. Apyrase activity in saliva and crop of *Rhodnius prolixus*. *An. Acad. Brasil. Ciénc.*, 51: 182.

RIBEIRO J. M. C. & GARCIA, E. S., 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 26: 306-307

RIBEIRO, J. M. C. & GARCIA, E. S., 1981. The role of salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.*, 94: 219-230.

RIBEIRO J. M. C. & PEREIRA, M. E. A., 1984. Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*, *Insect. Biochem.*, 14: 103-108.

RIBEIRO J. M. C. & SARKIS, J. J. F., 1982. Anti-tromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. *J. Insect. Physiol.*, 28: 655-660.

ROBBINS W. E., KAPLANIS, J. N., THOMPSON, M. J., SHORTINO, T. J., COHEN, C. F & JOYNER, S. C., 1968. *Science.*, 161: 1158-1160.

ROBBINS W. E., THOMPSON, M. J., SVOBODA, J. A., SHORTINO, T. J., COHEN; C. F., DUTKY, S. R. & DUNCAN, O. J., 1975. Non steroidal secondary and

tertiary amines: inhibitors of insect development and metamorphosis and 24-sterol-reductase system of tobacco hornworm. *Lipids.*, 10: 353.

ROMANUK, M., SLÁMA, K. & SORM, F., 1967. Constitution of a compound with pronounced juvenile hormone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 37: 349.

RONDEROS, J. R. & STOKA, A., 1984. Accion del PII en ninfar de IV estadio *T. infestans*. *J. Zool.*, 7: 226.

RUSCOE, C. N. E., 1972. Growth disruption effects of an insect antifeedant. *Nature. New. Biol.*, 236: 159-160.

RYCKMAN, R. E., 1965. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southweitem North America. Part V: Host-parasite specificity between *Trypanosoma cruzi* and Triatominae (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Hemiptera: Triatominae). *J. Med. Entomol.*, 2: 96-99.

SANDBURG, L. L., KRAMER, K. J., KEZDY, F. J., LAW, J. H. & OBERLANDER, H., 1975a. Role of juvenile hormones esterases and carrier protein in insect development. *Nature (London)*., 253: 266.

SANDBURG, L. L., KRAMER, K. J., KEZDY, F. J. & LAW, J. H., 1975b. juvenile hormones-specific esterases in the haemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J. Insect. Physiol.*, 21:873.

SANNASI, A. & KARLSON, P., 1974. Metabolismo of ecdysone: phosphate and sulphate esters as conjugates of ecdysone in *Calliphora vicina*. *Zool. Jarhb. Physiol.*, 78: 378.

- SAUNDERS, D. S., 1976. Insect clocks. *New York: Pergamon.*
- SCHARRER, E., 1928. Die lichtempfindlichkeit blinder Elritzen (Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische. I.) *Z. Vgl. Physiol.* 7: 1.
- SCHARRER, E., 1964. Photo-neuro-endocrine systems: general concepts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 117: 13-22.
- SCHAUB, G. A., 1988a. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 94-96.
- SCHAUB, G. A., 1988b. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas disease. *Acta. Trop.*, 45: 11-19.
- SCHAUB, G. A. & LOSCH, P., 1988. *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.*, 65: 174-186.
- SCLUTER, U., BIDMON, M. J. & GREWE, S., 1985. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect. Physical.*, 31: 773-777.
- SCHOOLEY, D. A., JUDY, K. J., BERGOT, B. J., HALL, M. S. & JENNINGS, R. C., 1976. *The Juvenile Hormones* (GILBERT, L. I., ed), Plenum Press, New York., pp. 197-208.

SCHMUTTERER, H., 1985. Which insects pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions? *Z. Angew. Ent.*, 100: 468-475.

SCHMUTTERER, H., 1987. Fecundity-reducing and sterilizing effects of neem seed kernel extracts in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Proc. 3rd. Int. Neem. Conf.* (Nairobi, 1986).

SCHMUTTERER, H., 1988. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *J. Insect. Physiol.*, 34 (7): 713-719.

SEKERIS, C. E. & KARLSON, P., 1964. On the mechanism of hormone action. II. Ecdysone and protein biosynthesis. *Arch. Biochem. Biochy.*, 105: 483.

SHAAYA, E. & SEKERIS, C. E., 1965. Ecdysone during development. III. Activities of some enzymes of tyrosine metabolism in comparison with ecdysone titer during the development of blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5: 35.

SHERLOCK, I. A. & ALMEIDA, S. P., 1973. Diferença de suscetibilidade á infecção com *T. cruzi* entre espécies de triatomíneos alimentados em cão, tatu e camundongos infectados. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 7: 87-98.

SIEBER, K. P. & REMBOLD, H., 1983. The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.*, 29: 523-527.

SLÁMA, K., 1975. Some old concepts and new findings on hormonal control of insect morphogenesis. *J. Insect. Physiol.*, 21: 921-955.

SLÁMA, K., 1978. The principles of antihormone action in insects. *Acta. Entomol. Bohemoslovaca.* 75: 65-82.

SLÁMA, K. & HODKOVÁ, M., 1975. Insect hormones and bioanalogues: their effect on respiratory metabolism in *Dermestes vulpinus* F. (Coleoptera). *Biol. Bull. Woods Kole.*, 14S: 320-332.

SLÁMA, K., ROMANUK, M. & SORM, F., 1974. *Insect hormones and bioanalogues.* SPRINGER VERLAG, ed. Wien, New York., pp 477.

SLÁMA, K. & WILLIAMS, C. M., 1965. Juvenile hormone activity for the bug, *Phyrrocoris apterus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54: 411.

SMITH, S. L., BOLLENBACHER, W. E., COOPER, W. Y., SCHLEYER, H., WIELGUS, J. J. & GILBERT, L. I., 1979. *Mol. Cell. Endocrinol.* 15: 111-133.

SMITH, J. J. B., CORNI, R. A. & WILKES, J., 1980. Properties of a calcium-dependent apyrase in the saliva of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Expezentia.*, 36: 898-980.

SPATES, G. E. & DELOACH, J. R., 1980. Hemolysin of the stable fly *Stomoxys calcitrans*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B: 121-125.

SPATES, G. E. & DELOACH, J. R., 1981. Proteolytic and haemolytic activity in the midgut of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L) Partial purification of the haemolysin. *Insect. Biochem.*, 11: 143-147.

SPATES, G. E., STIPANOVIC, R. D., WILLIAMS, H. & HOLMAN, G. M., 1982. Mechanism of haemolysis in a blood-sucking dipteran, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem.*, 12: 707-712.

SPENCER, C.A. STEVENS, B., O'CONNOR, J.D & HODGETTS, R. B., 1983. A novel form of Dopa-descarboxilase produced *Drosophila* cells in response to 20-hydroxyecdysone. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 61: 818.

STAAL, O. B., 1975. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Ann. Rev. Entomol.*, 20: 417.

STEEL, C. G. H. & AMPLEFORD, E. J., 1984. Circadian control of hemolymph ecdysteroid titres and the ecdysis rhythm in *Rhodnius prolixus*. In: *Photoperiodic Regulation of Insect and Molluscan Hormones*. PITMAN., ed. pp 150, London.

STEEL, C. G. H., BOLLENBACHER, N. E., SMITH, S, L. & GILBERT, L. I., 1982. Haemolymph ecdysteroids titres during larval-adult development in *Rhodnius prolixus*: correlation with molting hormone and brain neurosecretory cell activity. *J. Insect. physiol.*, 28: 519.

STEEL, C. G. H. & HARMSSEN, R., 1971. Dynamics of the neurosecretory system in the brain of an insect, *Rhodnius prolixus*, during growth and molting. *Gen. Comp. Endocr.*, 17: 125-141.

STEETS, R., 1975. Die wirkung von Rohextrakten aus den Meliaceen *Azadirachta indica* und *Melia azadirach* auf verschiedene Insektenart. *Z. angew. Ent.*, 77: 306-312.

STEETS, R., 1976. Zur wirkung eines gereinigten Extraktes aus Fruchten von *Azadirachta indica* A. Juss auf *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae). *Z. angew. Ent.*, 94: 98-108.

STEFFENS, R. J. & SCHMUTTERER, H., 1982. The effect of crude methanolic neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extract on metamorphosis and quality of adults of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis quiltata* Wied (Diptera, Tephritidae). *Z. Ang. Ent.*, 94: 98-103.

STEKELEY, R., ROJO, M. & REYES, H., 1971. Estudio sobre transmisión directa de *Trypanosoma cruzi* entre ninfas de *Triatoma infestans*. *Bol. Chil. Parasitol.*, 26: 17-19.

STILES, J. K. et al., 1990. Identification of midgut trypanolisin and trypanoagglutinin in *Glossina palpalis* ssp. *Parasitology.*, 101: 369-376.

STOKA A., 1982. Aspectos sobre la Biosíntesis y Mecanismos de Acción de Hormonas de Insetos, PH. D. thesis, University of La Plata, Argentina.

STOKA, A., 1987. Ecdysteroids, juveniles hormones and metamorphosis in triatominae. In: *Chagas Disease Vectors (Anatomic and Physiological Aspects)*. BRENNER R. R. & STOKA, A. M., eds. 2: 71-99.

STOKA, A. & CHARREAU, E. H., 1981. Ecdysone metabolism in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) *in vivo*. *Insect Biochem.*, 11: 653.

STOKA, A. & NORIEGA, F. G., 1982. Ecdysteroids: biochemical mechanism of 20-OH-ecdysone in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta. Physiol. Latinoam.*, 32: 321.

SUBRAHMANYAM, B., MULLER, T. & REMBOLD, H., 1989. Inhibition of turnover of neurosecretion by azadirachtin in *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.*, 35: 493-500.

SUBRAHMANYAM, B. & REMBOLD, H., 1989. Effects of azadirachtin A on neuroendocrine activity in *Locusta migratoria*. *Cell. Tissue. Res.*, 256: 513-517.

SVOBODA, J. A., KAPLANIS, J. N., ROBBINS, W. E. & THOMPSON, M. J., 1975. Recent developments in insect steroid metabolism. *Ann. Rev. Entomol.*, 20: 205-220.

SVOBODA, J. A. & FOBBINS, W. E., 1967. Conversion of beta sitosterol to cholesterol blocked in an insect by hypocholesterolemic agents. *Science.*, 156: 1637.

TARRANT, C. A. & CUPP, E. W., 1978. Morphogenetic effects of precocene II on the immature stages of *Rhodnius prolixus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72: 666-668.

TARRANT, C. A., CUPP, E. W. & BOWERS, W. S., 1982. The effects of precocene II on reproduction and development of triatominae bugs (Reduviidae, Triatominae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31: 416.

TAUBER, M. J. & TAUBER, C. A., 1976. Insect seasonality: diapause maintenance termination, and post-diapause development. *Ann. Dev. Entomol.*, 21: 81-107.

TERRA, W. R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Research.*, 21: 675-734.

TERRA, W. R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 35: 181-200.

THOMPSON, M. J., KAPLANIS, J. N., ROBBINS, W. E. & SVOBODA, J. A., 1973. Metabolism of steroids in insects. *Adv. Lipid. Res.*, 11: 219.

THOMPSON, M. J., KAPLANIS, J. N., WEIRICH, G. F., SVOBODA, J. A. & ROBBINS, W. E., 1981. *Regulation of Insect Development and Behaviour*. SEHNAL, F., ZABZA, A., MENN, J. J. & CYMBOROWSKI, B. eds. Wroclaw Technical University Press, Wroclaw. pp. 107-114.

THURSTON, R., 1975. Diapause inhibition in *Manduca sexta* and *Apanteles congregatus* by high scotophase temperature. *Env. Ent.*, 5: 626-627.

TOBE, S. S. & PRATW, G. E., 1974a. The influence of substrate concentration on the rate of insect juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the desert locust *in vivo*. *Biochem. J.*, 144: 107.

TOBE, S. S. & P RATT, G. E., 1974b. Dependence of juvenile hormone release from corpus allatum on intraglandular content. *Nature (London)*., 252: 474-476.

TRUMAN, J. W., 1972. Physiology of insect rhythms. The silkmoth brain as the location clock controlling eclosion. *J. Comp. Physiol.* 81: 99-114.

TRUMAN, J. W. & RIDDIFORD, L. M., 1974. Physiology of insect rhythms III. The temporal organization of the endocrine events underlying pupation of the tobacco hornworm. *J. Exp. Biol.*, 60: 371-362.

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.

URDANETA-MORALES, S., 1973. *Trypanosoma cruzi* infections in *Rhodnius prolixus* referred on different hosts. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 15: 212-221.

VAN DER KLOOT, W. G., 1961. Insect metamorphosis and its endocrine control. *Amer. Zool.*, 1: 3-9.

VAN MELLAERT, H., DE LDOF, A. & JURD, L., 1983. Physiological effects of a benzyl-1,3-benzodioxole chemosterilant on *Sarcophaga bullata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20: 124.

WARTHEN, J. D. Jr., 1979. *Azadirachta indica*- a source of insect feeding inhibitors and growth regulators. U. S. Dep. Agric. Rep. ARM-NE-4, Beltsville, MD. pp. 1-21.

WELBURN, S. C., MAUDLIN, I. & ELLIS, D. S., 1989. Rate of trypanosome killing by lectin in midguts of different species and strains of *Glossina*. *Med. Vet. Entomol.*, 3: 77-82.

WIGGLESWORTH, V. B., 1932. The physiology of excretion in a blood-sucking insects, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Exp. Biol.*, 8: 411-451.

WIGGLESWORTH, V. B., 1934a. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Quart. J. Micr. Sci.*, 77: 191-222.

WIGGLESWORTH, V. B., 1934b. Factors controlling moulting and metamorphosis in an insect. *Nature (London)*., 135: 725-726.

WIGGLESWORTH, V. B., 1935. Function of the corpus allatum in insects. *Nature (London)*., 137: 338.

WIGGLESWORTH, V. B., 1936. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Micr. Sci.*, 79: 91.

WIGGLESWORTH, V. B., 1940. The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.*, 17: 201-222.

WIGGLESWORTH, V. B., 1943. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proc. Roy. Soc. London.*, 131: 313-339.

WIGGLESWORTH, V. B., 1952. The thoracic gland in the adult insect *Rhodnius* and its role in moulting. *J. Exp. Biol.*, 29: 561-570.

WIGGLESWORTH, V. B., 1955. The breakdown of the thocracic gland in the adult insect *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.*, 32: 485-491.

WIGGLESWORTH, V. B., 1963. The juvenil hormone effect of fa rnesol and some related compouds: quantitative experiments. *J. Insect. Physiol.*, 9: 105-119.

WIGGLESWORTH, V. B., 1964. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. *Adv. Insect. Physiol.*, 2: 268-335.

WIGGLESWORTH, V. B., 1969. Chemical structure and juvenil hormone activity: comperative tests on *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.*, 15: 73-94.

WIGGLESWORTH, V. B.,]972. *The Principles of Insect Physiology*, 7th ed., Chapman & Hall, London.

WILLIANS, C. M., 1947. Physiology of insect diapause II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the glant silkworm *Platysamia cecropia*. *Biol. Bull.*, 93: 89-98.

- WILLIAMS, C. M., 1948. Extrinsic control of morphogenesis as illustrated in the metamorphosis of insects. *Growth Symposium.*, 12: 61-74.
- WILLIAMS, C. M., 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the cecropia silkworm. *Biol. Bull.*, 103: 120-235.
- WILLIAMS, C. M., 1968. Ecdysone and ecdysone analogues: Their assay and action on diapausing pupae of the *Cynthia* silkworm. *Biol. Bull.*, 134: 344-355.
- WILLIAMS, C. M. & KAFATOS, F. C., 1972. Theoretical aspects of the action of juvenile hormone. In: *Insect Juvenile Hormones: Chemistry and Action*, Menn, T. & Beroza, A., eds., Academic Press, New York, Chap. 2.
- WILLIAMS, G. T., 1985. Control of differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.*, 117: 1-18.
- WILPS, H., 1987. Growth and adult molting of larvae and pupae of the blowfly *Phormia terrae-novae* in relationship to azadirachtin concentration. *Proc. 3rd. Int. Neem. Conf.* (Nairobi, 1986).
- WELSHONS, W. V., LIEBERMAN, M. E. & GORSKI., 1984. Nuclear localization of unoccupied cestrogen receptors. *Nature (London).*, 307: 747.
- YORKE, W. & MACFIE, J. W. S., 1924. The action of salivary secretion of mosquitoes and *Glossina tachinoides* on human blood. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 18: 103-103.

YUND, M. A., KING, D. S. & FRISTROM, J. W., 1978. Ecdysteroid receptors in a imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 6039.

ZANNO, P. R., MIURA I., NAKANISHI, K. & ELDER, D. L., 1975. Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Application of PRFT/CWD carbon-13 nuclear magnetic ressonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 1975-1977.

ZEBITZ, C. P. W., 1984. Effect of some crude and azdirachtin-enrached neem (*Azadirachta indica*) seed karnel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. *Ent. Exp. Appl.*, 35: 11-16.

ZELEDÓN, R., 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas disease. In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with spacial refernce to Chagas disease*. Ciba Foundation Symposium, pp. 51-57.

ZELEDÓN, R., 1976. Host-parasite relationship in the vector. *Symposium on New Aproaches American Trypanosomiasis Research*. Ed. Pan American Health Organization, p. 9-13.

ZELEDÓN, R., 1987. life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the in the insect vector. In: *Chagas Disease Vectors (Anatomic and Physiological Aspects)*. BRENNER, R. R. & STOKA, A. M., eds. 2: 59-75.

ZELEDÓN, R., BOLANOS, R. & ROJAS, M., 1984. Scanning electron microscopy of the final phase c f the life cycle of *T. cruzi* in the insect vector. *Acta. Trop.*, 41: 39-43.