

Beatriz Ronchi-Teles (**)
Wanderli Pedro Tadei (***)
Carminda da Cruz-Landim (****)
José Wilson dos Santos Meirelles (**)

RESUMO

Ovários de *Anopheles triannulatus* foram dissecados 24 e 48 horas após as fêmeas terem sido alimentadas com fonte proteica (sangue), a fim de se estudar o seu efeito sobre a ovogênese. Foram analisadas secções histológicas, ao nível da ultraestrutura, e observadas as mudanças morfológicas que ocorrem nas interfaces células foliculares-ovócito e célula folicular-célula. Foram observados aspectos estruturais que corroboram a hipótese da produção exógena das proteínas do vitelo. Os grânulos de vitelo originaram-se principalmente por condensação das vesículas pinocíticas formadas na superfície do ovócito.

INTRODUÇÃO

O aspecto principal do estudo da ovogênese nos insetos tem sido a origem das proteínas obtidas pelo ovócito durante a vitelogênese. Discute-se se essas proteínas seriam sintetizadas no próprio ovócito ou a ele chegariam a partir de fontes exógenas. A primeira evidência de incorporação de proteínas, a partir da hemolinfa, pelo ovócito foi dada por Wigglesworth (1943) em *Rhodnius prolixus* e em alguns aracnídeos. Trabalhos mais recentes sobre a formação e a deposição dos grânulos de proteínas no ovócito têm demonstrado que eles são sintetizados extra ovário e obtidos pelo ovócito a partir da hemolinfa, por pinocitose (Telfer, 1960, 1965; Telfer et al., 1982; Bitsch, 1980). As vitelogeninas, proteínas da hemolinfa limitadas ao sexo feminino (Telfer, 1954, 1960), que originam as vitelinas do vitelo, são produzidas em vários tecidos. Em numerosos insetos diferentes essas lipoproteínas são sintetizadas nas células do corpo gorduroso (Shigematsu, 1958, 1960; Hagedorn, 1972, 1973; Brooks, 1969, 1976; Engelmann, 1969, 1971; Engels, 1974; Simões, 1980). Os dados atuais indicam que a maioria dos insetos apresenta um processo predominantemente exógeno de produção de vitelo e como evidenciaramos estudos ao

(*) Trabalho subvencionado pelo POLONOROESTE/CNPq/ELETRONORTE.

(**) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus - AM.

(***) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /UNESP, Campus de São José Rio Preto.

(****) Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Rio Claro.

nível da ultraestrutura, a condensação das vesículas pinocíticas foi observada em *Aedes aegypti* (Roth & Porter, 1964); *Periplaneta americana* (Anderson, 1964); *Lygeus kaImii* (Kessel & Beams, 1962); *Panorpa* (Bier & Ramamurty, 1964); *Hyalophora cecropia* (Stay, 1965; Telfer et al., 1982). Mas em algumas espécies como *Bombyx terrestris* (Hopkins & King, 1966), *Hyalophora cecropia* (Anderson & Telfer, 1969) e, parcialmente em *Ephestia kuhniclla* (Guelin & Durand, 1960), o processo parece ser intravariano, sendo as proteínas sintetizadas nas células foliculares.

Cummings & King (1970) demonstraram que em *Drosophila* uma fração da vitelogenina total é sintetizada no citoplasma do ovócito, num processo claramente endógeno, em adição às fontes exógenas. O mesmo tendo sido verificado por Bitsch (1980) em *Thysanura*.

No estudo da dinâmica da ovogênese em espécies de *Anopheles*, um ponto relevante a ser ressaltado é que a transmissão da malária é realizada pelas fêmeas, o que decorre da sua alimentação hematófaga. Por outro lado, uma alimentação sanguínea é necessária para a maturação dos ovócitos. Considerando este aspecto, neste trabalho são incluídos dados relacionados a uma faceta do processo reprodutivo, analisando-se mecanismos envolvidos na obtenção do vitelo pelo ovócito, acompanhando-se as modificações morfológicas, ao nível da ultraestrutura, durante seu desenvolvimento.

MATERIAL E METODOS

Para análise da ultraestrutura dos ovários, fêmeas de *A. triannulatus* foram coletadas na natureza, transportadas para o laboratório, para obtenção de desovas e, eclodidas as larvas, estas foram mantidas até atingirem o estágio adulto. Em seguida à emergência dos imagos, depois de um período de 24 horas de manutenção, as fêmeas foram alimentadas com sangue humano (fonte protéica) e dissecadas depois de 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo, em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. Os ovários foram fixados na mesma solução por 2 horas a 4°C. Em seguida lavados em tampão e pós-fixados numa solução de tetróxido de ósmio 1% a 4°C. Após uma nova lavagem em tampão foram submetidos a uma contrastação, usando-se uma solução aquosa de acetato de uranila a 1%, por uma noite, a 4°C. Em seguida foram desidratados por meio de passagens sucessivas em acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 15 minutos cada banho.

A embebição foi feita de acordo com o seguinte esquema: acetona-araldite 2:1; acetona-araldite 1:1; acetona-araldite 1:2 e resina pura, 1 hora cada.

Finalmente, os ovários foram transferidos para polimerização durante 72 horas, a 60°C.

Os blocos foram seccionados num ultramicrótomo - REICHERT Om U₃ com navalha de vidro. As seções foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), examinados num microscópio ZEISS EM 10A.

RESULTADOS

A estrutura dos ovários do gênero *Anopheles* foi descrita por Christophers (1911) e modificada por Mer (1936). Os ovários foram separados por fases de desenvolvimento de acordo com as seguintes características:

- I - Folículo com ovócito sem grânulos de vitelo;
- II - Folículo com ovócito com grânulos na periferia;
- III - Folículo com ovócito com vitelo ocupando a sua maior parte;
- IV - Folículo com ovócito ocupando a sua maior parte e células nutritoras localizando-se na parte superior;
- V - Ovócito coberto pelo córion, óvulo está pronto para ser fecundado e posto.

Considerando o estágio de vitelogênese, os ovários podem ser agrupados de acordo com a fase: pré-vitelogênica - I e II; vitelogênica - III e IV; e pós-vitelogênica - V.

Para que o desenvolvimento se efetive até a completa maturação do óvulo, é necessário que a fêmea obtenha um repasto sanguíneo completando assim a vitelogênese. A alimentação unicamente por carboidratos leva o desenvolvimento do ovócito apenas até o início da fase III. Uma fêmea, durante o seu período de vida adulta, passa por vários repastos sanguíneos, produzindo um lote de ovos em cada ciclo gonotrófico que os segue.

A Figura 1 ilustra a estrutura de um folículo completo, fixado após 24 horas de alimentação (fase vitelogênica), onde aparece uma célula nutritora e o ovócito envolto por uma camada de células foliculares. O ovócito é caracterizado por apresentar grãos de lípidos, grãos densos de proteínas e um núcleo de forma irregular. As células nutritoras geralmente apresentam um núcleo volumoso e de contorno irregular, e o nucléolo bem evidente. Observam-se também grãos de lípidos em seu citoplasma.

Observa-se ainda na Figura 1 que o núcleo das células foliculares também é volumoso, ocupando quase todo o espaço interior da mesma; o nucléolo também apresenta esta característica. Este aspecto é mostrado ainda nas Figuras 4 e 6. Na Figura 5 verifica-se que o citoplasma das células foliculares apresenta um número grande de ribossomos, como também retículo endoplasmático e mitocôndrias.

Na Figura 2 fica evidenciado o extenso desenvolvimento dos núcleos das células nutritoras e foliculares indicando que este fato poderia estar relacionado com uma intensa produção de RNA. Corroborando este aspecto, na Figura 3, em ampliação maior, observa-se passagem de material do núcleo para o citoplasma da célula nutritora.

O epitélio folicular circunda todo o folículo, estando, na parte superior, em contato com as células nutritoras e, na porção inferior, em contato diretamente com o ovócito (Figura 1). Neste último, foram observadas diferenciações marcantes relacionadas às membranas das células foliculares e do ovócito. Essas modificações podem ser enfocadas em dois momentos, em uma primeira etapa, envolvendo a região do epitélio folicular e, em uma segunda, envolvendo a área de interface epitélio/ovócito.

Considerando a região do epitélio folicular, em contato com o ovócito (Figura 4), observam-se espaços intercelulares restritos à área do ovócito (Figura 1). Na Figura 5

é mostrado, de forma ampliada, o material floculento encontrado nesses espaços.

Na região da interface ovócito/células foliculares pode-se observar o processo de formação dos grãos de proteínas (Figuras 6 e 7). Nessa região existe uma grande diferenciação nas membranas celulares de ambas as células e, à medida que a vitelogênese se inicia, aparecem dobras na membrana plasmática do ovócito, as quais se interdigitam com as das foliculares, aumentando assim a superfície de contato entre elas (Figura 7). São frequentes as invaginações com conteúdo eletrodenso (Figura 6) e observam-se também microvilosidades formando uma verdadeira malha ao longo de toda a região de contato. Essas microvilosidades se estendem da superfície do ovário (Figura 7) e vesículas revestidas (**coated vesicles**), originadas no fundo dessas microvilosidades, coroam o córtex do ovócito. A fusão dessas vesículas pinocíticas, contendo material eletrodenso, origina os grânulos de proteínas.

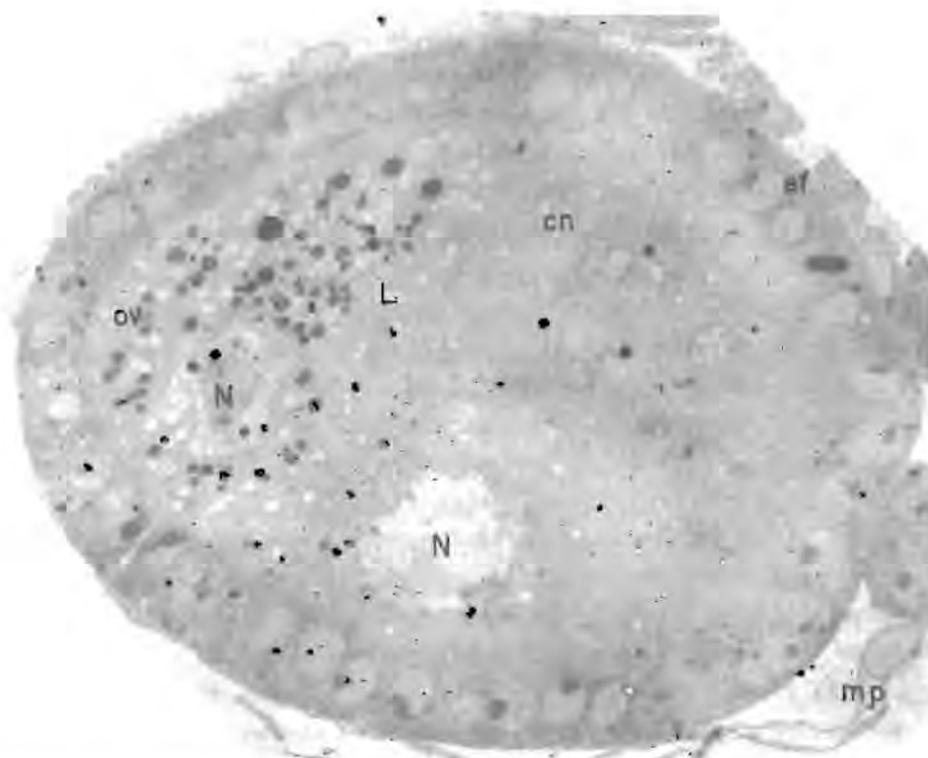


Fig. 1. Fotomicrografia de um folículo fixado 24 horas após alimentação sangüínea, onde aparece uma célula nutridora (cn), o ovócito (ov), envolvidos pelo epitélio folicular (ef). A célula nutridora é caracterizada pela presença de um citoplasma granular e um núcleo desenvolvido (N), enquanto que a presença de grãos de lipídeos (L), grãos densos (P), núcleo irregular (N) são típicos de ovócito em estágio de maturação. Ao redor do folículo aparece a membrana peritoneal (mp). 2.450 X.

Esses grânulos apresentam conteúdo muito eletrodensso com um halo claro ao redor, pois a membrana que os envolve se acha afastada (Figura 7).

O conteúdo do grânulo assume uma configuração cristalina, quando maduro, (maturação com 48 horas) e apresenta diferentes orientações, provavelmente devida à união de pequenos grânulos que se cristalizam após a fusão, conforme evidências verificadas na Figura 8. O grânulo protéico totalmente maduro resulta dessas fusões, o que fica evidenciado pelas diferentes orientações encontradas no grânulo em uma única secção que toma o aspecto de uma bola de futebol (Figura 9).

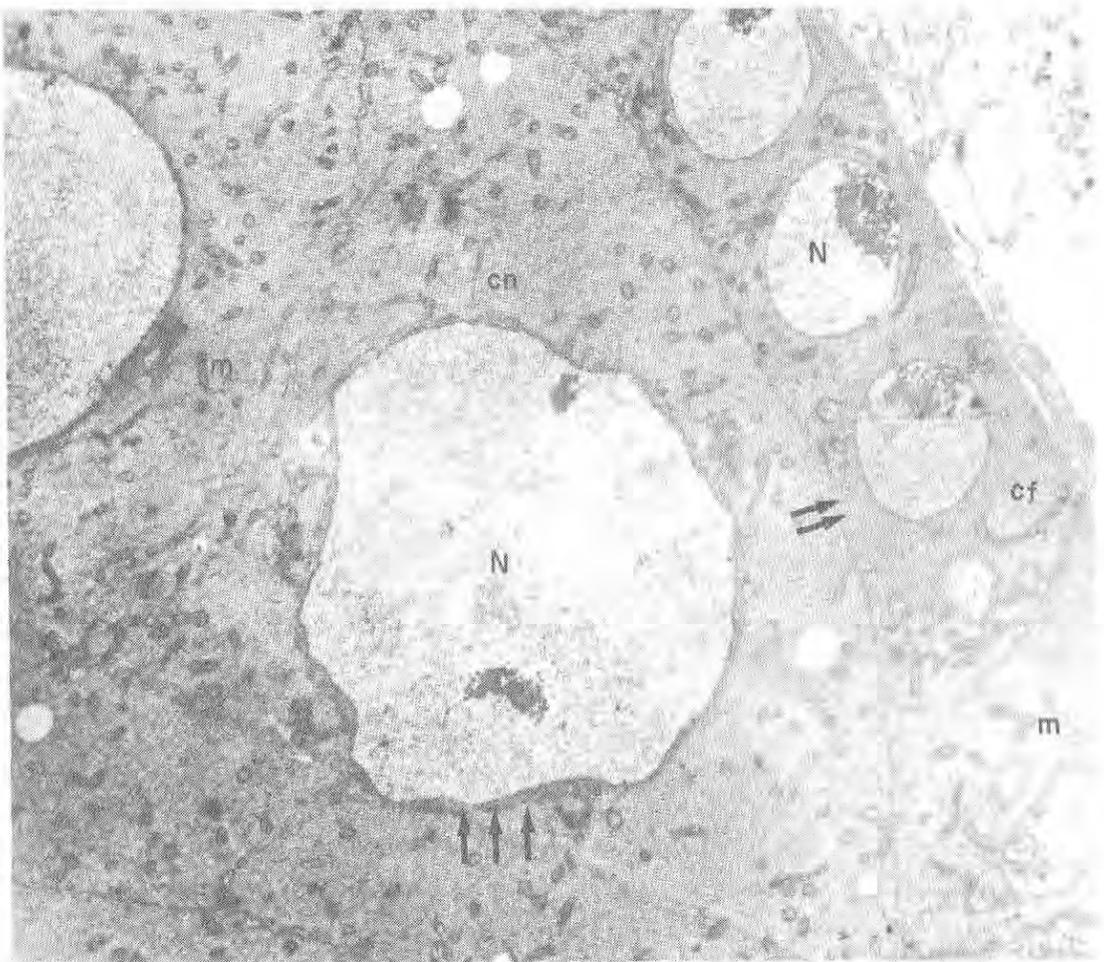


Fig. 2. Fotomicrografia de célula nutridora (cn) em contato (setas duplas) com células foliculares (cf) mostrando seus núcleos (N) desenvolvidos, indicando produção de RNA. Nas células nutridoras o material é eliminado para o citoplasma (setas triplas). Mitocôndrias (m). 8.100 X.

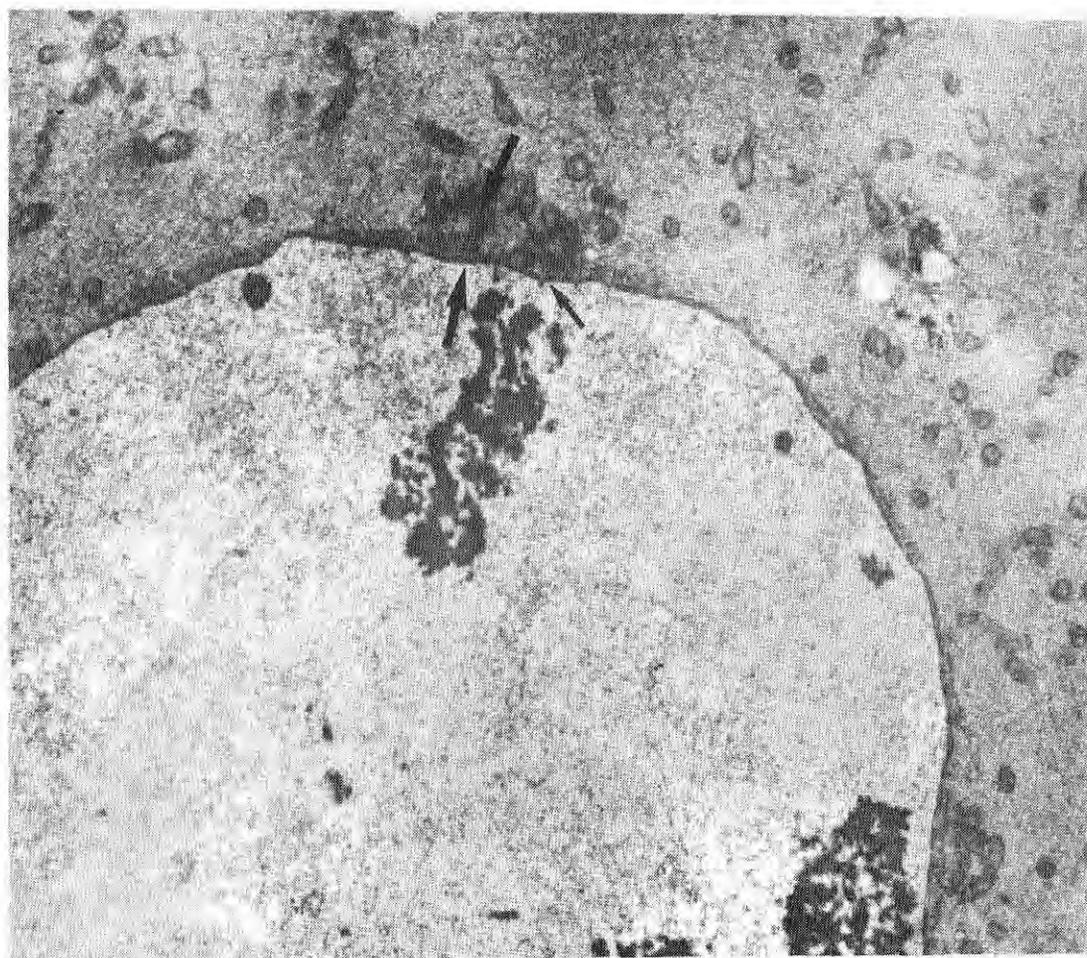


Fig. 3. Fotomicrografia com aumento maior de uma célula nutridora mostrando a passagem do material produzido no núcleo para o citoplasma. 14.100 X.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos insetos existem duas maneiras pelas quais as proteínas podem ser obtidas pelo ovócito. Na primeira, exôgena, as proteínas são sintetizadas no corpo gorduroso e são transportadas pela hemolinfa até o ovócito, como demonstrado em vários insetos: *Aedes* (Roth & Porter, 1964; Hagedorn et al., 1973), *Periplaneta* (Anderson, 1964), *Panorpa* (Bier & Ramamurty, 1964), *Platysamia cecropia* (Telfer, 1954), *Lygeus kalmii* (Kessel & Beams, 1962), *Hyalophora cecropia* (Stay, 1965), *Schistocerca* (Hill, 1962), *Lepismachilis* (Bitsch, 1980). No segundo caso, o processo é endôgeno e as proteínas são sintetizadas pelo próprio citoplasma do ovócito como ficou evidenciado nos estudos de Cummings & King (1970), em *Drosophila*, e em *Hyalophora* e *Rhodnius* por Telfer et al. (1982). Em *Bombyx terrestris* o processo é intraovariano, mas não endôgeno (isto é no interior do ovócito), pois a formação das proteínas ocorre nas células foliculares (Hopkins & King, 1966). Assim, com base

nas evidências aqui apresentadas, em **Anopheles** a obtenção das proteínas provavelmente ocorre por um processo exógeno, conforme as indicações morfológicas obtidas. Considerando essas evidências, a formação dos grânulos de proteínas no citoplasma do ovócito ocorre por pinocitose de substâncias presentes na hemolinfa e carregadas através dos espaços intercelulares das células foliculares, como na maioria dos insetos. Não está descartada a possibilidade das células foliculares terem algum papel na vitelogênese, visto o aspecto de seus núcleos e nucléolos e as interrelações com os ovócitos. Em uma primeira fase de formação das vesículas, o material eletrodense exógeno se acumula no lado externo do ovócito e, posteriormente, avança por invaginações para o interior do mesmo. O estrangulamento dessas projeções dá origem às vesículas revestidas, possivelmente, em um mecanismo semelhante ao verificado por Ma & Ramaswamy (1987) em **Lygus lineolaris**. O material eletrodense é incorporado em vesículas maiores até originar os grânulos proteicos.

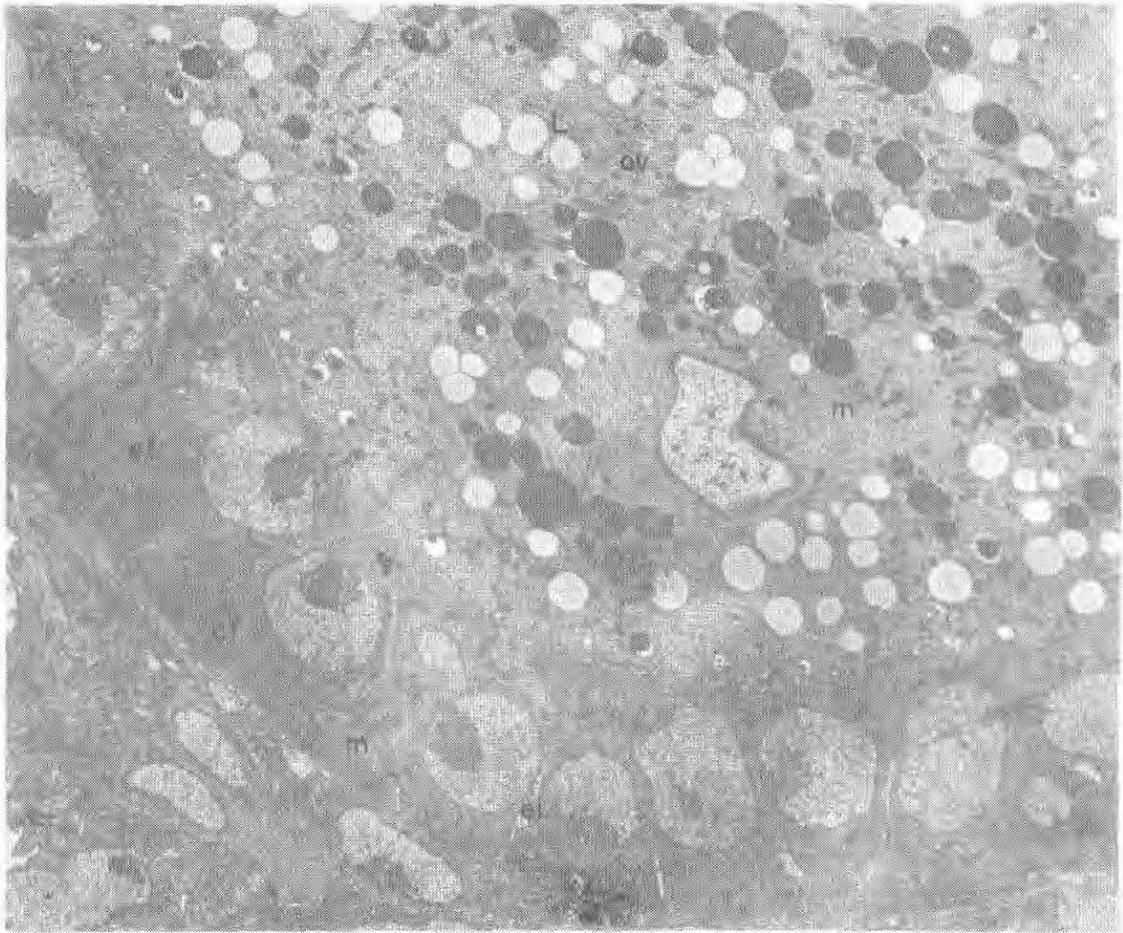


Fig. 4. Fotomicrografia mostrando parte do epitélio folicular (ef) associada ao ovócito (ov). As células foliculares (cf) são separadas pelo espaço intercelular (ei). O ovócito apresenta grânulos de lipídeos (L) e mitocôndrias (m). 5.400 X.

Segundo a literatura, canais extracelulares entre as células foliculares podem ocasionar um fácil acesso de todo material externo da hemolinfa, que atravessa a membrana basal (lâmina própria do ovário), uma vez que já foi demonstrada a existência de precursores do vitelo fora do ovócito (Engels, 1974; Simões, 1980). Em *Anopheles* não foram observados espaços tão proeminentes como em *Aedes aegypti* (Roth & Porter, 1964) e *Hyalophora cecropia* (Stay, 1965), mas isso não significa a falta de acesso da vitelogenina da hemolinfa. Um fato que também corrobora a hipótese da passagem de material externo para o ovócito é que esses espaços não foram encontrados entre as células foliculares em contato com as células nutridoras (Figura 1). Em *Aedes*, esses espaços iniciam-se 7 horas após a alimentação sanguínea (Roth & Porter, 1964).

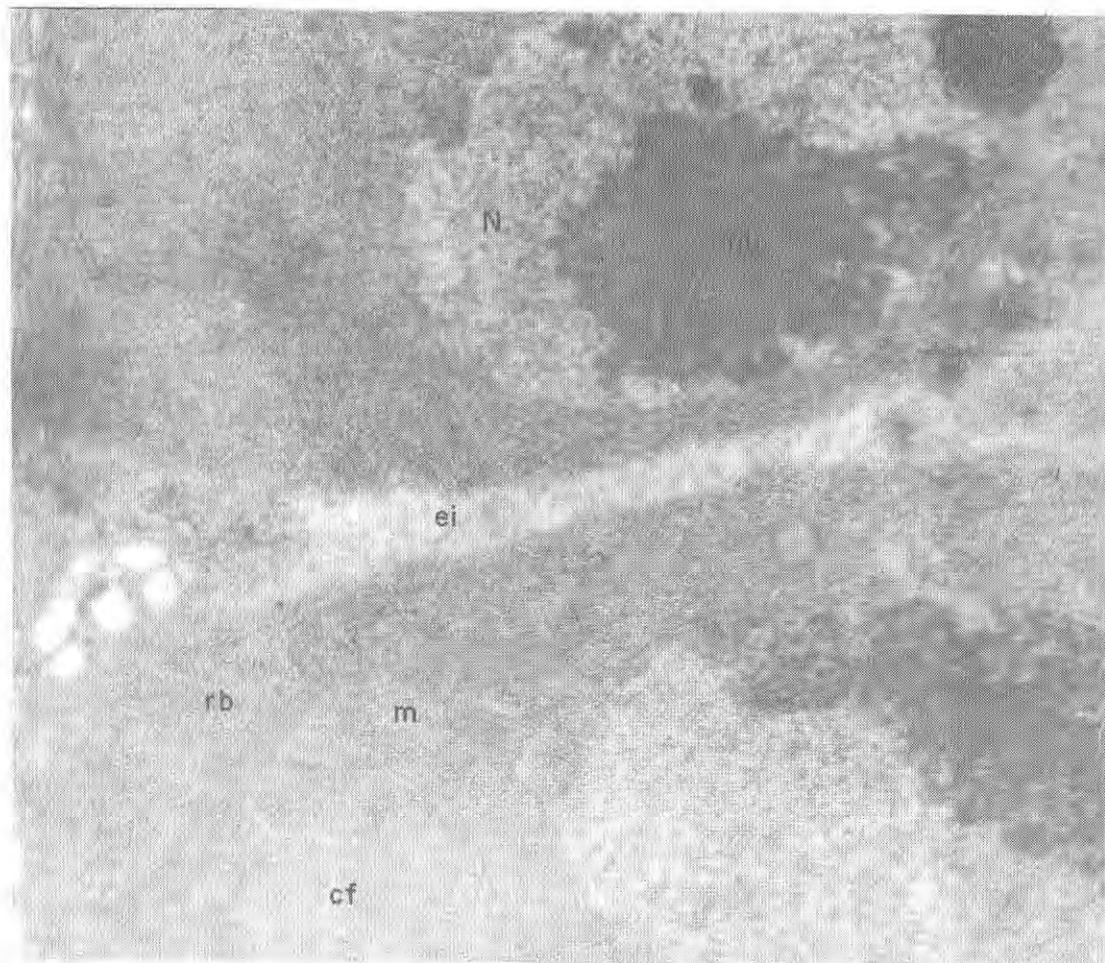


Fig. 5. Fotomicrografia detalhada da passagem do material flocculento para o ovócito pelo espaço intercelular (ei), entre as células foliculares (cf).

Núcleo (N); nucléolo (nu); ribossomos (rb); mitocôndrias (m); 37.800 X.

Após o repasto sanguíneo, conforme assinalam Hagedorn *et al.* (1973), o desenvolvimento do ovo pode ser regulado ao nível do corpo gorduroso, quando da síntese das vitelogeninas; e ao nível da incorporação das proteínas, pelo ovócito. Nesta óptica, a análise dos diferentes níveis de desenvolvimento do ovo torna-se relevante, pois proporciona dados sobre a evolução da reprodução do inseto, principal faceta interrelacionada com a transmissão da malária.

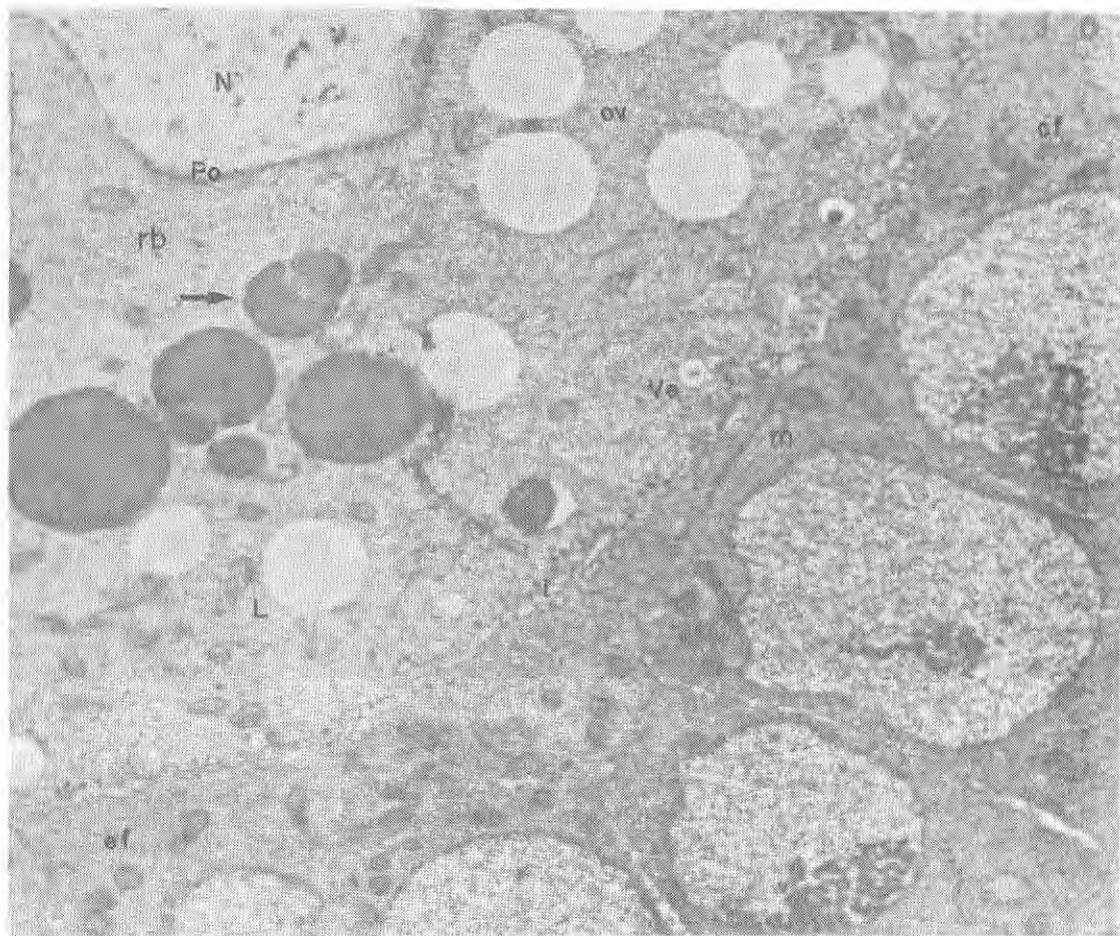


Fig. 6. Fotomicrografia da interface entre ovócito (ov) e epitélio folicular (ef). As células foliculares (cf) apresentam grande número de mitocôndrias (m) em seu citoplasma. O núcleo (N) do ovócito mostra o envelope nuclear com poros (Po). No contato entre células foliculares e ovócito são freqüentes invaginações (→) com conteúdo denso. Vesículas (ve) derivadas dessas invaginações coroam o córtex do ovócito (ov) e originam os grânulos protéicos através da fusão entre elas (seta). Lipídeos (L), mitocôndrias (m) e ribossomos (rb) também são encontrados no citoplasma do ovócito. 14.100 X.

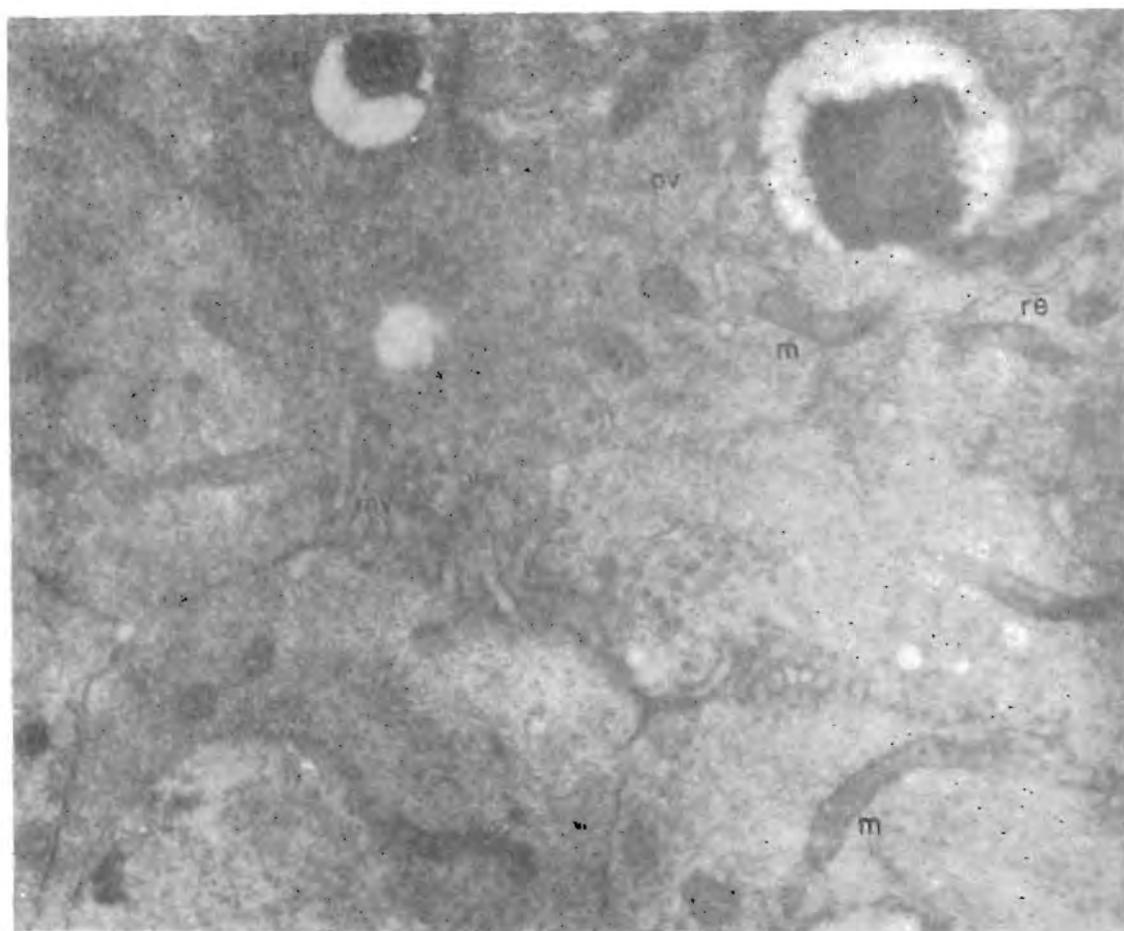


Fig. 7. Neste corte observam-se as microvilosidades que se estendem da superfície do ovócito. Entre as microvilosidades (mv) existem vários pequenos grânulos que originam vesículas (ve) que se fundem para formar grânulos protéicos (P). No citoplasma do ovócito (ov) observa-se o retículo endoplasmático (re) e mitocôndrias (m). 24.000 X.

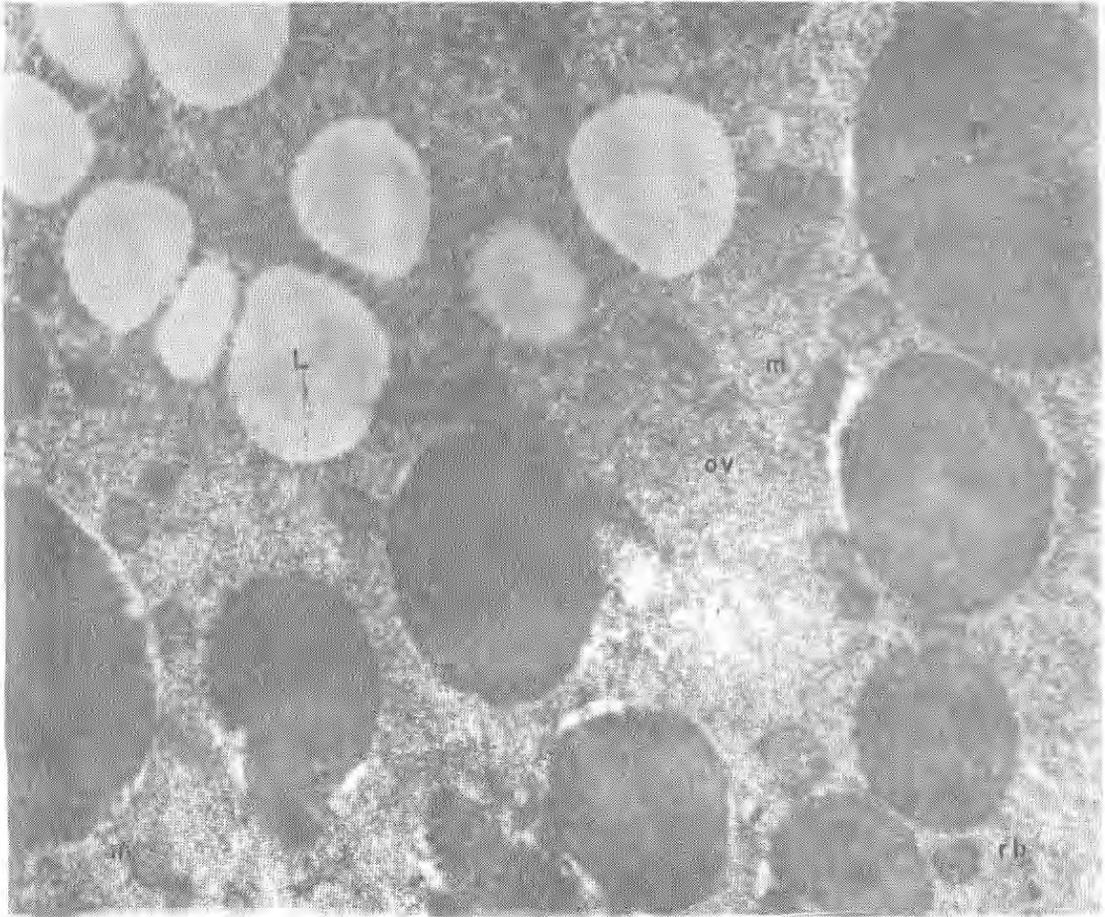


Fig. 8. Fotomicrografia mostrando a fusão dos grãos de proteína (P) no citoplasma do ovócito (ov), junto ao grãos de lipídeos (L). Maturação de 48 horas. Mitocôndrias (m) e Ribossomos (rb). 27.000 X.

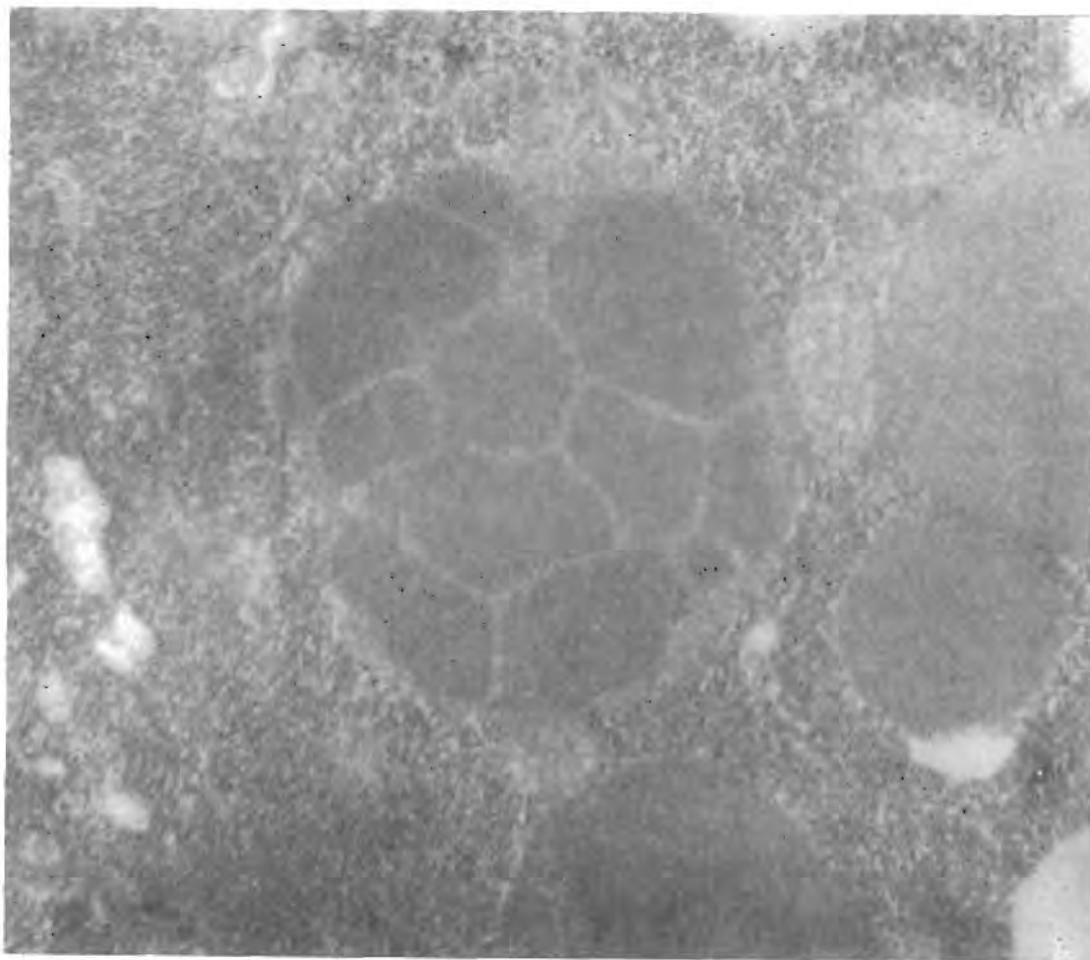


Fig. 9. Fotomicrografia mostrando em detalhe a configuração cristalina que o grânulo protéico assume, quando maduro. (maturação de 48 horas). 60.900 X.

SUMMARY

Ovaries of *Anopheles triannulatus* were dissected 24 h and 48 h after a bloodmeal in order to study its effect on oogenesis. Histological sections were analyzed by electron microscopy and the morphological changes occurring at the oocyte - follicular epithelium and follicular cell interface were observed. Structural aspects support the hypothesis that yolk proteins are produced outside the ovary. Proreine granules arise mainly by fusion of pit-vesicles formed at the oocyte surface.

Referências bibliográficas

- Anderson, E. - 1964. Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*. *J. Cell. Biol.*, 20:131.
- Anderson, L. M. & Telfer, W. H. - 1969. A follicle cell contribution to the spheres of moth oocytes. *Tissue and Cell*, 1:633-644.
- Bier, K. & Ramamurty, P. S. - 1964. Elektronoptische untersuchungen zur Einlagerung der Dotterprotein in die Oocyte. *Naturwissenschaften*, 51:223.
- Bitsch, J. - 1980. Ultrastructure des ovocytes et vitellogenese chez *Lepimachilis targionii* (Grassi) (Thysanura: Machilidae). *Inst. J. Insect Morphol & Embryol.*, 9:297-313.
- Brooks, V. J. - 1969. The induction of yolk synthesis in fat body of an insect, *Leucophaea maderae*, by a analog of the juvenile hormone. *Develop. Biol.*, 20:459-471.
- - 1976. Protein synthesis in fat body of *Leucophaea maderae* during vitellogenesis. *J. Insect. Physiol.*, 22:1649-1657.
- Christophers, S. R. - 1911. The development of the egg follicle in anophelines, *Paludism*, 2:73-89.
- Cummings, M. R. & King, R. C. - 1970. The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Ultrastructural investigations on the origin of the protein yolk spheres. *J. Morphol.*, 130:467-477.
- Engelmann, F. - 1969. Female specific protein biosynthesis controlled by corpus allatum in *Leucophaea maderae*. *Science*, 105:407-409.
- - 1971. Juvenile hormone - controlled synthesis by female specific protein in the cockroach *Leucophaea maderae*. *Arch. Biochem. Biophys*, 145:439-447.
- Engels, W. - 1974. Occurrence and significance of vitellogenin in female castes of social Hymenoptera. *Amer. Zool.*, 14:1229-1237.
- Guelin, M. & Durand, M. - 1980. Evolution des cellules nourricières au cours de l'ovogenèse chez *Ephestia kukniella* Z. (Insecte, Lépidoptère). *Ann. Scien. Nat., Zoologie*, Paris, 13(2):167-207.
- Hagedorn, H. H.; Falton, A. M.; Laufer, H. - 1973. Vitellogenin synthesis by the fat body of the mosquito *Aedes aegypti*: evidence for transcriptional control. *Develop. Biol.*, 31:285-294.
- Hagedorn, H. H. & Judson, C. L. - 1972. Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk protein. *J. Exp. Zool.*, 182:367-378.
- Hill, L. - 1962. Neurosecretory control of hemolymph protein concentration during ovarian development in the desert locust. *J. Insect Physiol.*, 8:609-621.
- Hopkins, C. R. & King, P. E. - 1966. An electron microscopical and histochemical study of the oocyte periphery in *Bombyx terrestris* during vitellogenesis. *J. Cell. Sci.*, 1: 201-216.
- Kessel, R. G. & Beams, H. W. - 1962. Micropinocytosis and yolk formation in oocytes of the small milkweed bug. *Exp. Cell. Research.*, 30:440.
- Ma, W. K. & Ramaswamy, B. - 1987. Histological changes during ovarian maturation in the tarnished plant bug, *Lygus lincolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae). *J. of Insect Morphology & Embriology*, 16(5/6):309-322.

- Mer, G. G. - 1936. Experimental study on the development of the ovary in *A. elutus* Edw. (Dip. Culic.). **Bull. Entom. Res.**, 27:351-356.
- Reynolds, E. F. - 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, 17:208-212.
- Roth, T. F. & Porter, K. R. - 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* (L.). **J. Cell Biol.**, 20(2):313-332.
- Shigematsu, H. - 1958. Synthesis of blood protein by the fat body in silkworm, *Bombyx mori* L. **Nature**, 182:880-882.
- - 1960. Protein metabolism in the fat body of the silkworm *Bombyx mori* L. **Bull. Sericult. Expt. Sta. Japan**, 16:141-170.
- Simões, Z. L. P. - 1980. *Estudo de vitelogenina e da vitelina em Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apoidea)*. Tese de doutoramento apresentada à Fac. Med. (USP) Ribeirão Preto. SP. 108 p.
- Stay, B. - 1965. Protein uptake in the oocyte of the cecropia moth. **J. Cell Biol.**, 26(1):49-62.
- Telfer, W. H.; Huebner, E.; Smith, D. S. - 1982. The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius*. In: **Insect ultrastructure**. King, R. C. & Akai, H. (eds.). Plenum Press, New-York. 1:118-149.
- Telfer, W. H. - 1954. Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited female protein in egg formation by the cecropia silkworm. **J. Gen. Physiol.**, 37:539-558.
- - 1960. The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moth. **Biol. Bull.**, 118:338-351.
- - 1965. The mechanism and control of yolk formation. **Ann. Rev. Entomol.**, 10:161-184.
- Wigglesworth, V. B. - 1943. The fate of hemoglobin in *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. **Proc. R. Soc. (London), Ser. B**, 131:313-339.

(Aceito para publicação em 05.11.1988)