

Efectos de la hormona juvenil sobre la vitelogénesis de *Spilostethus pandurus* (Hemiptera: Heteroptera)

P. Ibáñez, M. D. Garcerá*, E. Alcácer y R. Martínez

Departamento de Biología Animal
Unidad de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Valencia
46100 Burjassot, Valencia (España)

(Recibido el 17 de agosto de 1992)

P. IBÁÑEZ, M. D. GARCERÁ, E. ALCÁCER and R. MARTÍNEZ. *Juvenile Hormone Effects on Spilostethus pandurus (Hemiptera: Heteroptera) Vitellogenesis*. Rev. esp. Fisiol., 49 (2), 87-92, 1993.

The effects of juvenile hormone (JH) on the control of vitellogenin appearance in the haemolymph of *Spilostethus pandurus* newly emerged females have been studied as well as their intake by developing oocytes. SDS-PAGE electrophoresis has been used as an analytical method for protein studies. JH induced early detection of vitellogenins in the haemolymph of treated insects and their accelerated incorporation by undeveloped ovaries. The results suggest that JH plays an essential role as a gonadotrophic agent, just as it has been described for other insect species.

Key words: Juvenile hormone, Vitellogenesis, *Spilostethus pandurus*, SDS-PAGE.

Las vitelogeninas, precursoras de la proteína principal de la yema en insectos, se sintetizan en el cuerpo graso y pasan a la hemolinfa, desde donde las incorporan los ovarios para convertirlas en una forma almacenada, las vitelinas (7, 8). Numerosos estudios demuestran que la formación de la yema (22) y, específicamente, la síntesis de vitelogeninas (7, 8) están controladas hormonalmente en muchos insectos, existiendo pruebas de que estos estímulos hormonales son también necesarios para la

posterior incorporación de las vitelogeninas por los ovarios (1, 5).

En *Oncopeltus fasciatus*, especie muy emparentada con *Spilostethus pandurus*, la síntesis e incorporación de las vitelogeninas y el desarrollo de los ovarios está bajo la influencia de la hormona juvenil (HJ) (13, 14, 17, 19).

En un trabajo previo (12) se detectaron, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), tres fracciones proteicas específicas de hembras en la hemolinfa de insectos adultos de *S. pandurus*, a las que se denominó I, II y III. En los ovarios se ob-

* A quien debe dirigirse la correspondencia. (Tel.: 96-386 46 01. Fax: 96-386 43 72).

servaron tres fracciones proteicas, 4, 5 y 6, con pesos moleculares similares a las específicas de hembras hemolinfáticas. En el mismo trabajo se estudió el efecto de la HJ y del precoceno II (PII) sobre el contenido proteico de las tres fracciones hemolinfáticas y ováricas, viéndose que el PII inhibía la síntesis de las proteínas específicas de hembras, así como su posterior incorporación por los ovarios. Se observó que las fracciones específicas de hembras presentaban, en general, un contenido proteico superior en las hembras tratadas con HJ que en las controles.

En un trabajo posterior (11) se demostró el carácter vitelogénico de estas proteínas específicas de hembras mediante las correspondientes pruebas inmunológicas y de marcaje radiactivo a corto plazo. Se observó que las fracciones hemolinfáticas específicas de hembras (I, II y III), corresponden a las vitelogeninas, y que las 4, 5 y 6 ováricas corresponden, a su vez, a las vitelinas de *S. pandurus*.

En el presente trabajo se estudia el efecto de la HJ sobre el momento de aparición de las vitelogeninas en la hemolinfa de hembras adultas, así como el tiempo de su incorporación por parte de los ovarios en desarrollo.

Material y Métodos

Insectos. — Los ejemplares de *Spilostethus pandurus* se han criado en el laboratorio a 27 ± 2 °C, 60-65 % de humedad relativa y 16 h de luz y 8 de oscuridad. Se han alimentado con semillas de girasol peladas y se les ha suministrado agua *ad libitum* en tubos de cristal tapados con algodón.

Tratamientos. — Las hembras adultas (0-24 h) se han tratado tópicamente en el abdomen con 1 µl de una solución de HJ en acetona (100 µg/µl). Paralelamente, se han realizado ensayos controles aplicando únicamente 1 µl de acetona.

Para la realización de los experimentos

se ha extraído la hemolinfa de hembras sacrificadas a las 12, 24, 36, 48, 72 y 144 h después del tratamiento con HJ. Los ovarios, obtenidos de las mismas hembras, se extrajeron a las 48, 72 y 144 horas tras el tratamiento. En el caso de los insectos controles, las muestras se han obtenido a los mismos tiempos que los experimentales. Las 144 h, edad máxima estudiada, corresponden al momento en que se inicia la puesta.

Todos los experimentos se han repetido tres veces. Las muestras correspondientes a cada una de las réplicas constituyen un *pool* de acuerdo con cada una de las categorías de edad descritas. Cada *pool* estuvo formado por un número de insectos que osciló entre 10 y 15. En total se utilizaron, aproximadamente, 500 insectos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

— Preparación de las muestras: La hemolinfa y los ovarios se han obtenido y diluido como se ha descrito (12). Todas las muestras se han hervido durante 5 min en el medio de Semancik (21), conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS). Posteriormente, se han almacenado a -20 °C.

Las electroforesis se han realizado en geles de acrilamida al 9 % con SDS, a una corriente constante de 20 mA y a 4 °C, según las condiciones descritas por CONEJERO y SEMANCIK (3). Seguidamente los geles se han fijado y teñido según la técnica descrita por IBÁÑEZ *et al.* (12).

Los geles se han analizado en un densitómetro Ultra Scan Lasser LKB 2202, equipado con una unidad de proceso de datos 3390A Reporting Integrator (Hewlett Packard). La intensidad de las bandas detectadas se expresa como unidades arbitrarias (u.a.) relativas en función de la lectura proporcionada por el densitómetro.

Resultados

En las electroforesis de las hemolinfas de las hembras controles y tratadas con

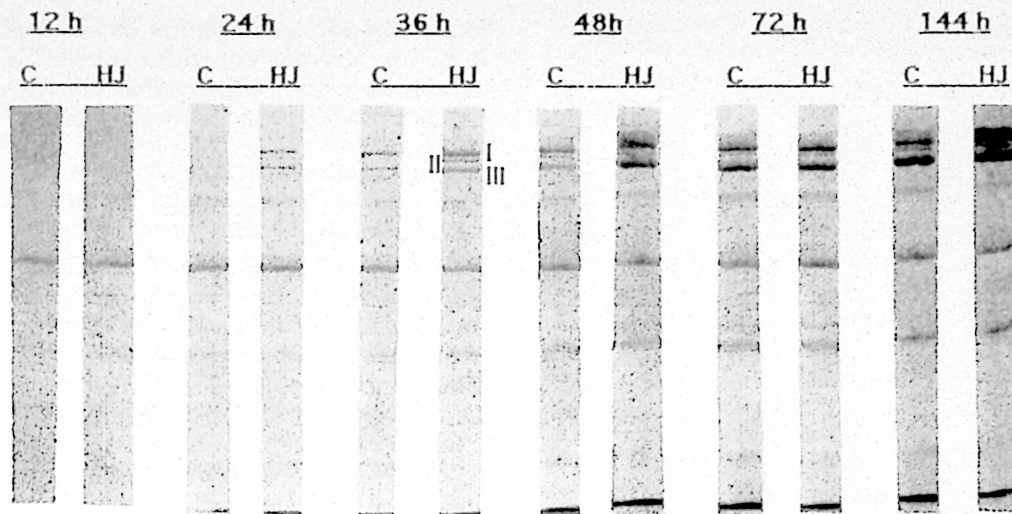


Fig. 1. Electroforesis de hemolinfa de hembras de *S. pandurus* controles (C) y tratadas con hormona juvenil (HJ).

Las muestras se han extraído a las 12, 24, 36, 48, 72 y 144 horas de edad. I, II y III indican las vitelogeninas.

HJ, cuya muestra se obtuvo a las 12, 24, 36, 48, 72 y 144 horas después del tratamiento (fig. 1), a las 12 horas no aparecen las vitelogeninas. Sí se observan estas tres fracciones vitelogénicas (I, II y III), con un contenido proteico muy bajo, en los animales tratados de 24 horas de edad.

A las 36 horas tras el tratamiento se detectan las vitelogeninas en las muestras control y experimental (fig. 1), siendo el contenido proteico, aproximadamente, cuatro veces superior en los insectos tratados ($2,8 \times 10^6$; $1,1 \times 10^6$ y $4,0 \times 10^6$ u.a. para las vitelogeninas I, II y III, respectivamente, de animales controles, frente a $8,1 \times 10^6$; $3,05 \times 10^6$ y $16,5 \times 10^6$ u.a. para las mismas vitelogeninas de insectos tratados).

A las 48 horas, las hemolinfa de las hembras controles muestra las tres vitelogeninas (fig. 1), siendo su contenido proteico notablemente mayor que a la edad anterior, y muy parecido al de las hembras tratadas de 36 horas, a excepción de la vitelogenina II (fig. 1). En la he-

molinfia de los animales tratados también aumenta considerablemente el contenido proteico con respecto a los tratados de las edades anteriores. Asimismo, se observa una gran diferencia en el contenido proteico entre ambas muestras, control y experimental, de esta misma edad (fig. 1).

A las 72 horas del tratamiento, las diferencias en la cantidad de proteína de los animales tratados con respecto a los controles no son tan acusadas como las observadas a las 36 y 48 horas, mientras que a las 144 horas del tratamiento estos valores son bastante semejantes.

Se puede afirmar que la HJ acelera la aparición de las vitelogeninas en la hemolinfa, detectándose éstas a las 24 horas en los animales tratados y 12 horas después en los controles. Su proporción, con respecto a las del resto de su carrera electroforética, aumenta a medida que se alcanza la madurez del animal, detectándose tenuemente a las primeras edades estudiadas y pasando, posteriormente, a ser las proteínas mayoritarias de la carrera.

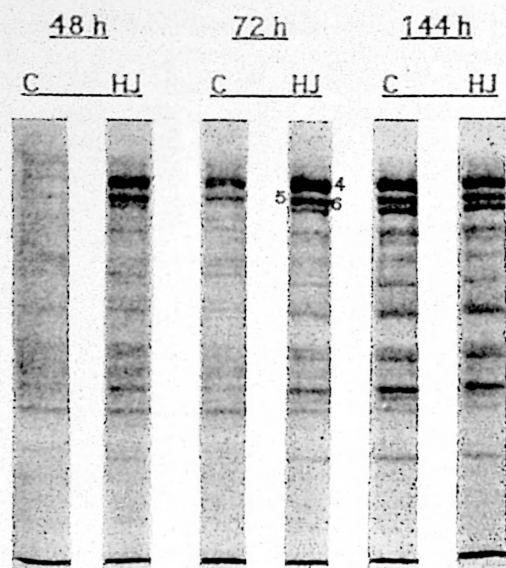


Fig. 2. Electroforesis de ovarios de hembras controles (C) y tratadas con hormona juvenil (HJ). Las muestras se han extraído a las 48, 72 y 144 horas de edad. 4, 5 y 6 indican las vitelinas.

En los ovarios se detectan las tres vitelinas (4, 5 y 6) en ambos tipos de muestras, pero hay diferencias en cuanto a su incorporación por aquéllos (fig. 2).

A las 48 horas tras el tratamiento sólo se detectan las vitelinas en las muestras de hembras tratadas. A las 72 horas del tratamiento se aprecian las vitelinas en los ovarios de las hembras controles, pero el contenido proteico es inferior al encontrado en los animales tratados de su misma edad, e incluso inferior al hallado en los animales tratados de 48 horas (fig. 2).

A las 144 horas se observa un gran incremento en el contenido proteico de las vitelinas de hembras control, manteniéndose, no obstante, las diferencias con respecto a los tratados, aunque éstas no son tan acusadas como a las edades de 48 y 72 horas (fig. 2).

El tratamiento provoca un adelanto de 24 horas en la incorporación de las vite-

logeninas por parte de los ovarios. Además, los insectos controles presentan un contenido proteico menor al encontrado en los tratados de la misma edad.

Discusión

Se estudian los efectos de la aplicación exógena de HJ sobre hembras previtelogénicas, en lo referente a la aparición en hemolinfa de las proteínas específicas de hembra y su posterior incorporación por los ovarios. Dichas proteínas hemolinfáticas se corresponden con las vitelogeninas de la especie (11). Por ello, el conocimiento de los efectos de la HJ sobre la aparición de las proteínas en la hemolinfa, y su incorporación por los oocitos en desarrollo, es de gran importancia, puesto que revela un papel gonadotrófico para esta hormona, similar al descrito en otras especies de insectos (4, 8, 9, 15).

El acortamiento en una tercera parte del tiempo de aparición de las vitelogeninas en las hembras expuestas a la hormona (fig. 1) podría considerarse significativo, puesto que la intensidad de estas bandas en las carreras electroforéticas es grande, comparable a la de las bandas presentes en carreras control del siguiente grupo de edad estudiado.

Sin embargo, la respuesta al tratamiento de cada una de las vitelogeninas es característica. En los animales tratados y en los controles, la vitelogenina I parece ser más abundante en los animales de 24 y 36 horas, para disminuir su cantidad relativa y ser la banda III mayoritaria en los insectos más maduros (fig. 1). Este paralelismo indica claramente que la aceleración debida al tratamiento es un mimetismo exacto del proceso desarrollado en los controles por la hormona natural, toda vez que las diferencias se pierden a medida que transcurre el tiempo (fig. 1). Así, las mayores diferencias se aprecian a las 48 horas, desapareciendo, prácticamente, a las 144.

En los ovarios, los fenómenos obser-

vados tras el tratamiento son paralelos a los descritos en la hemolinfa. Sin embargo, los desfases son mayores (fig. 2), probablemente, porque como ocurre en otras especies de insectos (2, 10, 15, 18), es necesario que transcurra un cierto tiempo desde que las vitelogeninas aparecen en la hemolinfa hasta que los ovarios son capaces de incorporarlas. Esto podría explicarse si, como en otros insectos (6, 15, 23, 24), se acepta el papel gonadotrófico de la HJ.

Los tratamientos descritos se han realizado a dosis claramente farmacológicas (100 µg de HJ/insecto) por lo que los efectos hormonales han podido centrarse, simultáneamente, tanto en la producción de las proteínas como en su incorporación por los ovarios. La mayor diferencia de tiempo encontrada en la incorporación de las vitelogeninas por parte de los ovarios controles quedaría así explicada por el mayor lapso temporal que requerirían hasta alcanzar los niveles hormonales necesarios para que se produzca la respuesta ovárica. Niveles que habrían podido ser alcanzados casi inmediatamente por los insectos tratados. El que las diferencias tienden a desaparecer en los últimos periodos estudiados, incluso más rápidamente que en la hemolinfa, apoyaría esta explicación.

Estos resultados sugieren, por tanto, un papel para la HJ como hormona gonadotrofa necesaria para la inducción de la síntesis de vitelogeninas y su aparición en hemolinfa, así como para que dichas proteínas puedan ser incorporadas por los oocitos en desarrollo, tal como se ha demostrado en otras especies (14, 16, 18, 20).

Agradecimientos

Los autores agradecen a la «Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana» la concesión de una beca predoctoral a P. Ibáñez. Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo financiero de la «Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología» (PB 85-216). Asimismo agradecemos a

la «Comisión de las Comunidades Europeas» el apoyo financiero facilitado dentro del programa STD II (TS-2-0264-B).

Resumen

Se estudian los efectos de la hormona juvenil (HJ) sobre la aparición de las vitelogeninas en la hemolinfa de hembras recién emergidas de *Spilostethus pandurus*, y la incorporación de esas proteínas por parte de los oocitos en desarrollo. Las hembras se tratan con una dosis (100 µg) de HJ exógena, y se analiza la aparición de las vitelogeninas en la hemolinfa, y de las vitelinas en los ovarios, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La HJ induce una aceleración en la aparición de las vitelogeninas en hemolinfa, disminuyendo también el tiempo de detección de las vitelinas en los ovarios. Estos resultados sugieren un papel gonadotrófico de la HJ en esta especie, de forma similar a la descrita para otras especies de insectos.

Palabras clave: Hormona juvenil, Vitelogénesis, *Spilostethus pandurus*, SDS-PAGE.

Bibliografía

1. Bell, W. J. y Barth, R. H.: *Nature*, 230, 220-221, 1971.
2. Ben Hamouda, M. H. y Barbouche, N.: *Archs. Inst. Pasteur Tunis*, 64, 363-375, 1987.
3. Conejero, V. y Semancik, J.S.: *Phytopathology*, 67, 1424-1426, 1977.
4. Chen, T. T., Couble, P., Abu-Hakima, R. y Wyatt, G. R.: *Dev. Biol.*, 69, 59-72, 1979.
5. Davey, K. G.: *Am. Zool.*, 21, 701-705, 1981.
6. Dittmann, F., Trenczek, T. y Kleemann-Stumpf, I.: *J. Insect Physiol.*, 9, 729-739, 1985.
7. Engelmann, F.: *Adv. Insect Physiol.*, 14, 49-108, 1979.
8. Hagedorn, H. H. y Kunkel, J.G.: *Ann. Rev. Ent.*, 24, 475-505, 1979.
9. Huybrechts, R. y De Loof, A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 72 B, 339-344, 1982.
10. Hwang, M. S. y Choi, W. C.: *Korean J. Zool.*, 32, 337-350, 1989.
11. Ibáñez, P., Garcerá, M. D., Alcácer, E., Co-

- nill, F. y Martínez, R.: *J. Insect Physiol.*, 38, 267-275, 1992.
12. Ibáñez, P., Garcerá, M.D.; Gavara, A. y Martínez, R.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 88, 1157-1161, 1987.
13. Johansson, A. A.: *Nytt. Mag. Zool. (Oslo)*, 7, 1-132, 1958.
14. Kelly, T. J. y Davenport, R.: *J. Insect Physiol.*, 22, 1381-1393, 1976.
15. Kempa-Tomm, S.; Hoffmann, K. H. y Engelmann, F.: *Physiol. Entomol.*, 15, 167-178, 1990.
16. Kindle, H., König, R. y Lanzrein, B.: *J. Insect Physiol.*, 34, 541-548, 1988.
17. Martínez, T. y Garcerá, M. D.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 6, 49-58, 1987.
18. Peferoen, M. y De Loof, A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B, 251-254, 1986.
19. Rankin, M. A. y Riddiford, L.: *J. Insect Physiol.*, 24, 31-38, 1978.
20. Schmidt, G. H.: *Naturwissenschaften*, 77, 194-195, 1990.
21. Semancik, J. S., Conejero, V. y Gerhart, J.: *Virology*, 80, 218, 1977.
22. Telfer, W. H.: *Ann. Rev. Ent.*, 10, 161, 1965.
23. Weaver, R. J. y Pratt, G. E.: *J. Insect Physiol.*, 27, 75-83, 1981.
24. Wyatt, G. R., Dhadialla, T. S. y Roberts, P. E.: En «Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones». (J. Hoffmann y M. Porchet, eds.). Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 475-484.