

AL·LATOMODULADORS

Neuropèptids reguladors de la producció d'hormona juvenil en insectes

XAVIER BELLÉS I ROS

Membre de la Secció de Ciències Biològiques de l'Institut d'Estudis Catalans
Professor d'Investigació del Centre d'Investigació i Desenvolupament del
CSIC a Barcelona

SUMMARY

Juvenile hormones play important roles in insect physiology. Among others, they inhibit metamorphosis in preimaginal stages and induce vitellogenin synthesis in the adult. These processes require a finely tuned mechanism to control hormonal production, and this is achieved by peptidic hormones which inhibit (allatostatins) or stimulate (allatotropins) the *corpora allata*, i.e., the juvenile hormone producing glands. Techniques of purification and analysis have lead to the identification of 5 allatostatins in the cockroach *Diploptera punctata*, and 1 allatotropin and 1 allatostatin in the moth *Manduca sexta*. In the blowfly *Calliphora vomitoria* 5 peptides, which are similar in structure to *D. punctata* allatostatins, have been sequenced, although they do not inhibit juvenile hormone in this dipteran. This raises interesting questions about the different functions played by the same family of peptides in different insects. In addition to conventional identifications, molecular analysis has lead to study the allatostatin gene of *D. punctata* and that of *M. sexta* allatotropin. These molecular approaches, besides to afford new data concerning allatomodulation at specific level, can be especially useful to clarify the evolutionary aspects of these particular regulatory peptides in insects.

L'HORMONA JUVENIL, UN MISSATGER POLIVALENT

En els insectes, l'hormona juvenil exerceix nombroses funcions com, possem per cas, l'estimulació de la síntesi de proteïnes en les glàndules sexuals accessòries, la regulació de la diapausa, el manteniment del sistema de castes en insectes socials o la inducció de determinats processos durant l'embriogènesi. El paper més rellevant, però, l'exerceix en el marc de la metamorfosi i de la reproducció (vegeu, per exemple, Tobe i Stay, 1985; Bellés, 1988) (figura 1).

Durant el desenvolupament té una acció repressora de la metamorfosi, de tal manera que mentre hi ha nivells significatius d'aquesta hormona circulant, les mudes es produeixen en el sentit larva-larva. Així, la muda a adult tan sols es dona quan hi ha nivells molt baixos (o nuls) d'aquesta hormona. La davallada d'hormona juvenil que hom detecta a l'hemolimfa abans de la metamorfosi ve

determinada, sobretot, per una disminució de la velocitat de producció hormonal, i també per un increment dels nivells dels enzims encarregats de metabolitzar-la.

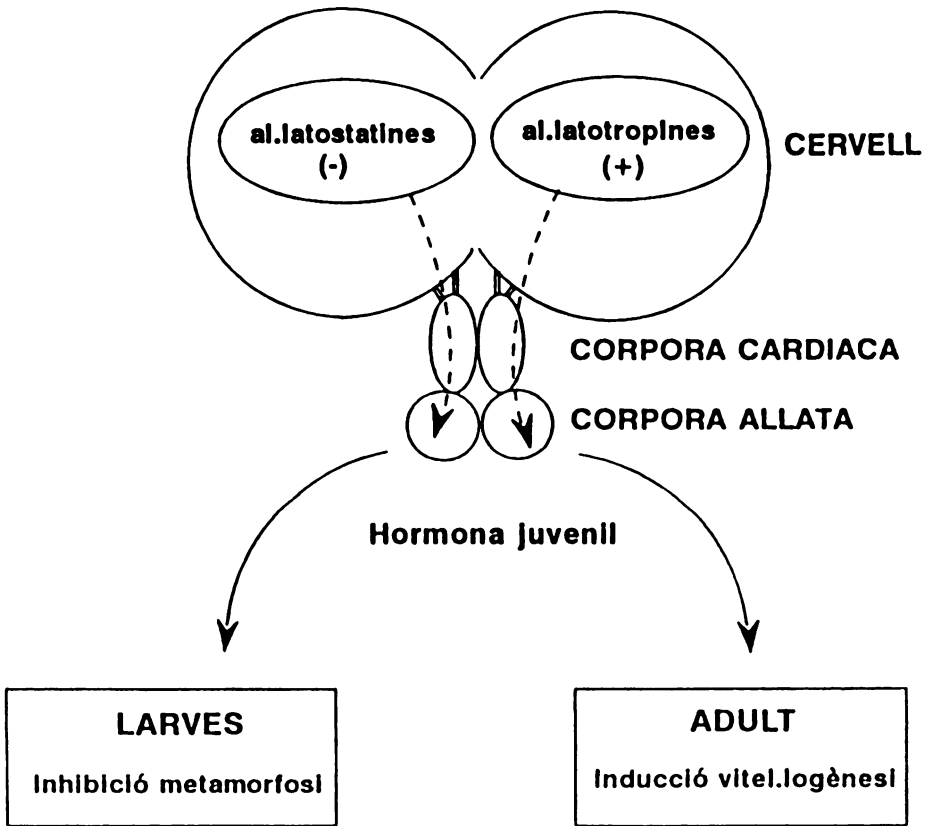


FIGURA 1. L'hormona juvenil produïda en els *corpora allata* regula la metamorfosi i la reproducció. Alhora, la producció d'hormona juvenil és regulada per pèptids cerebrals que inhibeixen (al·latostatines) o estimulen (al·latotropines) l'activitat dels *corpora allata*.

En la reproducció de la major part d'espècies d'insectes, la funció primordial de l'hormona juvenil és induir la síntesi de vitel·logenines en el cos gras. Alhora, també induïx l'aparició d'espais entre les cèl·lules fol·liculars qu'envolten l'òcit, la qual cosa facilita la incorporació de les vitel·logenines circulants. Com era d'esperar, hom ha demostrat en nombroses espècies d'insectes que el perfil de síntesi d'hormona juvenil és paral·lel al de creixement dels oòcits.

D'ençà que V. B. Wigglesworth descobrí aquesta hormona a la dècada del 1940, la informació obtinguda sobre ella ha estat considerable. Ben aviat hom demostrà que era produïda a les glàndules anomenades *corpora allata*, que a través dels *corpora cardiaca* (òrgans emmagatzemadors d'hormones cerebrals) connecten amb el cervell. L'any 1967, hom identificà la primera hormona juvenil com el (2E, 6E, 10R, 11S)-10,11-epoxi-7-etil-3,11-dimetil-2,6-tridecadienoat de metil, a la qual en seguiren cinc més d'estructura sesquiterpenoide molt similar, trobades en diferents espècies. La identificació de les primeres estructures donà un nou impuls a la recerca, de tal manera que hom disposa ara d'un cos d'informació remarcable sobre la biosíntesi, els mecanismes d'acció i els sistemes de degradació d'aquestes hormones (vegeu Kerkut i Gilbert, 1985). Quant a la regulació de la producció hormonal, hom ha aplegat també un considerable nombre de dades, però les primeres identificacions d'agents reguladors, d'origen cerebral, han estat descrites fa molt poc. Aquesta informació estructural fa que el tema de la regulació cobri un nou impuls, de manera similar a allò que representà la identificació de la primera hormona juvenil l'any 1967. Ens trobem doncs en un punt dolç, d'inflexió, que val la pena analitzar.

REGULADORS DELS *CORPORA ALLATA*. ANTECEDENTS

Poc després d'establir que l'absència d'hormona juvenil determinava la metamorfosi en les fases preadultes, així com la seva acció gonadotròfica en l'adult, hom deduí que la producció d'aquesta hormona en els *corpora allata* devia estar controlada per algun sistema de regulació molt precís. El model de regulació de la producció hormonal per neurosecrecions en l'eix hipotàlem-hipòfisi dels vertebrats inspirà ben aviat la proposta de models teòrics equivalents en insectes i, conseqüentment, hom postulà l'existència de factors inhibidors dels *corpora allata*, o al·latostatines, i estimuladors, o al·latotropines (Scharrer, 1958).

Els treballs que descriuen les primeres evidències experimentals de l'existència d'al·latotropines o d'al·latostatines han estat recollits en diverses revisions (Tobe i Stay, 1985; Feyerisen, 1985; Bellés, 1988). Aquestes primeres evidències es basaven en experiments de manipulació *in vivo* (nervectomia de les connexions entre el cervell i els *corpora allata*, cauterització o electroestimulació de cèl·lules neurosecretores, implant de cervells, etc.) i les estimacions de l'activitat dels *corpora allata* es feien de manera indirecta en observar, posem per cas, el desenvolupament dels oòcits o la inhibició de la metamorfosi.

Amb aquestes eines relativament rudimentàries, hom suggerí l'existència de factors al·latostàtics i al·latotrópics en una sèrie d'insectes, representants de set ordres diferents (taula 1).

TAULA 1. Diverses espècies en què hom ha suggerit l'existència d'al·latotropines o al·latostatines, a partir d'experiments de manipulació *in vivo*, i amb avaluació indirecta de l'acció estimuladora o inhibidora de l'hormona juvenil (dades de diferents autors, recollides per Tobe i Stay, 1985).

ORDRE Espècie	Al·latotropines		Al·latostatines	
	larva	adult	larva	adult
DICTYOPTERA <i>Periplaneta americana</i> <i>Leucophaea maderae</i> <i>Diploptera punctata</i> <i>Nauphoeta cinerea</i>			X X X	X X X
ORTHOPTERA <i>Locusta migratoria</i> <i>Schistocerca gregaria</i>	X	X X	X	X
DERMAPTERA <i>Anisolabis maritima</i> <i>Labidura riparia</i> <i>Anacridium aegyptium</i>	X	X X		
COLEOPTERA <i>Leptinotarsa decemlineata</i>		X		X
HETEROPTERA <i>Rhodnius prolixus</i> <i>Pyrrhocoris apterus</i> <i>Oncopeltus fasciatus</i> <i>Dindymus versicolor</i>	X X	X X	X	X X X X
LEPIDOPTERA <i>Galleria mellonella</i> <i>Manduca sexta</i> <i>Diatraea grandiosella</i>	X X X		X X	
DIPTERA <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Aedes aegypti</i>		X X		

AL·LATOTROPINES I AL·LATOSTATINES. PRIMERES CARACTERITZACIONS

Entrada la dècada de 1980, hom comença a treballar sistemàticament amb extractes de teixits neurals més o menys enriquits en contingut d'al·latotropines o al·latostatines. A més, l'avaluació dels efectes d'aquests factors ja es basa en mesures quantitatives de l'hormona juvenil.

Amb aquestes metodologies més avançades, hom comença a caracteritzar aquests factors, que resulten ésser de natura peptídica. En algunes espècies, com l'ortòpter *Locusta migratoria*, hom arriba a caracteritzacions parcials (vegeu Couillaud i Girardie, 1990, i la bibliografia inclosa en aquest treball). Tanmateix, les primeres identificacions s'han fet recentment sobre dictiòpters, lepidòpters i dípters.

DICTIÒPTERS

Amb mesures directes de la producció d'hormona juvenil *in vitro*, l'equip de B. Stay i S. S. Tobe descriu l'acció inhibidora d'extractes de teixit nerviós en l'espècie *Diploptera punctata* (Rankin *et al.*, 1986; Rankin i Stay, 1987). El mateix equip ha reeixit a purificar i identificar quatre al·latostatines peptídiques (figura 2), a partir d'extractes cerebrals de *D. punctata* (Woodhead *et al.*, 1989). Aquests pèptids exerceixen una potent acció inhibidora de l'hormona juvenil en femelles verges d'aquesta espècie. Un d'ells (AST 1: figura 2) inhibí també la producció hormonal en femelles fecundades i larves de darrera fase de *D. punctata* i en femelles adultes de *Periplaneta americana* (Woodhead *et al.*, 1989). Més recentment, Woodhead *et al.* (1994) han identificat dues noves al·latostatines de *D. punctata*, que mostren una activitat equivalent a les anteriors.

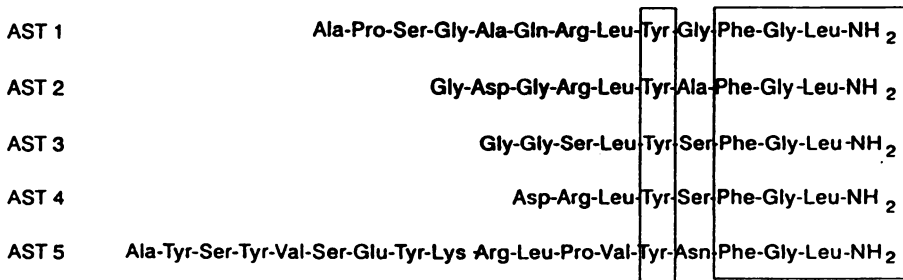


FIGURA 2. Al·latostatines identificades al dictiòpter *Diploptera punctata*. Els aminoàcids comuns als cinc pèptids han estat requadrats. Dades de Woodhead *et al.* (1989): AST 1-4; Pratt *et al.* (1989): AST 1; Pratt *et al.* (1991b): AST 5.

Paral·lelament, l'equip de R. Feyereisen (Pratt *et al.*, 1989) isolà i identificà una al·latostatina en aquesta mateixa espècie, que resultà ésser el mateix tridecapèptid (AST 1: figura 2) identificat per Woodhead *et al.* (1989). Aquest mateix grup (Pratt *et al.*, 1991a) identificà després un nou pèptid al·latostàtic de *D. punctata* (AST 5: figura 2) que és molt similar als altres prèviament descrits d'aquesta espècie. Alhora, els mateixos autors estudiaren l'activitat

biològica d'una sèrie d'anàlegs sintètics que presenten unes activitats, en el millor dels casos, similars a les dels pèptids naturals (Pratt *et al.*, 1991a i 1991b).

Ambdós grups d'investigadors (Pratt *et al.*, 1990 i Stay *et al.*, 1991) han descrit també els canvis de sensibilitat de *D. punctata* envers l'acció de les al·latostatines, en funció de l'edat i de l'estat fisiològic de l'exemplar.

Més recentment, Hayes *et al.* (1994) han preparat i estudiat una sèrie d'anàlegs de l'al·latostatina AST 4 de *D. punctata* basats en la substitució sistemàtica per Ala. Els resultats de l'activitat biològica suggereixen que els aminoàcids més crítics per a l'activitat del pèptid original són Leu⁸, seguit de Phe⁶ i Tyr.⁴

Altres espècies de dictiòpters que són objecte d'estudi són *Blattella germanica* i *Periplaneta americana*. Quant a *B. germanica*, Bellés i Piulachs (1989) han descrit l'existència de factors al·latostàtics en extractes de cervell, i la identificació d'aquests factors es troba actualment en curs. D'altra banda, Weaver (1991) ha demostrat que l'al·latostatina 1 de *D. punctata* (figura 2) inhibeix la producció d'hormona juvenil *in vitro* de *P. americana*. Aquest mateix autor ha purificat parcialment les al·latostatines pròpies de *P. americana* (Weaver i Freeman, 1992). Aquestes, però, han estat identificades indirectament en clonar el gen de les al·latostatines de *P. americana* (Ding *et al.*, 1993, vegeu més endavant). L'activitat inhibidora dels pèptids nadius és quelcom superior a la dels obtinguts de *D. punctata*, quan es comparen en *P. americana* (Yagi *et al.*, 1993).

LEPIDÒPTERS

En *Manduca sexta*, experiments *in vitro* fets amb extractes de cervell vingueren a confirmar l'existència d'una al·latotropina (Granger *et al.*, 1984), que fou identificada després (figura 3A) per Kataoka *et al.* (1989). Els assaigs biològics demostraren que l'al·latotropina de *M. sexta* estimula la producció d'hormona juvenil únicament en l'adult, i que no resultà activa en la femella adulta del dictiòpter *P. americana*, l'ortòpter *Schistocerca gregaria* o el coleòpter *Tenebrio molitor*. En canvi, sí que ho fou en la femella del lepidòpter *Heliothis virescens*. Sembla, doncs, que l'activitat està restringida a la fase adulta de l'ordre dels lepidòpters. A més, Kataoka *et al.* (1989) assajaren una

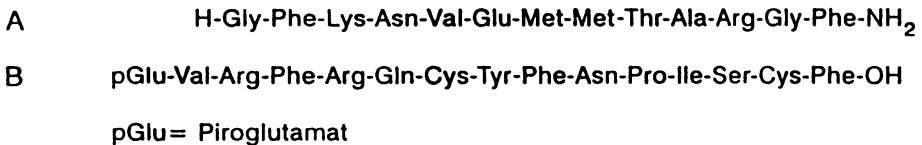


FIGURA 3. Al·latotropina (A) i al·latostatina (B) del lepidòpter *Manduca sexta*. Dades de Kataoka *et al.* (1989) (A) i de Kramer *et al.* (1991) (B).

sèrie d'anàlegs del pèptid natiu, i determinaren que l'octapèptid H-Glu-Met-Met-Thr-Ala-Arg-Gly-Phe-NH₂ presentava gairebé la mateixa activitat que el pèptid original. Més recentment, Unni *et al.* (1991) han sintetitzat dos anàlegs més (Val-Glu-Nle-Nle-Thr-Ala-Arg-Gly-Phe-NH₂ i N-Acetil-Val-Glu-Nle-Nle-Thr-Ala-Arg-Gly-Phe-NH₂), les activitats dels quals no difereixen gaire de la del pèptid natiu.

En *M. sexta* hom ha estudiat també els factors al·latostàtics. Granger *et al.* (1984), amb l'ús de tècniques *in vitro*, confirmaren l'existència d'una al·latostatina a la larva. D'altra banda, Bhaskaran *et al.* (1990) demostraren que l'al·latostatina en qüestió actua en la darrera fase larvària per tal de propiciar la metamorfosi. Més recentment, l'al·latostatina de *M. sexta* ha estat identificada per Kramer *et al.* (1991) (figura 3B). Aquesta al·latostatina inhibeix la biosíntesi d'hormona juvenil en l'última fase larvària i en femelles adultes de *M. sexta*. En canvi, no és activa sobre femelles adultes del dictiòpter *P. americana*, de l'ortòpter *Melanoplus sanguinipes* i del coleòpter *T. molitor*, i sí que ho és en femelles adultes del lepidòpter *H. virescens*. Com en el cas de l'al·latotropina, sembla que només és activa en lepidòpters.

D'altra banda, en *Galleria mellonella*, Sehnal i Rembold (1985) han descrit que la implantació de cervells supernumeraris induïx en l'hoste un increment de nivells d'hormona juvenil. Més recentment, Muszynska-Pytel mostrà que l'al·latotropina era sintetitzada en determinades cèl·lules de la *pars intercerebralis* i descriví un assaig *in vitro* per a mesurar l'activitat al·latotrópica d'extractes cerebrals (Muszynska-Pytel *et al.*, 1991). Tot i això, l'al·latotropina de *G. mellonella* no ha estat encara identificada.

DÍPTERS

L'estudi de l'espècie *Calliphora vomitoria* ha aportat unes dades força curioses. Un primer treball de Duve *et al.* (1993) descriu la identificació de cinc neuropèptids d'aquesta espècie (figura 4), que presenten una elevada similitud amb la part C-terminal de les al·latostatines del dictiòpter *D. punctata*. Un d'ells (CAST 5: figura 4), tanmateix, té Met a la posició C-terminal de la seqüència. Duve *et al.* (1993) han anomenat aquests pèptids cal·latostatines, per la seva similitud estructural amb les al·latostatines de *D. punctata*, però les proves biològiques mostraren que no inhibeixen la producció d'hormona juvenil en *C. vomitoria*. Per contra, tots ells, i en particular el que té Met en posició C-terminal, resultaren ésser potents inhibidors de l'hormona juvenil en *D. punctata* (Duve *et al.*, 1993). Anteriorment, Duve *et al.* (1992) ja havien descrit que quatre al·latostatines de *D. punctata* (AST 1-4: figura 1) no tenien efectes sobre la producció d'hormona juvenil en *C. vomitoria*.

D'altra banda, Richard *et al.* (1990) han descrit que un factor contingut en extractes de cervells de la tercera fase larvària de *Drosophila melanogaster* inhibeix la síntesi d'hormona juvenil *in vitro*. Aquest factor, però, no ha estat encara identificat.

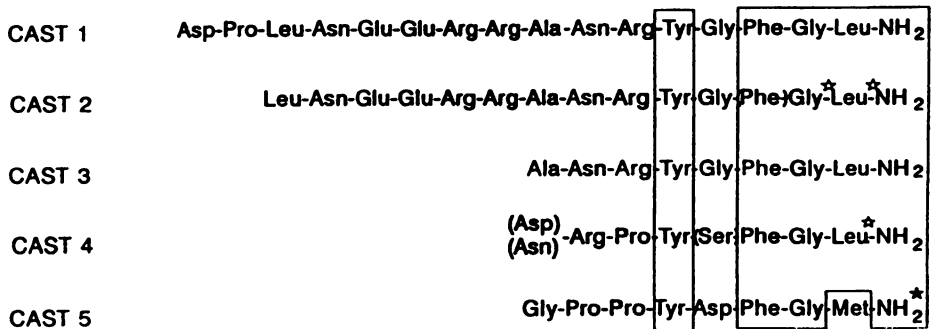


FIGURA 4. Cal·latostatines identificades en el dípter *Calliphora vomitoria* per Duve *et al.* (1993). Els aminoàcids comuns als cinc pèptids han estat requadrats. Quant a CAST 4, el primer aminoàcid no pogué ésser identificat inequívocament; tanmateix, tan sols Asp o Asn encaixen amb el pes molecular determinat per a aquest pèptid. L'amidació de CAST 5 ve suggerida per la potent activitat inhibidora d'aquest pèptid en contrast amb la completa absència d'activitat del compost àcid lliure. La Phe¹¹ de CAST 2 i la Ser⁵ de CAST 4 són assignacions temptatives. L'assignació de Gly¹³ i Leu¹⁴ a CAST 2, i de Leu⁸ a CAST 4 es basà en criteris de pes molecular i de similitud de seqüència (vegeu Duve *et al.*, 1993).

APROXIMACIONS MOLECULARS

Una aproximació recent a l'estudi dels al·latomoduladors és la caracterització molecular. Quant al lepidòpter *M. sexta*, Taylor *et al.* (1993) han presentat els primers resultats de l'isolament del gen que expressa l'al·latotropina d'aquesta espècie. La seqüència de nucleòtids suggereix que l'al·latotropina deriva d'un precursor poliproteínic, i l'anàlisi per *Southern blot* indica que el gen és de còpia única.

Les recerques més exhaustives han estat fetes, però, sobre el dictiòpter *D. punctata*. Amb l'ús de la reacció en cadena amb polimerasa (PCR), el grup de W. G. Bendena (Donly *et al.*, 1993) ha reeixit a caracteritzar un cDNA que codifica un precursor dels pèptids al·latostàtics de *D. punctata*. El gen és de còpia única i la seqüència d'aquest cDNA permet deduir la presència, si mes no, de tretze al·latostatines, entre les quals hi ha les cinc que ja havien estat identificades per mètodes convencionals (figura 2). Independentment, aquest cDNA ha estat també parcialment seqüenciat per Reichwald *et al.* (1994).

D'altra banda, Ding *et al.* (1993) han caracteritzat un cDNA del dictiòpter *P. americana* que també codifica un precursor d'al·latostatines. El gen és de còpia única i la seqüència del cDNA indica la presència d'almenys sis al·latostatines, dues de les quals són comunes amb *D. punctata*.

IMMUNOLOCALITZACIÓ I DADES FISIOLÒGIQUES

IMMUNOLOCALITZACIÓ

Stay *et al.* (1992), després d'obtenir un anticòs contra l'al·latostatina 1 de *D. punctata* (figura 2) han determinat la distribució d'al·latostatines immunoreactives en el cervell, *corpora cardiaca* i *corpora allata* d'aquesta espècie. Hom revelà immunoreactivitat en determinades cèl·lules de la part lateral del protocervell, els àxons de les quals travessen els *corpora cardiaca* i arriben als *corpora allata*. A més, també revelaren immunoreactivitat en quatre cèl·lules de la part intercerebral, els àxons de les quals finien a la part lateral del cervell. Aquestes observacions encaixen bé amb l'activitat inhibidora de l'hormona juvenil. Tanmateix, aquests autors també trobaren immunoreactivitat positiva en nombroses altres àrees del cervell, i en innervacions musculars. En un altre treball, Woodhead *et al.* (1992) descriuen, a més, la presència d'al·latostatina immunoreactiva en l'òrgan pulsàtil antenari de *D. punctata*. D'altra banda, Reichwald *et al.* (1994) han obtingut anticossos contra aquesta mateixa al·latostatina 1 de *D. punctata* i contra l'octadecapèptid de la mateixa espècie (AST 5: figura 2), i han revelat també la presència d'aquests pèptids al tub digestiu. Totes aquestes dades suggereixen que les al·latostatines, a part d'inhibir l'hormona juvenil de *D. punctata*, tindrien altres funcions, possiblement neuromoduladores i miotròpiques.

Quant a *C. vomitoria*, Duve *et al.* (1993) prepararen un anticòs contra la cal·latostatina 1 (figura 4) i revelaren la presència de cal·latostatines immunoreactives en cèl·lules i arboritzacions de l'àrea neuropilar del cervell d'aquest dípter. Significativament, no s'observà reactivitat en els *corpora allata*. Per contra, l'anticòs revelà un grup de neurones al gangli abdominal, amb els àxons projectant-se posteriorment envers l'intestí, el recte, les papil·les rectals i l'oviducte. L'absència d'immunoreactivitat als *corpora allata* és coherent amb els resultats negatius dels assaigs d'inhibició de l'hormona juvenil fets amb aquests composts sobre *C. vomitoria*. Per contra, la presència d'aquests pèptids en neurones relacionades amb l'aparell digestiu i ovipositor suggereix més aviat funcions miotròpiques.

Quant a l'al·latotropina del lepidòpter *M. sexta* (figura 3A), Veenstra i Hagedorn (1993) han obtingut un anticòs i han detectat al·latotropina immunoreactiva en diversos teixits del sistema nerviós de *P. americana*. Això suggereix que aquest dictiópter produeix un pèptid similar, però que possiblement té una funció diferent, atès que el pèptid del lepidòpter no estimula la producció d'hormona juvenil en *P. americana* (Kataoka *et al.*, 1989). Aquest mateix anticòs ha revelat també cèl·lules immunoreactives en el cervell i en la cadena nerviosa ventral del dípter *Aedes aegypti* (Veenstra, 1993).

NIVELLS

En *D. punctata*, Yu *et al.* (1993), mitjançant mètodes immunoenzimàtics, han estudiat el contingut d'al·latostatina 1 (figura 2) immunoreactiva en cervell, *corpora allata* i hemolimfa al llarg del cicle reproductiu, així com els nivells

d'aquest pèptid alliberats pels *corpora allata in vitro*. Els canvis de contingut observats semblen correlacionar-se inversament amb el cicle de producció d'hormona juvenil. D'altra banda, el pèptid sembla alliberar-se efectivament dels *corpora allata in vitro*. Més recentment, Yu *et al.* (1993) han aportat dades sobre el contingut de tres al·latostatines de *D. punctata* (AST 1 i AST 5: figura 2, i una nova al·latostatina encara no publicada) en el cervell i en el tub digestiu. En el cervell, els perfils de contingut de les tres al·latostatines al llarg del cicle és, si no fa, paral·lel, la qual cosa suggereix que les tres al·latostatines es produeixen simultàniament i que possiblement deriven d'un mateix precursor. Quant al tub digestiu, el material immunoreactiu detectat era més abundant a la darrera meitat del cicle.

RECEPTORS

En els *corpora allata* de *D. punctata*, Cusson *et al.* (1991) han descrit la presència de proteïnes receptores de l'al·latostatina 1 (figura 2) d'aquesta espècie, mitjançant mètodes de marcatge per fotoafinitat amb un anàleg d'aquesta al·latostatina. També detectaren proteïnes presumptament receptores al cervell i al cos gras.

MISSATGERS SECUNDARIS

Quant a *D. punctata*, hom sap que els nucleòtids cíclics AMPc i GMPc estan relacionats amb els mecanismes d'inhibició dels *corpora allata*. Tanmateix, les al·latostatines 1-4 (figura 2) de *D. punctata* no afecten ni els nivells d'AMPc ni els de GMPc en *corpora allata* d'aquesta espècie incubats *in vitro* (Cusson *et al.*, 1992), la qual cosa suggereix que els missatgers esmentats no estan implicats en l'acció inhibidora d'aquestes al·latostatines.

D'altra banda, el calci també és un important missatger secundari implicat en l'activació dels *corpora allata*. En aquest sentit, i en relació amb l'al·latotropina del lepidòpter *M. sexta* (figura 3A), les dades aportades per Reagan *et al.* (1992) indiquen que el pèptid estimula la formació de fosfats d'inositol, de manera que augmenta la concentració de calci intracel·lular en els *corpora allata*, la qual cosa produeix l'increment de la producció d'hormona juvenil.

METABOLISME

En *D. punctata*, Yagi *et al.* (1992) han descrit que el fosforamidó té una acció sinèrgica sobre l'activitat inhibidora de les al·latostatines 1 i 4 (figura 2) en *corpora allata* incubats *in vitro*. Atès que el fosforamidó és un inhibidor d'encefalinasas, i atesa la similitud estructural de les encefalinas amb les al·latostatines, aquests autors suggereixen l'existència d'una peptidasa similar a les encefalinasas en *D. punctata*, que metabolitzaria les al·latostatines.

D'altra banda, Garside i Tobe (1993) han descrit que l'al·latostatina 1 de *D. punctata* (figura 2), després d'èsser incubada amb hemolimfa de femelles fecundades d'aquesta espècie durant 30 minuts, és fragmentada per una endopeptidasa, i hom detecta la porció C-terminal, Tyr-Gly-Phe-Gly-Leu-NH₂, del pèptid original. Per contra, la cal·latostatina 5 (figura 4) no fou metabolitzada després d'una hora d'incubació en idèntiques condicions. Això pot explicar la potència inhibidora d'aquest pèptid en *D. punctata*.

EFFECTE ANTIMIOTRÒPIC

D'acord amb Lange *et al.* (1993), a part de l'efecte inhibidor de l'hormona juvenil, les al·latostatines 1 i 4 (figura 2) de *D. punctata* tenen un efecte inhibidor de les contraccions del tub digestiu d'aquesta espècie. La proctolina, un pèptid miotròpic clàssic en insectes, estimula aquestes contraccions. En *D. punctata* l'efecte estimulador induït per l'administració de proctolina fou contrarestat per les dues al·latostatines esmentades. En canvi, els mateixos experiments fets sobre l'òrgan pulsàtil antenari no donaren cap resultat positiu.

QÜESTIONS OBERTES I PERSPECTIVES

Quant als lepidòpters, els únics al·latomoduladors identificats corresponen a *M. sexta*, i són una al·latotropina (figura 3A) i una al·latostatina (figura 3B) peptídiques, que no presenten similituds rellevants amb cap altra família de pèptids reguladors. L'acció sobre la producció d'hormona juvenil sembla restringida a lepidòpters (Kataoka *et al.*, 1989; Kramer *et al.*, 1991), però aquest tipus de pèptids també podria ésser present en dictiòpters (*P. americana*: Venstra i Hagedorn, 1993) i en mosquits (*A. aegypti*: Veenstra, 1993). Si això és així caldrà esbrinar quines són les funcions en aquests insectes.

La informació sobre al·latostatines en dictiòpters, particularment en *D. punctata*, és més abundant i més difícil de racionalitzar. A part dels pèptids identificats per mètodes convencionals (figura 2; Woodhead *et al.* 1989; Pratt *et al.*, 1989, 1991a), el clonatge del gen ha permès deduir que aquesta espècie té tretze al·latostatines diferents (!) (Donly *et al.*, 1993). Es fa difícil esbrinar el sentit de tal diversitat de productes per a exercir, aparentment, les mateixes funcions. A més, no sembla que hi hagi compartimentació en teixits o perfils de continguts diferents al llarg del temps en les diferents al·latostatines que hom ha estudiat fins ara en aquest sentit (Yu *et al.*, 1993). D'altra banda, la ubiqüitat d'aquests pèptids al sistema nerviós de *D. punctata* (Stay *et al.*, 1993; Reichwald *et al.*, 1993) suggereix d'altres funcions, a part de l'acció inhibidora sobre els *corpora allata*. Hom ha descrit ja l'acció antimiotròpica en el tub digestiu (Lange *et al.*, 1994). Cal encara explicar el sentit fisiològic de la presència d'al·latostatines en nombroses àrees del sistema nerviós central, particularment al gangli cerebral, que no tenen a veure ni amb els *corpora allata* ni amb la musculatura. La hipòtesi

més versemblant és que podrien actuar com a neuromoduladors, a l'estil de les encefalines. Això està, però, per demostrar.

El cas del dípter *C. vomitoria* palesa a bastament que el mateix tipus de pèptid pot tenir funcions biològiques diferents. Aquí, les (c)al·latostatines no inhibeixen l'hormona juvenil (Duve *et al.*, 1993) sinó que semblen implicades en funcions miotròpiques i, potser també, neuromoduladores.

És clar que la similitud estructural entre les al·latostatines de dictiòpters i de dípters (grups que se situen gairebé als dos extrems de l'escala evolutiva dels insectes pterigògens) té un sentit filogenètic, i suggereix que aquests pèptids foren una invenció molt precoç en els insectes. Després, diferents grups seleccionarien diferents funcions per a aquesta mateixa família de pèptids, tot mantenint, potser, la funció ancestral. En aquest sentit s'escau recordar que la ubiqüitat d'aquestes al·latostatines en el sistema nerviós central (la qual cosa suggereix una acció neuromoduladora) és un caràcter comú a *D. punctata* i *C. vomitoria*.

En qualsevol cas, cal reconèixer que és prematur fer gaire especulació, i que s'haurien de vestir les hipòtesis amb més dades empíriques, sobretot si hom vol abordar qüestions evolutives. L'estudi dels gens, que tot just comença, aportarà sens dubte una informació valuosa en aquest sentit. Allò que esdevé més clar, tanmateix, és que, com en qualsevol àrea de recerca, el nombre d'interrogants oberts pels nous resultats supera amb escreix el nombre de preguntes que resolen. En el jove camp dels al·latomoduladors, aquesta és una evidència ben palesa. Una altra, que se'n deriva, és que queda molta feina, original i engrescadora, per fer.

AGRAÏMENTS

Les discussions sobre el tema mantingudes amb M. D. Piulachs i J. Ll. Maestro han ajudat a aclarir i a ordenar les dades del treball. Ll. Cornudella va fer una lectura crítica del manuscrit. La recerca sobre al·latomoduladors al nostre laboratori del Centre d'Investigació i Desenvolupament (CSIC, Barcelona) ha rebut el suport de la DGICYT (projectes PB89-0003 i PB92-0026).

REFERÈNCIES

- BELLÉS, X. (1988). Las hormonas endocrinas de los insectos. A: *Insecticidas biorracionales* (BELLÉS, X., ed.), C.S.I.C., Madrid. p. 15-67.
- BELLÉS, X. i PIULACHS, M. D. (1989). Occurrence of brain allatostatic factors in the cockroach *Blattella germanica*. *Acta Entomol. Bohemoslov* **86**, 161-166.
- BHASKARAN, G., DAHM, K. H., BARRERA, P., PACHECO, J. L., PECK, K. E. i MUSZYNSKA-PYTEL, M. (1990). Allatinhinin, a neurohormonal inhibitor of juvenile hormone biosynthesis in *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**, 123-136.

- COUILLAUD, F. i GIRARDIE, A. (1990). Disconnected corpora allata provide a novel assay for allatostimulating factors. *J. Exp. Zool.* **253**, 330-333.
- CUSSON, M., PRESTWICH, G. D., STAY, B. i TOBE, S. S. (1991). Photoaffinity labeling of allatostatin receptor proteins in the corpora allata of the cockroach, *Diploptera punctata*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **181**, 736-742.
- CUSSON, M., YAGI, K. J., XUE-CHEN, G. i TOBE, S. S. (1992). Assessment of the role of cyclic nucleotides in allatostatin-induced inhibition of juvenile hormone biosynthesis in *Diploptera punctata*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **89**, 121-125.
- DING, Q., DONLY, B. C., TOBE, S. S. i BENDENA, W. G. (1993). Identification of allatostatin gene sequences in *Periplaneta americana*. *XII Int. Congr. Comp. Endocrinol.*, Toronto. p. 37.
- DONLY, B. C., DING, Q., TOBE, S. S. i BENDENA, W. G. (1993). Molecular cloning of the gene for the allatostatin family of neuropeptides from the cockroach *Diploptera punctata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8807-8811.
- DUVE, H., THORPE, A., YAGI, K. J., YU, C. G. i TOBE, S. S. (1992). Factors affecting the biosynthesis and release of juvenile hormone bisepoxide in the adult blowfly *Calliphora vomitoria*. *J. Insect Physiol.* **38**, 575-585.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., SCOTT, A. G., YU, C. G., YAGI, K. J., TOBE, S. S. i THORPE, A. (1993). Callatostatins: Neuropeptides from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2456-2460.
- FEYEREISEN, R. (1985). Regulation of juvenile hormone titer: synthesis. A: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (KERKUT, G. A. i GILBERT, L. I., eds.), Pergamon Press, Oxford. **7**, 391-429.
- GARSDIE, C. i TOBE, S. S. (1992). Metabolism of peptides of the allatostatin family. *XII Int. Congr. Comp. Endocrinol.*, Toronto. p. 52.
- GRANGER, N. A., MITCHELL, L. J., JANZEN, W. P. i BOLLENBACHER, W. E. (1984). Activation of *Manduca sexta* corpora allata in vitro by cerebral neuropeptide. *Mol. Cell. Endocrinol.* **37**, 349-358.
- HAYES, T. K., GUAN, X.-CH., JOHNSON, V., STREY, A. i TOBE, S. S. (1994). Structure-activity studies of allatostatin 4 on the inhibition of juvenile hormone biosynthesis by corpora allata: the importance of individual side chains and stereochemistry. *Peptides*, **15**, 1165-1171.
- KATAOKA, H., TOSCHI, A., LI, J. P., CARNEY, R. L., SCHOOLEY, D. A. i KRAMER, S. J. (1989). Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science* **243**, 1481-1483.
- KERKUT, G. A. i GILBERT, L. I. (Eds.) (1985). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 13 vols., Pergamon Press, Oxford.

- KRAMER, S., TOSCHI, A., MILLER, C. A., KATAOKA, H., QUISTAD, G. B., LI, J. P., CARNEY, R. L. i SCHOOLEY, D. A. (1991). Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9458-9462.
- LANGE, A. B., CHAN, K. K. i STAY, B. (1993). Effect of allatostatin and proctolin on antennal pulsatile organ and hindgut muscle in the cockroach *Diploptera punctata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **24**, 79-92.
- MUSZYNSKA-PYTEL, M., SZOLAJSKA, E., PSZCZOLKOWSKI, M. A., MICHALIK, J. i MIKOLAJCZYK, P. (1991). In Vitro Bioassay for the Brain Allatotrophic Hormone of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Folia biol. (Krakow)* **39**, 57-65.
- PRATT, G. E., FARNSWORTH, D. E., SIEGEL, N. R., FOK, K. F. i FEYEREISEN, R. (1989). Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **163**, 1243-1247.
- PRATT, G. E., FARNSWORTH, D. E. and FEYEREISEN, R. (1990). Changes in the sensitivity of adult cockroach corpora allata to a brain allatostatin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **70**, 185-195.
- PRATT, G. E., FARNSWORTH, D. E., FOK, K. F., SIEGEL, N. R., MCCORMACK, A. L., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. i FEYEREISEN, R. (1991a). Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains: an octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2412-2416.
- PRATT, G. E., FARNSWORTH, D. E., SIEGEL, N. R., FOK, K. F. i FEYEREISEN, R. (1991b). Two types of allatostatic peptides from brains of the cockroach *Diploptera punctata*. In *Insect neuropeptides* (MENN, J. J., KELLY, T. S. i MASLER, E. P., eds.), ACS Symp. Ser. **453**, 178-192.
- RANKIN, S. M. and STAY, B. (1987). Distribution of allatostatin in the adult *Diploptera punctata* and effects on corpora allata in vitro. *J. Insect Physiol.* **33**, 551-558.
- RANKIN, S. M., STAY, B., AUCOIN, R. R. i TOBE, S. S. (1986). In vitro inhibition of juvenile hormone synthesis by corpora allata of the viviparous cockroach *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.* **32**, 151-156.
- REAGAN, J. D., MILLER, W. H. i KRAMER, S. J. (1992). Allatotropin induced formation of inositol phosphates in the corpora allata of the moth, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **20**, 145-155.
- REICHWALD, K., UNNITHAN, G. C., DAVIS, N. T., AGRICOLA, H. i FEYEREISEN, R. (1994). Expression of the allatostatin gene in endocrine cells of the cockroach midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11894-11898.
- RICHARD, D. S., APPLEBAUM, S. W. i GILBERT, L. I. (1990). Allatostatic regulation of juvenile hormone production in vitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **68**, 153-161.

- SCHARRER, B. (1958). Neuro-endocrine mechanisms in insects. *Proc. Int. Symp. Neurosecretion*, 2nd, p. 79-84.
- SEHNAL, F. i REMBOLD, H. (1985). Brain stimulation of juvenile hormone production in insect larvae. *Experientia* 41, 684-685.
- STAY, B., JOSHI, S. i WOODHEAD, A. P. (1991). Sensitivity of allatostatins of corpora allata from larval and adult female *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.* 37, 63-70.
- STAY, B., CHAN, K. K. i WOODHEAD, A. P. (1992). Allatostatin-immunoreactive neurons projecting to the corpora allata of adult *Diploptera punctata*. *Cell Tissue Res.* 270, 15-23.
- TAYLOR III, P. A., BHATT, T. i HORODYSKI, F. M. (1993). Isolation of the allatotropin gene from *Manduca sexta*. *II Int. Symp. Mol. Insect Science*, Flagstaff. p. 166.
- TOBE, S. S. i STAY, B. (1985). Structure and regulation of the corpus allatum. *Avd. Insect Physiol.* 18, 305-345.
- UNNI, B. G., BHASKARAN, G., DAHM, K. H. i HAYES, T. K. (1991). Stimulation of juvenile hormone biosynthesis by analogues of a *Manduca sexta* allatotropin: in vitro studies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 17, 127-142.
- VEENSTRA, J. (1993) A mosquito homologue of *Manduca* allatotropin. *II Int. Symp. Mol. Insect Science*, Flagstaff. p. 176.
- VEENSTRA, J. A. i HAGEDORN, H. H. (1993). Sensitive enzyme immunoassay for *Manduca* allatotropin and the existence of an allatotropin-immunoreactive peptide in *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 23, 99-109.
- WEAVER, R. J. (1991). Profile of the responsiveness of corpora allata from virgin female *Periplaneta americana* to an allatostatin from *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.* 37, 111-118.
- WEAVER, R. J. i FREEMAN, Z. A. (1992). Regulation of juvenile hormone biosynthesis by brain allatostatins in adult stages of the cockroach *Periplaneta americana*. In *Insect Juvenile Hormone Research. Fundamental and Applied Approaches*. (MAUCHAMP, B., COUILLAUD, F. i BAEHR, J. C., eds.), I.N.R.A., Paris. p. 83-95.
- WOODHEAD, A. P., STAY, B., SEIDEL, S. L., KHAN, M. A. i TOBE, S. S. (1989). Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5977-6001.
- WOODHEAD, A. P., STOLTZMAN, C. A. i STAY, B. (1992). Allatostatins in the Nerves of the Antennal Pulsatile Organ Muscle of the Cockroach *Diploptera punctata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 20, 253-263.
- WOODHEAD, A. P., KHAN, M. A., STAY, B. i TOBE, S. S. (1994). Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24, 257-263.

- YAGI, K. J., YU, C. G. i TOBE, S. S. (1992). Phosphoramidon enhances allatostatin-mediated inhibition of juvenile hormone biosynthesis in the corpora allata of the cockroach, *Diploptera punctata*. *Experientia* 48, 758-761.
- YAGI, K. J., DONLY, B. C., DING, Q., BENDENA, W. G. i TOBE, S. S. (1993). Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in the American cockroach, *Periplaneta americana*, by synthetic allatostatins. *XII Int. Congr. Comp. Endocrinol.*, Toronto. p. 176.
- YU, C.G., STAY, B., JOSHI, S. i TOBE, S. S. (1993). Allatostatin content of brain, corpora allata and haemolymph at different developmental stages of the cockroach, *Diploptera punctata*: quantitation by ELISA and bioassay. *J. Insect Physiol.* 39, 111-122.

(Original rebut per a publicació
el dia 23 de gener de 1994)

NOTA. Durant el procés de publicació d'aquest treball s'han descrit algunes al·latostatines noves, d'acord amb les referències següents:

- BELLÉS, X., MAESTRO, J. L., PIULACHS, M. D., JOHNSEN, A. H., DUVE, H. i THORPE, A. (1994). Allatostatic neuropeptides from the cocuroach *Blattella germanica* (L.) (dictyoptera, Blattellidae). Identification, immunolocalization and activity. *Reg. Peptides* 53, 237-247.
- DUVE, H., JOHNSEN, A. H., SCOTT, A. G., EAST, P. i THORPE, A. (1994). [Hyp³]Met-callatostatin. Identification and biological properties of a novel neuropeptide from the blowfly *Calliphora vomitoria*. *J. Biol. Chem.* 269, 21059-21066.
- LORENZ, M. W., VELLNER, R. i HOFFMANN, K. H. (en premsa). Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensefera, Gryllidae): additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenile hormone biosynthesis. *Reg. Peptides*.