

MARIA JOSÉ PINTO DE LIMA

ESTUDO CITOQUÍMICO E CITOFÍSICO DO DESENVOL-
VIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DAS GLÂNDULAS
SALIVARES DE *Bradysia spatitergum* (HARDY, 1956)

Orientadores: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

e

Prof.^a Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção de grau de Mestre
em Biologia.

CAMPINAS
Estado de São Paulo
1977

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais e à
minha irmã.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro através de uma bolsa de Mestrado I (Proc. 75/0989), que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia da Universidade Federal da Paraíba, pelas facilidades concedidas.

A todos os amigos, professores e funcionários, que direta ou indiretamente auxiliaram em todas as etapas deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL	4
3. MÉTODOS	5
3.1. Criação de <i>Bradysia spartitehorum</i>	5
3.2. Morfologia das Glândulas Salivares	5
3.3. Citquímica e citofísica das Glândulas Salivares	6
3.3.1. Pesquisa de glicosaminoglicanas neutras.	6
3.3.2. Pesquisa de glicosaminoglicanas ácidas..	6
3.3.3. Pesquisa de radicais eletropositivos....	8
3.3.4. Pesquisa de lipídios	8
3.3.5. Pesquisa de RNA	9
3.3.6. Anisotropia	9
3.4. Níveis de Duplicação dos Valores Feulgen-DNA....	9
3.4.1. Preparação das lâminas	9
3.4.2. Micro-espectrofotometria	10
3.4.3. Seleção dos λ operacionais	11
3.4.4. Escolha da razão área de medida/área nu clear	13
3.4.5. Homogeneidade da luz e de resposta do fo toatodo do citofotômetro	24
3.4.6. Ítens operacionais selecionados para a citofotometria	25

4.	RESULTADOS	27
4.1.	Estudo Morfológico	27
4.2.	Dados Citoquímicos e Citofísicos das Glândulas Salivares	31
4.2.1.	Glicosaminoglicanas neutras	31
4.2.2.	Glicosaminoglicanas ácidas	34
4.2.3.	Radicais eletropositivos	40
4.2.4.	Lipídios	44
4.2.5.	Detecção de RNA	49
4.2.6.	Anisotropia	50
4.3.	Determinação dos Valores Feulgen-DNA das Glândulas Salivares	52
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÕES	68
7.	RESUMO	71
8.	SUMMARY	73
9.	BIBLIOGRAFIA CITADA	75

1. INTRODUÇÃO

As glândulas salivares de alguns grupos de insetos têm sido objeto de estudo no que diz respeito aos aspectos morfológicos do órgão e à composição de seus produtos de secreção. As glândulas salivares de insetos são principalmente glândulas labiais, situadas abaixo do mesênteron e desembocando na cavidade pré-oral, entre o lábio e a faringe (Ross, 1939).

Dentro da classe Insecta as funções das glândulas salivares variam conforme a Ordem considerada. Porém, de modo geral, acham-se relacionadas com a secreção de enzimas digestivas e, no caso de insetos com metamorfose completa, as glândulas salivares larvais fabricam proteínas que serão utilizadas na construção de casulos individuais ou coletivos que abrigarão as pupas (Wigglesworth, 1965). Nos dípteros têm sido descritas a secreção de enzimas digestivas e a produção de mucoproteína e outros tipos de proteína estrutural (Patterson e col., 1949; Laufer e col., 1963), bem como a captação e concentração de proteínas da hemolinfa (Laufer e Nakase, 1965; Bianchi e Lara, 1969), nas glândulas salivares larvais. Além de proteínas, a presença de glicosaminoglicanas tem sido também relatada na secreção de tais glândulas em diversas espé

cies de insetos (*Drosophila*, *Chironomus*, *Sciara*, *Phynchosciara*), através de análise química ou citoquímica (Kato e Sirlin, 1963; Perkoswska, 1963; Berendes, 1965; George, 1968; Bianchi e Terra, 1975; Mello e Pretti, 1977). Em *Phynchosciara americana*, por exemplo, os carboidratos representam 3,4% da secreção, enquanto os constituintes proteicos representam 94,5% da mesma (Bianchi e Terra, 1975).

Por outro lado, estudos citoquímicos efetuados nas células epiteliais que secretam tais produtos são relativamente escassos para os dípteros, especialmente em se tratando de sciarídeos. Em *Bradysia sp*, uma das espécies para as quais existem dados nesse sentido, a resposta aos métodos citoquímicos para glicosaminoglicanas neutras e proteínas é variável em função das diferentes regiões das glândulas; essas regiões são identificáveis pela morfologia celular e pelas características morfológicas dos cromossomos politênicos (Cunha e col., 1969). Por outro lado, em outro sciarídeo, como *Rhynchosciara americana*, os padrões citoquímicos divergem dos de *Bradysia sp* (Mello e Pretti, 1977). Neste inseto também foram descritas variações funcionais estudadas bioquimicamente, aliadas à diversificação morfológica das glândulas (Winter e col., 1976). Embora poucas espécies da família Sciaridae tenham sido analisadas com esse propósito, os relatos existentes são sugestivos de que possam ocorrer variações para as diferentes espécies do grupo. Além disso, é provável que ocorram diferenças em tipos de secreção e mesmo em características citoquímicas e citofísicas das células secretoras durante as diversas fases do desenvolvimento das glândulas, à semelhan

ça do que foi narrado para outros grupos de insetos (Mello e Vidal, 1971).

No presente trabalho, portanto, visando-se contribuir para o conhecimento dessas características em outras espécies de sciarídeos, serão estudadas as glândulas salivares de *Bradysia spatiatengum* (Hardy, 1956) espécie que parece apresentar um "sex-ratio" especial (Souza, 1976) e que, além de seu ciclo biológico e mapeamento cromossômico (Comune, 1975), apresenta poucos dados adicionais conhecidos. Como primeira etapa do trabalho, as células secretoras das glândulas salivares (em diversas fases do desenvolvimento) e os produtos secretados no lúmen do órgão serão estudados em nível morfológico, citoquímico e citofísico. A seguir, serão determinados os padrões de duplicação do conteúdo de DNA (nas diversas regiões das glândulas e em várias fases de seu desenvolvimento), os quais, para os dípteros, há indicações de que variem com a espécie (Berendes, 1965; Pavan, 1965, Simões, 1967). Finalmente, tentar-se-á correlacionar o grau de atividade de elaboração dos produtos citoplasmáticos com os níveis de duplicação do conteúdo de DNA ao longo do órgão e durante várias etapas de desenvolvimento do mesmo.

2. MATERIAL

Foram utilizadas glândulas salivares de *Pradysia spatitergum* (Diptera, Sciaridae) sciarídeo classificado por Hardy (1956) como *Sciara (Luconiella) spatitergum* e reclassificado por Steffan (1968) como *Pradysia spatitergum*, nomenclatura atualmente em uso. O material foi estudado no 1º estadio larval (24 horas após a eclosão do ovo), na fase inicial e final do 4º estadio larval (7 e 9 dias respectivamente) e na fase de pré-pupa. A determinação dessas fases se baseou em dados de Comune (1975).

3. MÉTODOS

3.1. Criação de *Bradysia spatioergum*

O estoque inicial de *Bradysia spatioergum* foi coletado pela Prof.^a Hebe M. L. de Souza em 1972, em Barão Geraldo - Campinas (S.P.), usando-se como isca material em putrefação. A partir de uma amostra cedida pela professora Hebe M. L. de Souza ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas sua criação foi prosseguida. As larvas se desenvolvem em um meio de cultura colocado em frascos com capacidade de 1/4 de litro. O meio é preparado com 35 g. de ágar dissolvido em um litro e meio de água. O alimento consiste de rama de batata doce (*Ipomea batata*) seca e esterilizada depositado sobre o ágar solidificado. Quando as moscas se tornam adultas, são repicadas, transferidas para um novo frasco e as fêmeas depositam seus ovos. Os adultos morrem a seguir.

3.2. Morfologia das Glândulas Salivares

Primeiramente efetuou-se um estudo morfológico das glândulas salivares e para tal utilizaram-se montagens totais de glândulas dissecadas ou cortes em parafina (7 µm) de larvas inteiras.

A fixação do material foi efetuada em formol a 10%, sendo o tempo de 24 horas para as larvas inteiras e 10 minutos para as glândulas dissecadas.

Os cortes em parafina foram subsequentemente corados com hematoxilina-eosina. As montagens totais de glândulas sem coloração, prestaram-se a exame em microscópio de fase e polarização.

3.3. Citoquímica e Citofísica das Glândulas Salivares.

3.3.1. Pesquisa de glicosaminoglicanas neutras.

Cortes em parafina (7 μ m de espessura) de larvas inteiras e montagem total de glândulas dissecadas foram fixados em etanol-ácido acético 3:1, sendo o tempo de 30 minutos para as larvas inteiras e 5 minutos para as glândulas dissecadas.

A reação citoquímica utilizada foi a do Ácido periódico - Schiff (PAS), com e sem digestão prévia por diastase durante 1 e 2 horas.

3.3.2. Pesquisa de glicosaminoglicanas ácidas (GAGA)

Cortes em parafina (7 μ m de espessura) de larvas inteiras e montagem total de glândulas dissecadas foram fixados em metanol:formol:ácido acético (M.F.A.) 85:10:5, du-

rante 24 horas, ou em formol a 10% em pH 7,0, adicionado de brometo de *n*-hexadecil piridinium, por 2 horas.

Os cortes de material fixado em M.F.A. foram submetidos à coloração com soluções de azul de toluidina a 0,025% em tampão fosfato-ácido acético M/10 nos seguintes pH: 2,5; 3,0; 3,4; 4,0 e 5,0 (Lison, 1960).

As seguintes reações de bloqueio precederam a coloração acima:

- I. Metilação e metilação seguida de saponificação (Fischer e Lillie, 1954; Spicer e Lillie, 1959; Lillie e Jirge, 1975).
- II. Tratamento enzimático pela hialuronidase testicular (Lison, 1960; Leppi e Stoward, 1965).

Glândulas dissecadas e cortes do material fixado em formol foram corados pela solução de azul de Alcian a 1% em HCl 0,1N a pH 1,0 (Lev e Spicer, 1964) e pH 2,5 preparado com ácido acético a 1% (Lison, 1960).

A determinação da concentração eletrolítica crítica (C.E.C.) foi também efetuada. Os cortes de material fixado em formol, foram tratados com soluções de azul de Alcian a 1%, pH 5,0 adicionadas de $MgCl_2$ nas seguintes concentrações: 0,05M, 0,2M; 0,4M; 0,8M; 0,9M; 1,0M, técnica baseada nos trabalhos de Scott e Dorling (1965) e Scott e Stockwell (1967), de acordo com Silberman e Fromer (1974).

3.3.3. Pesquisa de radicais eletropositivos

Glândulas dissecadas (montagens totais) e cortes de larvas inteiras foram fixados em M.F.A. ou formol a 10% durante 24 horas para as larvas e 10 minutos para glândulas dissecadas .

Os cortes foram tratados por uma solução de Xylidine-ponceau 3 RS a 0,1% em tampão acetato de sódio 0,1M em HCl 1N, pH 1,7, procedimento este precedido ou não por desaminação (Vidal, 1970). Para identificação dos resíduos de aminoácidos fortemente básicos (arginina, lisina), utilizou-se o mesmo Xylidine-ponceau 3RS, porém a pH 8,0 (Vidal e Mello, 1977).

Alguns cortes e montagens totais de glândulas inteiras foram tratados por uma solução de Fast-Green a pH 8,1 (Deitch, 1966a).

3.3.4. Pesquisa de lipídios

Utilizou-se de glândulas inteiras ou cortes em congelação do material fixado em formol-cálcio de Baker, para as seguintes reações citoquímicas:

- I. Negro do Sudão (Lison, 1960).
- II. Teste de Baker para fosfolipídios (Lison, 1960).
- III. Análise da fluorescência após tratamento do material com uma solução de rodamina 6 G 0 (Neuhoff, 1973).

Os itens I e III foram realizados apenas em glândulas dissecadas (montagens totais).

3.3.5. Pesquisa de RNA

Larvas fixadas em etanol-ácido acético 3:1 foram cortadas com 10 μ m de espessura.

Investigou-se a presença de RNA através da reação da Galocianina-alúmen de cromo (Kiefer, 1970), com e sem digestão prévia por RNase ou hidrólise ácida com HCl 1N a 60°C durante 5 minutos.

3.3.6. Anisotropia

Investigou-se também a ocorrência de birrefringência e de dicroísmo nos preparados submetidos à coloração com azul de toluidina e com Xylidine-ponceau 3 RS, assim como nos preparados efetuados para a detecção de complexos lipídicos (Vidal e Bozzo, 1969; Vidal 1970).

Características de birrefringência foram também investigadas em glândulas dissecadas (montagem total) a fresco e sem coloração.

3.4. Níveis de Duplicação dos Valores Feulgen-DNA

3.4.1. Preparação das lâminas

As glândulas foram dissecadas em solução fisiológica para insetos e fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 5 minutos. Os preparados (montagens totais) foram submetidos à reação de Feulgen, utilizando-se hidrólise com HCl 4N

à temperatura ambiente de 25°C, durante 1 hora e 30 minutos, condições em que é permitida uma depuração máxima nesse tipo de material (Mello, 1976a). As glândulas foram tratadas a seguir com 3 banhos de água sulfurosa (Deitch, 1966b), lavadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e tornadas permanentes em bálsamo do Canadá (n = 1,54).

3.4.2. Micro-espectrofotometria

A determinação dos valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias foi realizada citofotometricamente através do método de duplo comprimento de onda (Ornstein, 1952; Pattau, 1952). Por este método, a quantidade total do cromóforo é dada pela fórmula:

$$m = \frac{BL_a C}{K_a \ln 10} ; \quad \text{onde}$$

$$C = \frac{1}{2 - Q} \ln \frac{1}{Q - 1} ,$$

$$Q = \frac{Lb}{La} = \frac{1 - Tb}{1 - Ta} ,$$

sendo :

m = quantidade total do cromóforo, no caso, valor Feulgen-DNA em unidades arbitrárias.

B = área do campo fotometrado.

T = transmitância medida por área fotometrada.

K = absorvidade.

L = 1 - T.

ln = logarítmo neperiano.

Os índices a e b referem-se aos valores relativos aos dois comprimentos de onda escolhidos, tais que $K_b = 2K_a$.

No presente caso, sendo as determinações relativas e não absolutas, a fórmula utilizada foi $m = RL_a C$.

3.4.3. Seleção dos λ operacionais

Para a seleção dos comprimentos de onda a e b a serem utilizados no presente trabalho foram determinadas curvas espectrais de absorção nas regiões glandulares, S_1 , S_2 e S_3 , nas 3 fases do desenvolvimento, com um microespectrofotômetro Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256. Os diferentes λ foram estabelecidos com uso de régua monocromadora Schott. Para a obtenção de curvas de absorção, variaram-se os aumentos das objetivas e do optovar, diâmetros do diafragma de medida e de campo utilizados, em função das regiões glandulares e fases do desenvolvimento estudadas, conforme acham-se indicados na Tabela I. Tal procedimento foi ditado pela variação em área nuclear e espessura do material corado nas diferentes condições experimentais.

Tabela I — Condições citofotométricas utilizadas para a seleção dos 2 comprimentos de onda operacionais para a obtenção dos valores Feulgen-DNA nas 3 regiões glandulares em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário de *Bradysia spatiatergum*.

Fases do desenvolvimento	Regiões glandulares	Objetiva (X)	Optovar (X)	Diâmetro do diafragma de medida (mm)	Diâmetro do diafragma de campo (mm)	Área de medida (μm^2)
1º estadi larval	S ₁	63	2	0,16	0,2	1,29
	S ₂	63	2	0,16	0,2	1,29
	S ₃	63	2	0,16	0,2	1,29
Início de 4º estadi larval	S ₁	40	2	0,16	0,3	3,14
	S ₂	16	1,6	0,25	0,3	74,82
	S ₃	16	1,6	0,25	0,3	74,82
Pré-pupa	S ₁	40	2	0,16	0,3	3,14
	S ₂	16	1,6	0,25	0,3	74,82
	S ₃	16	1,6	0,25	0,3	74,82

Uma vez determinado o pico de cada curva de absorção de Feulgen, considerou-se este valor de extinção como correspondente a 100% e a partir deste, calculou-se a extinção relativa para os valores obtidos em outros λ . Determinou-se, a seguir a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação desses novos valores para cada comprimento de onda. Com os valores dessas médias foram obtidas curvas de absorção relativa e a partir destas escolheram-se os dois comprimentos de onda operacionais a e b. (Os dados referentes às curvas de absorção acham-se relatados nas tabelas II a X). Levou-se em consideração a recomendação de Garcia e Iorio (1966) de que, sendo Ea a extinção dos λ mais curto e Eb, a extinção no λ mais longo, a razão Ea/Eb deve ser levemente superior a 0,50 (0,51-0,53). Esse pequeno excesso compensará o efeito promovido pela presença de espaços não absorventes em meio ao material não corado (Garcia e Iorio, 1966).

3.4.4. Escolha da razão área de medida/área nuclear.

Um fator importante para o procedimento citofotométrico de duplo comprimento de onda é também o estabelecimento de uma razão área de medida/área de material absorvente adequada (Garcia e Iorio, 1966) para a determinação dos valores de Ta e Tb . Segundo Mello (1976b) é aconselhável que o valor dessa razão não ultrapasse 3,41, quando as medidas são efetuadas ao citofotômetro Zeiss, para núcleos com contorno circular a elipsoidal, submetidas à reação de Feulgen. No pre

sente trabalho, foram utilizados valores da razão A_2/A_1 não maiores que os discriminados na Tabela XI. Os diafragmas de medida utilizados apresentavam área circular, exceto para a medida dos valores Feulgen-DNA da região S_1 . Nesta porção da glândula, sendo os núcleos de forma elipsoidal prolato foi usado diafragma de medida com área retangular (Mello e Zanardi, 1976).

Tabela II - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S_1 de glândulas salivares de *Phadysia spatitergum* do 1º estadio larval, submetidas à reação de Feulgen. (n = 3 curvas).

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	12,90 \pm 7,55	59,28	545	99,47 \pm 0,62	0,62
630	15,53 \pm 7,84	50,45	540	98,72 \pm 0,90	0,91
620	20,35 \pm 4,90	24,06	535	99,09 \pm 1,13	1,14
610	30,46 \pm 6,33	20,79	530	94,76 \pm 22,04	23,26
600	48,97 \pm 4,79	9,78	525	94,26 \pm 3,98	4,23
590	65,07 \pm 1,89	2,90	520	88,87 \pm 9,51	10,70
580	80,68 \pm 5,59	6,93	515	88,87 \pm 6,57	7,39
575	90,90 \pm 1,02	1,13	510	84,90 \pm 8,17	9,63
570	94,10 \pm 3,97	4,22	500	74,44 \pm 5,68	7,63
565	96,34 \pm 2,16	2,25	490	65,55 \pm 4,33	6,60
560	98,62 \pm 1,77	1,80	480	50,36 \pm 7,07	14,04
555	94,27 \pm 8,59	9,12	470	42,51 \pm 9,97	23,45
550	99,30 \pm 0,77	0,78	$E_{480}/E_{545} = 0,506$		

Tabela III - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos de região S₂ de glândulas salivares de *Bradysia spati-tengum* do 1º estadio larval, submetidas à reação de Feulgen (n = 3 curvas).

$\lambda(\text{nm})$	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	$\lambda(\text{nm})$	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	2,70 \pm 2,22	82,12	545	97,84 \pm 2,94	3,00
630	6,17 \pm 1,87	30,31	540	97,45 \pm 1,59	1,64
620	13,68 \pm 1,71	12,50	535	96,22 \pm 5,54	5,76
610	25,25 \pm 2,39	9,48	530	96,44 \pm 1,97	2,04
600	41,99 \pm 5,47	13,04	525	93,15 \pm 1,78	1,91
590	61,75 \pm 5,04	8,16	520	89,82 \pm 3,98	4,43
580	82,31 \pm 4,57	5,55	515	88,02 \pm 2,54	2,89
575	86,46 \pm 2,37	2,74	510	85,38 \pm 2,22	2,60
570	92,40 \pm 0,97	1,05	500	73,01 \pm 1,80	2,46
565	95,15 \pm 0,94	0,99	490	64,98 \pm 7,42	11,42
560	96,21 \pm 1,92	2,00	480	49,15 \pm 14,21	28,91
555	96,54 \pm 3,11	3,22	470	39,83 \pm 2,25	5,64
550	99,35 \pm 1,31	1,14		$E_{480}/E_{545} = 0,502$	

Tabela IV - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S₃ de glândulas salivares de *Bradysia spati-tengum* do 1º estadio larval, submetidas à reação de Feulgen. (n = 3 curvas).

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	9,05 \pm 6,47	71,43	545	94,02 \pm 9,10	9,68
630	14,26 \pm 4,77	33,48	540	92,58 \pm 10,78	11,64
620	21,84 \pm 5,00	22,88	535	91,22 \pm 13,73	15,05
610	31,18 \pm 5,91	18,96	530	94,74 \pm 6,90	7,28
600	52,53 \pm 2,86	5,45	525	91,65 \pm 8,28	9,04
590	70,50 \pm 5,08	7,20	520	86,25 \pm 10,50	12,17
580	85,84 \pm 4,66	5,43	515	84,20 \pm 9,55	11,35
575	88,57 \pm 4,91	5,54	510	82,50 \pm 6,69	8,10
570	92,63 \pm 7,24	7,82	500	72,24 \pm 8,91	12,33
565	88,40 \pm 9,50	10,75	490	61,13 \pm 9,30	15,21
560	92,11 \pm 5,69	6,17	<u>480</u>	<u>51,82 \pm 4,54</u>	<u>8,76</u>
555	90,01 \pm 11,21	12,45	470	42,48 \pm 6,72	15,82
<u>550</u>	<u>95,01 \pm 8,74</u>	<u>9,20</u>	$E_{480}/E_{550} = 0,545$		

Tabela V — Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S_1 de glândulas salivares de *Anadysia spatitexgum* do início do 4º estadio larval, submetidas à reação de Feulgen. (n = 3 curvas).

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	12,14 \pm 5,74	47,26	545	96,26 \pm 3,18	3,31
630	15,42 \pm 5,35	34,73	540	95,34 \pm 3,41	3,58
620	25,02 \pm 1,34	5,33	535	93,63 \pm 5,79	6,18
610	35,49 \pm 5,91	16,65	530	91,30 \pm 4,50	4,93
600	56,10 \pm 6,48	11,56	525	90,92 \pm 5,93	6,52
590	66,13 \pm 4,18	6,32	520	89,16 \pm 5,14	5,76
580	87,94 \pm 5,76	6,55	515	85,85 \pm 5,41	6,30
575	92,95 \pm 6,10	6,55	510	82,34 \pm 4,76	5,78
570	94,14 \pm 5,55	5,89	500	74,37 \pm 6,90	9,28
565	96,14 \pm 5,66	5,89	490	65,26 \pm 5,67	8,69
560	98,60 \pm 0,40	0,41	<u>480</u>	<u>53,65 \pm 4,24</u>	<u>7,90</u>
<u>555</u>	<u>100,00 \pm 0,00</u>	<u>0,00</u>	470	46,06 \pm 3,73	8,09
550	95,90 \pm 4,16	4,34		$E_{480}/E_{555} = 0,537$	

Tabela VI - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S₂ de glândulas salivares de *Pradusia sspati-terqum* no início do 4º estadio larval, submetidas à reação de Feulgen. (n = 5 curvas).

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	13,98 \pm 3,65	26,10	545	96,86 \pm 2,98	3,08
630	21,27 \pm 6,43	30,25	540	92,61 \pm 7,73	8,35
620	34,59 \pm 8,83	25,53	535	96,26 \pm 1,52	1,58
610	46,88 \pm 13,58	28,97	530	93,05 \pm 4,87	5,24
600	64,57 \pm 15,18	23,51	525	92,69 \pm 2,63	2,83
590	77,98 \pm 12,19	15,63	520	94,11 \pm 2,10	2,23
580	88,00 \pm 7,38	8,38	515	91,96 \pm 2,40	2,60
575	94,74 \pm 2,35	2,48	510	89,06 \pm 3,21	3,60
570	93,45 \pm 6,09	6,52	500	81,10 \pm 4,23	5,22
565	98,59 \pm 1,82	1,86	490	74,67 \pm 5,90	7,90
560	99,03 \pm 0,97	0,97	480	60,09 \pm 13,56	22,57
555	98,22 \pm 1,87	1,91	470	51,34 \pm 10,57	20,58
550	96,76 \pm 3,15	3,26	$E_{470}/E_{555} = 0,523$		

Tabela VI - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S₃ de glândulas salivares de *Bradysia sp. titergum* do início do 4º estadio larval, submetidas à reação de Feulgen. (n = 3 curvas)

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	14,45 ± 9,29	64,28	545	92,18 ± 12,15	13,18
630	20,62 ± 12,51	60,67	540	90,30 ± 14,81	16,40
620	32,72 ± 17,23	52,67	535	84,39 ± 10,87	12,88
610	46,47 ± 15,88	34,18	530	91,73 ± 7,70	8,40
600	67,93 ± 15,32	22,55	525	89,30 ± 7,47	8,36
590	77,54 ± 6,89	8,89	520	90,59 ± 3,35	3,70
580	89,67 ± 3,16	3,53	515	85,52 ± 4,13	4,83
575	92,60 ± 4,00	4,32	510	82,53 ± 5,92	7,17
570	95,03 ± 2,21	2,33	500	79,24 ± 2,17	2,67
565	95,04 ± 6,36	6,69	490	71,71 ± 4,48	6,25
<u>560</u>	<u>99,28 ± 1,26</u>	<u>1,26</u>	480	62,26 ± 8,61	13,83
555	93,78 ± 2,82	3,01	<u>470</u>	<u>51,25 ± 8,85</u>	<u>17,26</u>
550	94,18 ± 3,86	4,10	$E_{470}/E_{560} = 0,516$		

Tabela VIII - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S_1 de glândulas salivares de *Bradysia spartitergum* (pré-pupa) submetidas à reação de Feulgen. (n = 3 curvas).

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	8,36 \pm 3,60	43,08	545	86,36 \pm 8,91	10,32
630	13,91 \pm 3,08	22,12	540	93,17 \pm 1,25	1,35
620	21,51 \pm 2,33	10,81	535	89,44 \pm 5,29	5,91
610	29,37 \pm 3,40	11,58	530	90,98 \pm 1,66	1,82
600	42,14 \pm 6,90	16,36	525	88,17 \pm 2,10	2,38
590	69,33 \pm 7,03	10,14	520	84,45 \pm 6,59	7,81
580	78,23 \pm 7,61	9,73	515	81,30 \pm 2,96	3,64
575	84,78 \pm 7,09	8,36	510	79,82 \pm 4,26	5,34
570	96,28 \pm 3,31	3,44	500	69,87 \pm 2,18	3,11
565	96,60 \pm 5,90	6,11	490	61,91 \pm 3,12	6,03
<u>560</u>	<u>91,85 \pm 8,25</u>	<u>8,98</u>	<u>480</u>	<u>48,03 \pm 2,64</u>	<u>5,50</u>
555	88,61 \pm 9,49	10,71	470	43,61 \pm 4,85	11,12
550	89,41 \pm 7,60	8,49		$E_{480}/E_{560} = 0,523$	

Tabela IX — Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S₂ de glândulas salivares de *Bradysia ornaticornis* (pré-pupa), submetidas à reação de Faulgen. (n = 5 curvas).

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	7,73 ± 1,53	19,84	545	97,14 ± 3,68	3,79
630	12,65 ± 2,81	22,23	540	99,41 ± 0,86	0,86
620	23,21 ± 3,68	15,86	535	97,40 ± 2,66	2,73
610	37,35 ± 5,58	14,95	530	93,98 ± 8,48	9,02
600	61,12 ± 14,89	24,36	<u>525</u>	<u>93,25 ± 6,11</u>	<u>6,55</u>
590	73,65 ± 7,26	9,85	520	92,79 ± 3,29	3,55
580	87,92 ± 8,33	9,47	515	89,91 ± 4,26	4,75
575	93,50 ± 4,75	5,08	510	88,15 ± 4,19	4,76
570	93,74 ± 3,65	3,90	500	77,68 ± 5,29	6,81
565	96,26 ± 3,77	3,91	490	65,74 ± 12,20	18,56
560	96,48 ± 3,74	3,88	480	55,19 ± 4,30	7,78
555	94,96 ± 4,10	4,31	<u>470</u>	<u>46,93 ± 4,42</u>	<u>9,41</u>
550	97,52 ± 2,31	2,37	$E_{470}/E_{525} = 0,503$		

Tabela X - Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos da região S₃ de glândulas salivares de *Bradysia spaticter gum* em fase de pré-pupa, submetidas à reação de Feulgen. (n = 3 curvas)

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)	λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	C.V.(%)
640	7,22 ± 0,79	10,91	545	96,17 ± 5,49	5,71
630	10,60 ± 1,32	12,45	540	95,31 ± 3,93	4,12
620	18,48 ± 1,30	7,02	535	90,85 ± 5,14	5,66
610	29,23 ± 1,06	3,63	530	90,20 ± 4,73	5,25
600	44,89 ± 3,11	6,94	525	94,78 ± 4,46	4,71
590	66,01 ± 2,55	3,86	520	88,70 ± 4,51	5,09
580	75,43 ± 9,14	12,12	515	87,49 ± 4,04	4,62
575	87,76 ± 7,31	8,33	510	87,86 ± 1,47	1,67
570	92,37 ± 6,82	7,39	500	77,33 ± 9,44	12,21
565	95,77 ± 5,71	5,96	490	67,40 ± 5,29	7,85
560	92,99 ± 6,07	6,53	480	55,79 ± 3,80	6,81
555	94,51 ± 4,17	4,41	470	<u>50,81 ± 3,25</u>	<u>6,39</u>
550	<u>97,84 ± 2,63</u>	<u>2,69</u>			

$E_{470}/E_{550} = 0,519$

Tabela XI — Determinação da razão área de medida citofotométrica/área nuclear utilizada no método de duplo comprimento de onda para as 3 regiões das glândulas salivares de *Bradysia spatiaterrum* em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário.

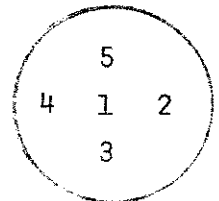
Fases do desenvolvimento	Regiões glandulares	A_2 = Área de mensuração (μm^2)	A_1 = Área nuclear dos maiores núcleos (μm^2)	A_2/A_1
1º estadio larval	S_1	9,71	3,27	2,95
	S_2	49,51	23,09	2,14
	S_3	7,91	5,15	1,54
Início do 4º estadio larval	S_1	119,20	37,92	3,14
	S_2	766,99	498,62	1,54
	S_3	766,99	321,21	2,39
Pré-pupa	S_1	100,00	36,64	2,73
	S_2	766,99	294,35	2,61
	S_3	766,99	360,36	2,12

3.4.5. Homogeneidade da luz e de resposta do fotocátodo do citofotômetro.

Estes itens foram testados segundo recomendação de Garcia e Iorio (1966), ou seja, variou-se a posição de um núcleo da região S_3 dentro do campo fotometrado, registrando-se o valor da transmitância em cada posição e comparando-se os resultados entre si. Foram testadas 5 posições e 3 leituras, em cada uma. Calculou-se a seguir a média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação para cada posição, conforme indicados na tabela XII. Considerando-se que a diferença máxima entre os valores das médias por posição foi menor que 3%, a homogeneidade da luz e de resposta do fotocátodo durante o levantamento dos valores de transmitância ou extinções dos núcleos de *B. spatiolegum*, foram altamente satisfatórios (Garcia e Iorio, 1966).

Tabela XII - Teste de homogeneidade da luz e de resposta do fotocátodo realizado em um núcleo da região S_3 da glândula salivar de pré-pupa.

Posição	Transmitâncias (3 leituras)	$\bar{X} \pm S$	C.V. (%)
1	81,4; 81,5; 81,5	81,47 \pm 0,06	0,07
2	81,8; 81,7; 81,2	81,57 \pm 0,32	0,39
3	81,8; 81,8; 82,2	81,93 \pm 0,23	0,28
4	80,2; 80,0; 80,0	80,07 \pm 0,12	0,14
5	81,5; 81,5; 81,2	81,40 \pm 0,17	0,21



$\lambda = 550\text{nm}$, objetiva = 16X, optovar = 2X, diâmetro do diafragma de medida = 2,5mm, diâmetro do diafragma de campo = 8mm.

3.4.6. Itens operacionais selecionados para a citofotometria.

Com base nos itens 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5, a avaliação citofotométrica dos valores Feulgen-DNA dos núcleos das glândulas salivares nos dois comprimentos de onda escolhidos, foi finalmente realizada utilizando-se das condições operacionais apontadas na Tabela XIII.

Tabela XIII - Resumo das condições de trabalho utilizadas para a obtenção citofotométrica dos valores Feulgen - DNA em *B. spathigerum*.

Fases do desenvolvimento	Regiões glandulares	Números de núcleos fotometrados	Pares de λ escolhidos (nm)	Área de medida (μm^2)	Objetiva (X)	Optovar (X)	Diâmetro de diafragma de campo (mm)
1º estadio larval	S ₁	11	480 e 545	9,71	63	2	0,2
	S ₂	7	480 e 545	49,51	63	2	0,2
	S ₃	30	480 e 550	7,91	63	2	0,2
Início do 4º estadio larval	S ₁	30	480 e 555	119,20	16	2	0,4
	S ₂	30	470 e 555	766,99	16	2	0,5
	S ₃	30	470 e 560	766,99	16	2	0,5
Pré-pupa	S ₁	30	480 e 560	100,00	16	2	0,4
	S ₂	30	470 e 525	766,99	16	2	0,5
	S ₃	30	470 e 550	766,99	16	2	0,5

4. RESULTADOS

4.1. Estudo Morfológico

No decorrer do desenvolvimento pós-embriônico, *Bradysia spatitergum* apresenta-se com tamanho relativamente pequeno: 0,5mm, 3,0mm, 3,5 - 4,0mm e 2,5 - 3,0mm de comprimento, respectivamente durante o 1º estadio larval, início de 4º estadio, fim de 4º estadio e pré-pupa.

A metodologia empregada para o estudo morfológico de suas glândulas salivares, permitiu as observações que se seguem.

As glândulas salivares acham-se dispostas longitudinalmente com relação ao corpo da larva, ocupando quase toda sua extensão; dois tubos a compõem e se unem anteriormente em um ducto que desemboca próximo à extremidade labial. As células das diferentes porções glandulares convencionadas como regiões S_1 , S_2 e S_3 apresentam-se morfológicamente distintas. Na figura 1 acham-se esquematizadas as glândulas salivares de *B. spatitergum* bem como o aspecto de cortes transversais ao seu longo eixo, passando pelas 3 regiões glandulares.

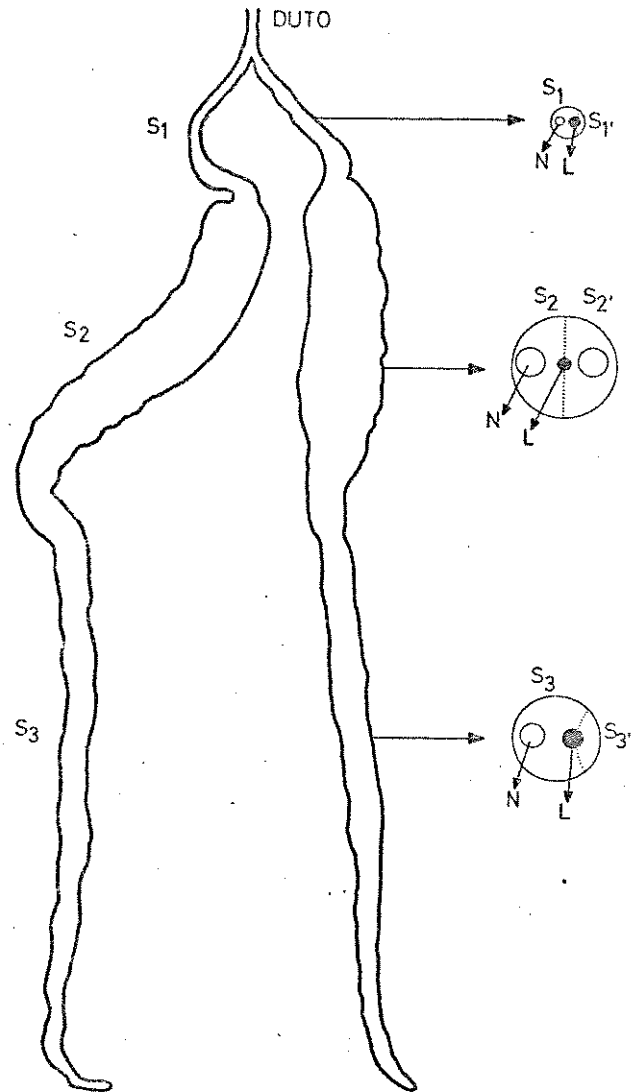


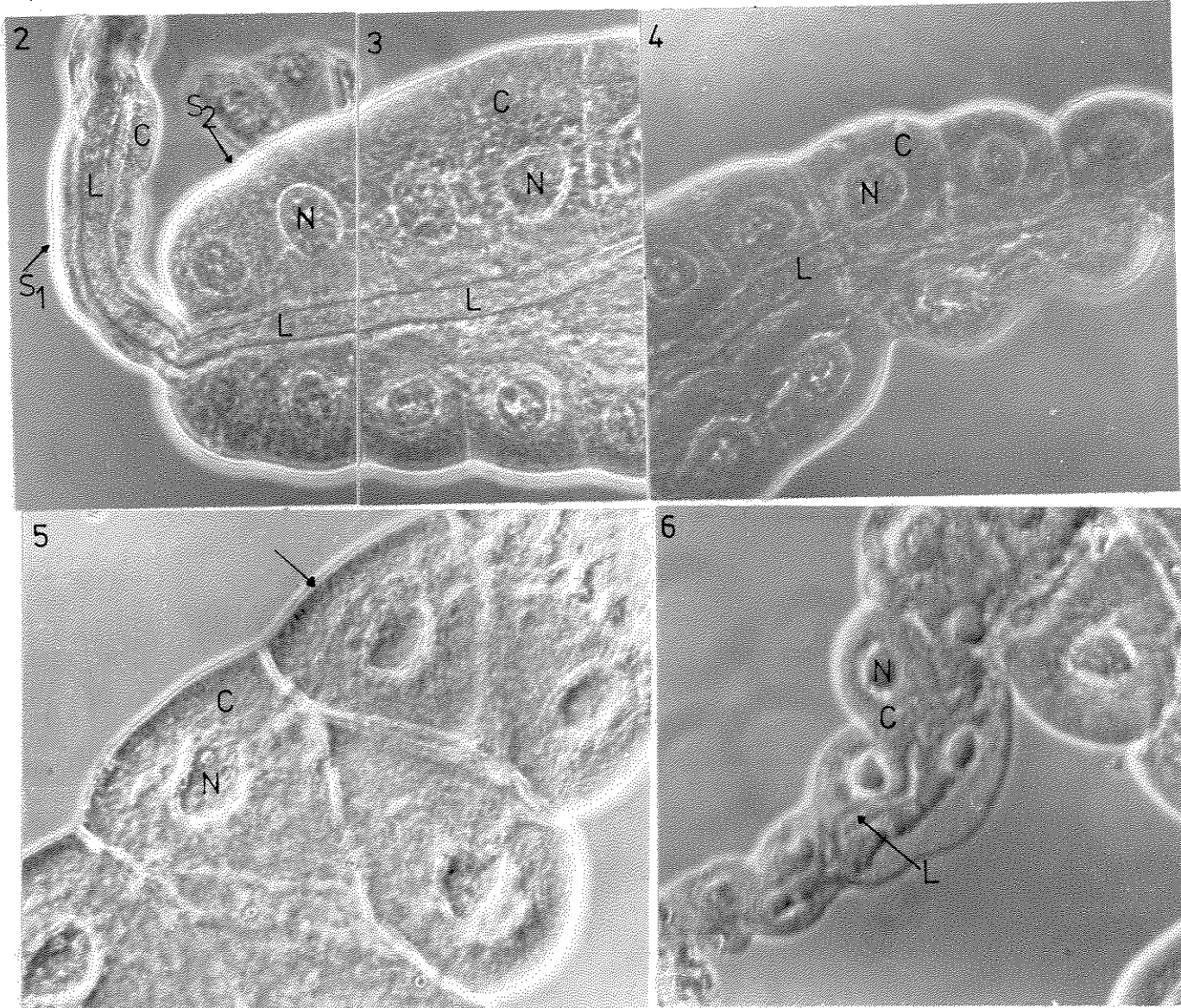
Fig. 1. Esquema geral da glândula salivar de *Bradysia spatitergum* indicando à direita o aspecto de cortes transversais correspondentes a cada região glandular (S₁, S₂ e S₃)

N= núcleo L= lúmen

A região S_1 apresenta células, num total de 18 com uma forma aproximadamente cônica e com núcleos pequenos, de localização parabasal (Fig. 2). Na região S_2 (Fig. 3) as células num total de 23 são aparentemente maiores quando comparadas com as da região S_1 e S_3 (Figs. 2 e 4); sua forma é aproximadamente cúbica, com um citoplasma filamentososo (ao contrário do que se verifica na região S_3 cujo citoplasma é mais granuloso) e núcleos também com localização parabasal (Fig. 3). Na porção em que S_2 se torna próxima de S_3 , as células de S_2 começam a mudar sua morfologia (Fig. 4).

Na região S_3 as células num total de 85, têm disposição semelhante às de S_1 , porém são maiores do que estas (Fig. 5). À medida que se aproxima da extremidade distal das glândulas, as células de S_3 diminuem gradativamente de tamanho (Fig. 6).

O lúmen das regiões S_1 e S_2 apresenta aspecto semelhante, enquanto o da região S_3 , devido à disposição e forma cônica das células que a compõem, adquire um aspecto helicoidal.



Figs. 2 a 6. Montagens totais das glândulas salivares de *R. spatitergum* vistas ao microscópio de contraste de fase. Fig. 2 - Região S_1 (500X). 3 - Região S_2 (500X). 4 - Transição da região S_2 para S_3 (500X). 5 - Região S_3 , observa-se a porção basal das células com maior índice de refração (seta) (1250X). 6 - Células distais da região S_3 (1250X). C = citoplasma, N = núcleo, L = lúmen.

4.2. Dados Citoquímicos e Citofísicos das Glândulas Salivares

4.2.1. Glicosaminoglicanas neutras

Detectou-se reatividade ao PAS, com diferentes intensidades, ao longo de toda a glândula tanto no citoplasma como no lúmen do órgão (Figs. 7, 8, 9). O bordo estriado dessas células também mostrou-se reativo. Quando a reação ao PAS foi precedida por digestão com diastase, a reatividade no citoplasma e lúmen da porção distal das células de S_3 não mais se manifestou. Porém, esta, apesar de menos intensa, permaneceu na região proximal de S_3 , S_2 e S_1 tanto no citoplasma como no lúmen (Tabela XIV). O bordo estriado também permaneceu reativo.

Figs.: 7 a 9. Reação ao PAS em montagem total das glândulas salivares de *Bradysia spathitengum*. 7 - Glândula salivar em início de 4º estadio. A porção proximal da região S₃ (P) apresenta-se mais reativa ao PAS quando comparada com as regiões S₂ e S₁. Notar material mais intensamente reativo ao PAS no lúmen de S₂ (375X). 8 - Em pré-pupa há uma reatividade marcante no lúmen (L) da glândula. Porção distal de S₂ (D), região mediana de S₂ (M), região S₁ (seta) (375X). 9 - Reatividade ao PAS muito fraca no lúmen (L) e citoplasma (C) da porção distal da região S₃. Glândula salivar em fase de pré-pupa. (375X). N = núcleo; C = citoplasma e L = lúmen.

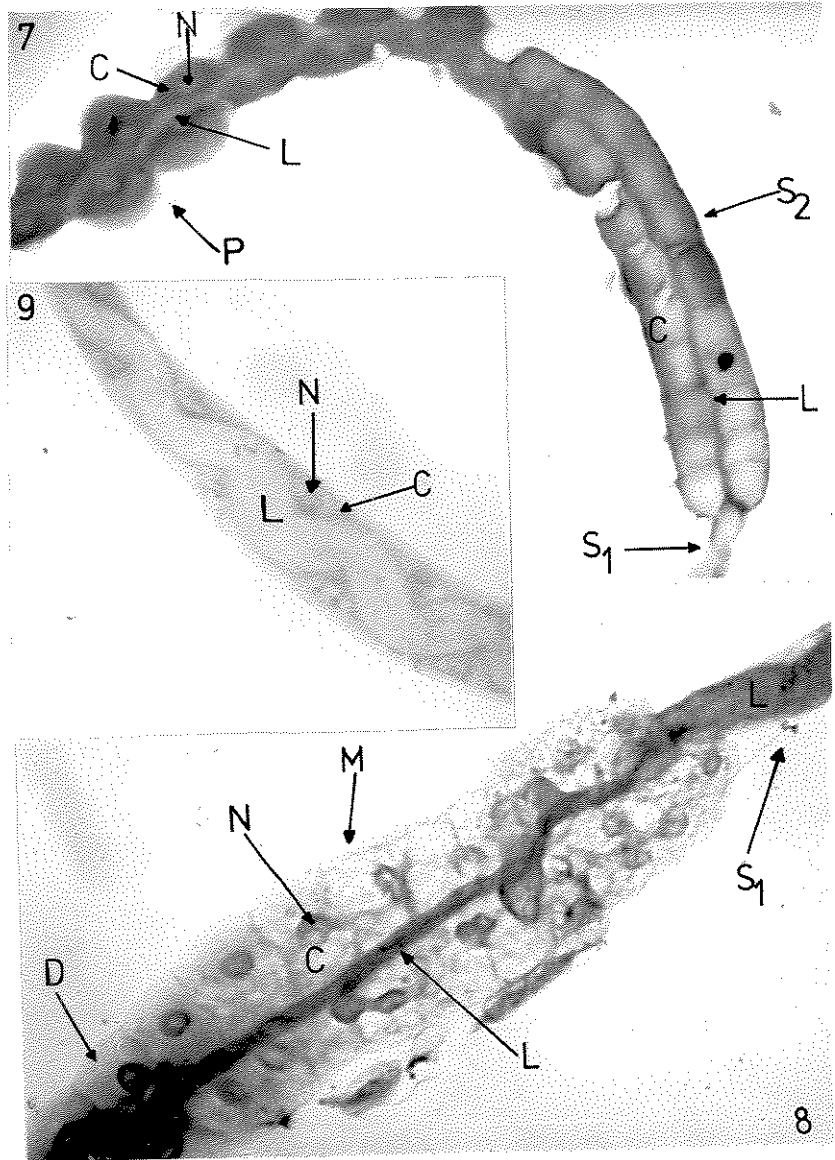


Tabela XIV - Resposta do PAS no citoplasma e lúmen nas diversas porções glandulares em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário.

REAÇÃO	ESTRUTURA	Início do 4º estadio			Fim do 4º estadio			Põe-pupa			
		S ₁	S ₂	S ₃ PROXIMAL DISTAL	S ₁	S ₂	S ₃ PROXIMAL DISTAL	S ₁	S ₂	S ₃ PROXIMAL DISTAL	
PAS controle	cito - plasma	+	+	++	+	+	+++	+	+	+++	+
	lúmen	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
DIASTASE + PAS	cito - plasma	+	+	+	+	+	++	+	+	++	-
	lúmen	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	-

+++ = reatividade muito intensa

++ = reatividade não muito intensa

+ = reatividade fraca

± = reatividade muito fraca

- = não reativo

4.2.2. Glicosaminoglicanas ácidas

Os resultados obtidos quando da coloração do material por soluções de azul de toluidina em diferentes pH, como também após reações de bloqueio acham-se ilustrados na Tabela XV.

Reação	Estrutura	Citoplasma	Lúmen
A.T. pH. 5,0		+ + + + +	-
M. + A.T. pH 5,0		-	-
M. + S. + A.T. pH 5,0		-	-
H. + A.T. pH 5,0		+	-
A.T. pH 4,0		+ + + +	-
M. + A.T. pH 4,0		-	-
M. + S. + A.T. pH 4,0		-	-
H. + A.T. pH 4,0		+	-
A.T. pH 3,4		+ + +	-
M. + A.T. pH 3,4		-	-
M. + S. + A.T. pH 3,4		-	-
H. + A.T. pH 3,4		+	-
A.T. pH 3,0		+ +	-
M. + A.T. pH 3,0		-	-
M. + S. + A.T. pH 3,0		-	-
H. + A.T. pH 3,0		-	-
A.T. pH 2,5		+	-
M. + A.T. pH 2,5		-	-
M. + S. + A.T. pH 2,5		-	-
H. + A.T. pH 2,5		-	-

Tabela XV - Resposta do citoplasma e lúmen das células glandulares ao azul de toluidina em diferentes pH precedida ou não por reações de bloqueio.

A.T. = azul de toluidina; M. = metilação; S. = saponificação; H. = hialuronidase; +++++ = reatividade fortíssima; ++++ = reatividade forte; +++ = reatividade média; ++ = reatividade fraca; += = reatividade muito fraca; - = não reativo.

Evidenciou-se uma alta basofilia citoplasmática e nuclear assim como uma metacromasia no material, em várias fases do desenvolvimento, corado a pH 5,0 (Fig. 10), sendo que esta decresce à medida em que se diminui o pH. A metilação abole a basofilia citoplasmática, a qual não é restaurada após saponificação nem mesmo quando o material é tratado com a solução de azul de toluidina pH 5,0. O tratamento pela hialuronidase testicular remove larga porcentagem da basofilia detectada a pH 5,0, 4,0 e 3,4. Se o material for tratado com a solução de azul de toluidina a pH 3,0, após digestão pela hialuronidase, a basofilia é totalmente abolida (Tabela XV).

Nas montagens totais observou-se em primeiro lugar, que as glândulas recém-removidas e tratadas por brometo de cetil piridinium sofriam extração de um produto que se precipitava ao lado do preparado, este corava-se pela solução de azul de toluidina a pH 3,4. As células glandulares também coravam-se bem. Como particularidade, notou-se que haviam diferenças entre as 3 regiões glandulares quanto à intensidade de cor. As células de S_2 e as proximais de S_3 , exibiam coloração mais forte. Nestas, constataram-se vesículas de tamanho variado, bem coradas e destacando-se sobre o citoplasma. Em cortes histológicos esta observação poderá corresponder às vesículas bem coradas ligeiramente metacromáticas e de centro livre de coloração (Fig. 11). O centro das vesículas apresentava-se sem coloração, mas quando observado em microscópio de polarização revelava uma birrefringência em forma aproximada de cruz de malta.

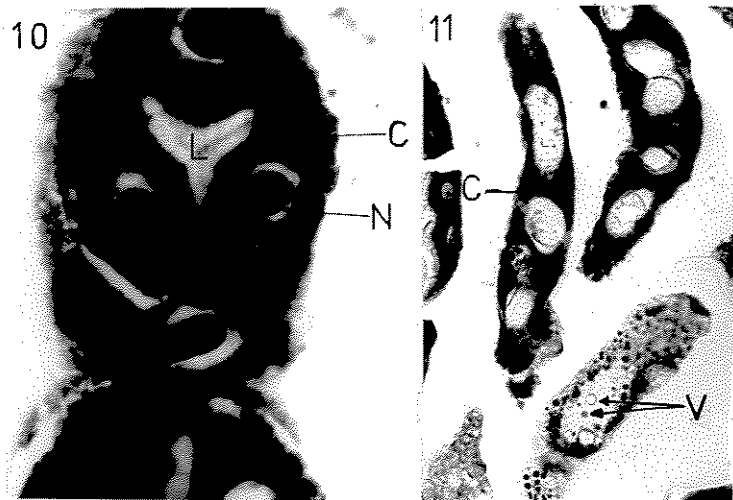


Fig. 10. Região S_3 da glândula salivar em corte de larva de 4º estadio. Alta basofilia citoplasmática (C) e nuclear (N) das células coradas pela solução de azul de toluidina a pH 5,0. Lúmen não se apresenta corado (L), exceto por filamentos do bordo apical celular. 768X.

Fig. 11. Corte de larva de 4º estadio corada com azul de toluidina pH 4,0. Observam-se no lúmen e no citoplasma vesículas de paredes bem coradas (V). Citoplasma (C); 376X.

Os resultados obtidos para a Concentração Eletrolítica Crítica (C.E.C.) estão ilustrados na Tabela TVI.

Tabela XVI. "Concentração Eletrolítica Crítica" das glândulas salivares de *R. spatiten* em diferentes fases do desenvolvimento larval.

	1º estadio larval	Início de 4º estadio larval	Fim de 4º estadio larval	Pré-pupa
	Citoplasma Lúmen	Citoplasma Lúmen	Citoplasma Lúmen	Citoplasma Lúmen
Azul de Alcian pH 5,0+ MgCl ₂ 0,05 M	A++++	A++++	A+++	A+++
Azul de Alcian pH 5,0+ MgCl ₂ 0,2M	A+++	A++	A+	A+
Azul de Alcian pH 5,0+ MgCl ₂ 0,4M	A+	A+	A+	A+
Azul de Alcian pH 5,0+ MgCl ₂ 0,8M	A+	A ⁻	A ⁻	A ⁻
Azul de Alcian pH 5,0+ MgCl ₂ 0,9M	A ⁻	A ⁻	A ⁻	A ⁻
Azul de Alcian pH 5,0+ MgCl ₂ 1,0M	NC	A ⁻	NC	A ⁻

NC = não corado; - = não observado; A++++ = azul fortíssimo;
 A+++ = azul forte; A++ = azul médio; A+ = azul fraco;
 A⁻ = azul fraquíssimo.

Verificou-se pelo exame dos preparados, que as soluções de azul de Alcian coravam os preparados com intensidade decrescente à medida que se aumentava a molaridade do $MgCl_2$ presente na solução corante. Utilizando-se solução de azul de Alcian adicionado de $MgCl_2$ (0,9M), podia-se ainda detectar leve coloração citoplasmática que se apresentava com aspecto de rede (Fig. 12). Os cortes de larvas em fim de 4º estadio quando corados com azul de Alcian a 0,9M de $MgCl_2$, exibiam, principalmente, em S_3 , vesículas com paredes muito bem coradas (Fig. 13). Estas vesículas eram também vistas no lúmen da glândula. Esta observação é semelhante à dos preparados corados com azul de toluidina a pH 3,4.

Em montagens totais de glândulas coradas com azul de Alcian a pH 2,5, observou-se que estas não apresentavam coradas as regiões S_1 (Fig. 14) e a metade distal de S_3 . As células da região proximal de S_3 e distal de S_2 coravam-se mais fortemente do que as outras regiões. (Fig. 15). Em alguns preparados a coloração foi mais evidente na porção basal das células.

Os preparados tratados com solução de azul de Alcian a pH 1,0, coravam-se muito fracamente. A região S_1 e a metade distal de S_3 não coravam. Justamente coravam-se bem as células proximais de S_3 e distais de S_2 que ficavam assim muito bem evidenciadas (Fig. 16).

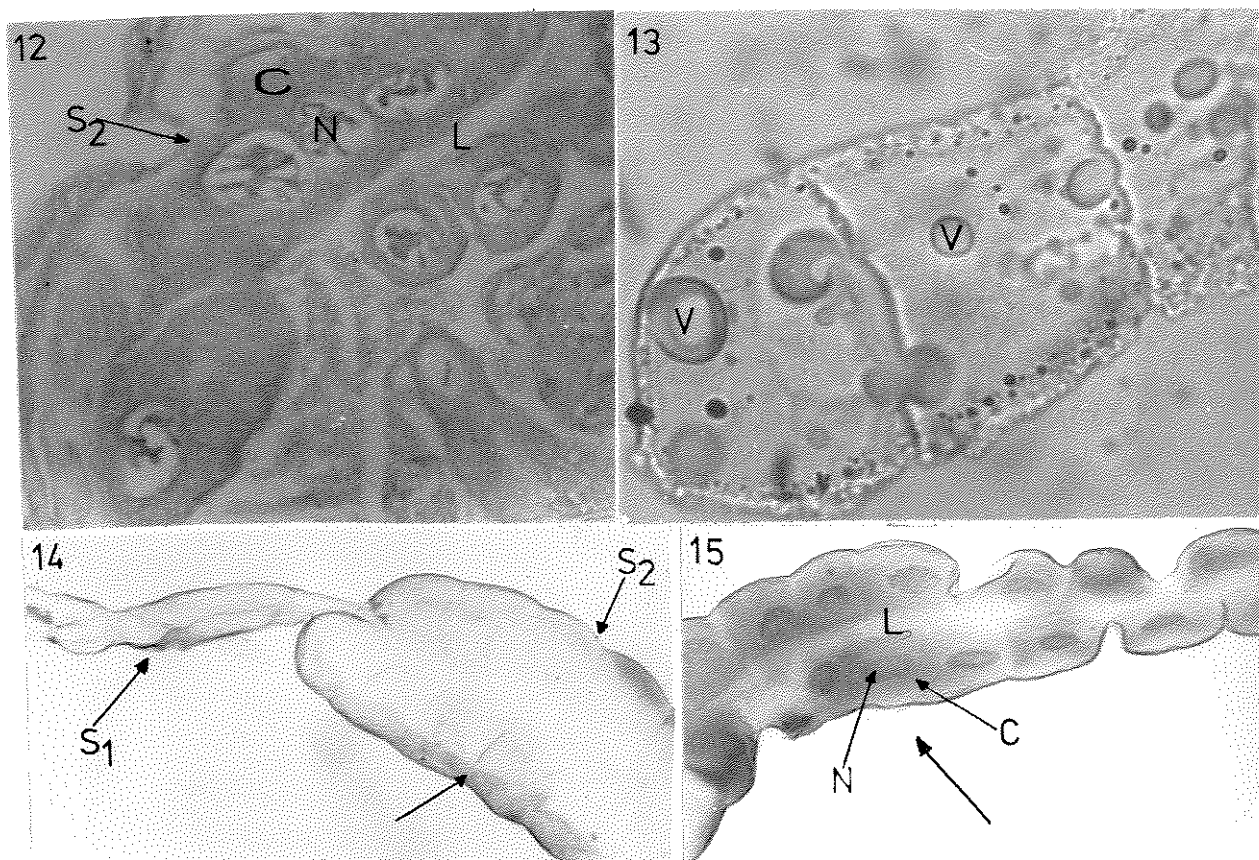


Fig. 12. Corte em parafina (7 μ m de espessura) de pr -pupa tratado pela soluço de azul de Alcian adicionada de $MgCl_2$ 0,9M. O citoplasma em forma de rede (C) na região S_2 da glândula (seta) apresenta-se levemente corado. Núcleo (N); lúmen (L). 375X.

Fig. 13. Vesículas (V) na luz da glândula, evidenciada após tratamento pela soluço de azul de Alcian adicionada de $MgCl_2$ 1,0 M. 2.000X.

Fig. 14 e 15. Montagem total da glândula salivar em fim de 4  est dio larval corada com azul de Alcian a pH 2,5. 14. Observa-se uma colora o intensa apenas na porão basal das células (indicado na seta) 375X. 15. Reatividade maior na região distal de S_2 e proximal de S_3 (seta). 375X.
N = Núcleo; C = Citoplasma; L = Lúmen.

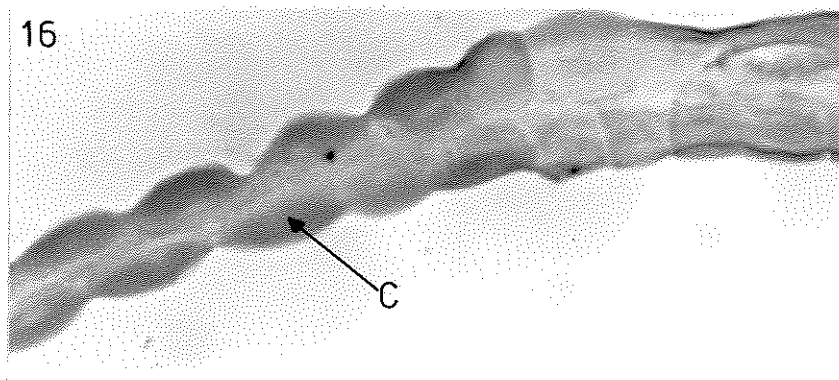


Fig. 16. Montagem total da glândula salivar de *P. spatitergum* corada com azul de Alcian a pH 1,0. Maior reatividade do citoplasma (C) na porção distal de S_2 e proximal de S_3 . 375X.

4.2.3. Radicais eletropositivos

A reatividade ao Xylidine-ponceau 3RS a pH 1,71 manifestou-se nas glândulas salivares em todas as fases do desenvolvimento estudadas, porém esta reatividade foi mais intensa na região S_2 (Fig. 17) e distal de S_3 . O produto de secreção no lúmen das glândulas também mostrou-se reativo ao corante (tabela XVII). Quando a reação foi precedida por desaminação, essa reatividade diminuiu significativamente. (Fig. 18). O mesmo padrão de coloração detectado com Xylidine-ponceau 3 RS a pH 1,71, ocorreu quando o tratamento foi realizado com Xylidine-ponceau 3 RS a pH 8,0, porém a intensidade de coloração foi muito menos intensa (Fig. 19).

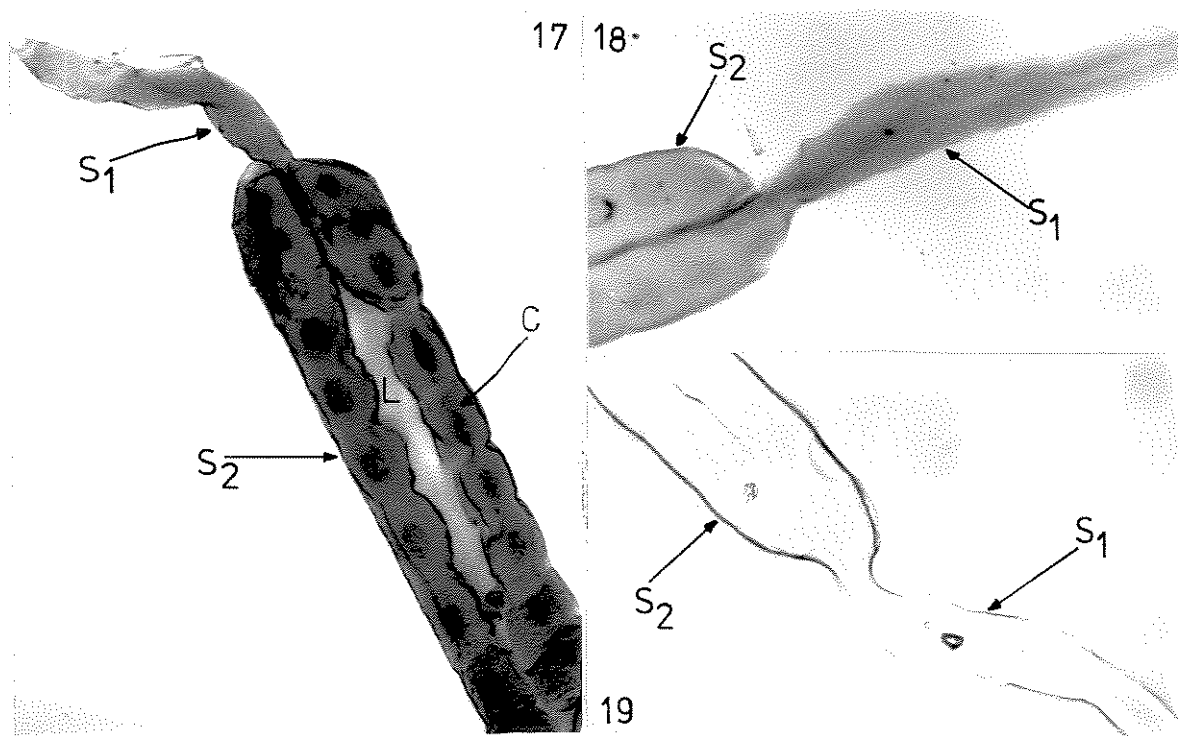


Fig. 17. Montagem total de glândula salivar em início de 4º estadio larval. Citoplasma (C) da região S₂ mais reativo ao Xylidine-ponceau 3 RS pH 1,71 comparado com o da região S₁. Lúmen (L) da região S₂ fracamente reativo. 500X.

Fig. 18. Glândula salivar de larva no fim do 4º estadio tratada com Xylidine-ponceau 3 RS pH 1,71, após reação de desaminação. Observa-se uma diminuição da reatividade em S₂. 400X.

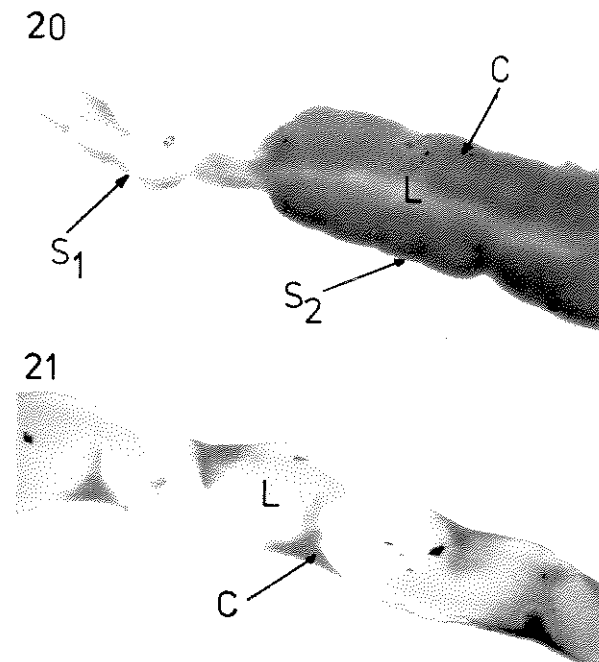
Fig. 19. Montagem total da glândula salivar no início do 4º estadio larval tratada com Xylidine-ponceau 3 RS a pH 8,0. Intensidade de coloração sensivelmente de crescida. 400X.

TABELA XVII - Reações efetuadas para detecção de proteínas em glândulas salivares de *Bradusia spatitengum*.

REAÇÃO	ESTRUTURA	Início de 4º estadio		Fim de 4º estadio		Pré-pupa		
		S1	S2 proximal distal	S1	S2 proximal distal	S1	S2 proximal distal	
Xylidine-ponceau pH 1,71	Citoplasma	++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
	lúmen	+	+	+	+	-	+	+
Desaminação + Xylidine-ponceau pH 1,71	Citoplasma	+	++	+	+	+	+	+
	lúmen	-	-	-	-	-	-	-
Xylidine-ponceau pH 8,0	Citoplasma	+	++	+	+	+	++	+
	lúmen	+	+	+	+	+	+	+
Fast-green pH 8,1	Citoplasma	++	++++	++	+++	+	+++	+
	lúmen	+	++	+	++	+	+	-

- não reativo +++ reatividade forte
+ reatividade fraca ++++ reatividade fortíssima
++ reatividade média

Resultados semelhantes aos obtidos após coloração com Xylidina-ponceau 3 RS a pH 8,0 foram evidenciados quando se realizou a coloração com Fast-green a pH 8,1, porém neste caso a intensidade de coloração foi mais intensa (Figs.: 20 e 21).



Figs.: 20 e 21. Montagem total da glândula salivar de larvas em início de 4º estadio tratadas com solução de Fast-green a pH 8,1.

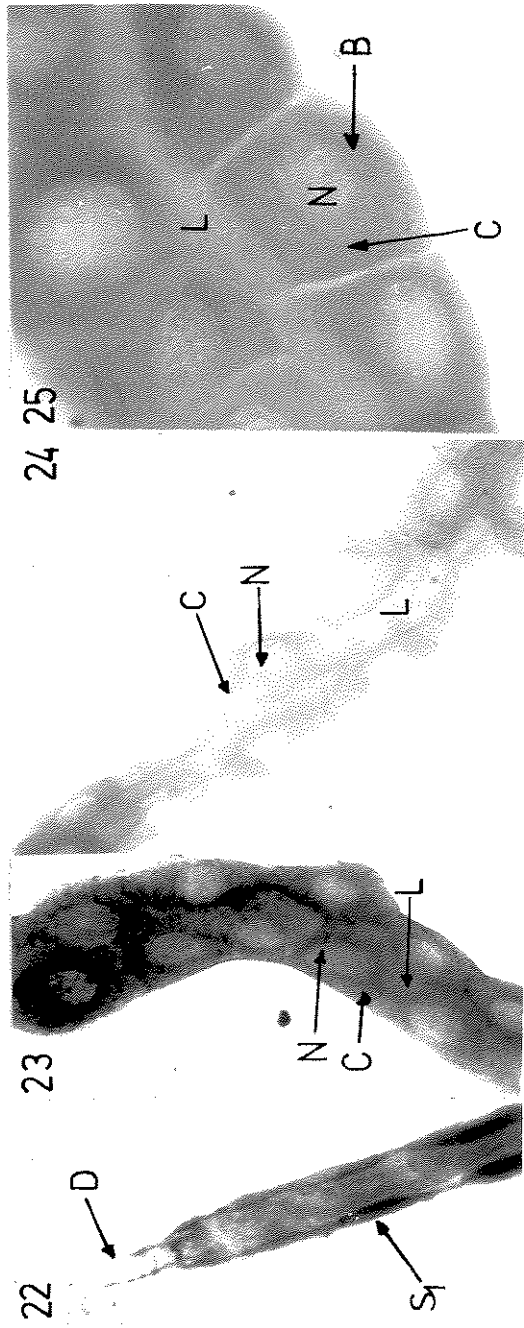
20 - Reatividade maior no citoplasma (C) da região S₂ do que em S₁. L = lúmen. 400X.

21 - Região S₃. Evidencia-se uma reatividade maior no citoplasma (C) que no lúmen (L) 400X.

4.2.4. Lipídios

Os dados obtidos com a coloração pelo Negro do Sudão revelaram as células glandulares da região S_1 (Fig. 22) e S_3 (Fig. 23) igualmente coradas, com exceção da região proximal de S_3 em que a intensidade foi menor. (Fig. 24). A coloração é marcante na porção basal dessas células e a secreção no lúmen apresenta-se também reativa ao corante. As células glandulares da região S_2 (Fig. 25) apresentam-se menos coradas em relação a S_1 e à parte distal de S_3 . No lúmen a resposta também foi mais fraca. Quando as glândulas foram submetidas ao tratamento extrativo com metanol-clorofórmio o grau de reatividade ao Negro do Sudão diminuiu.

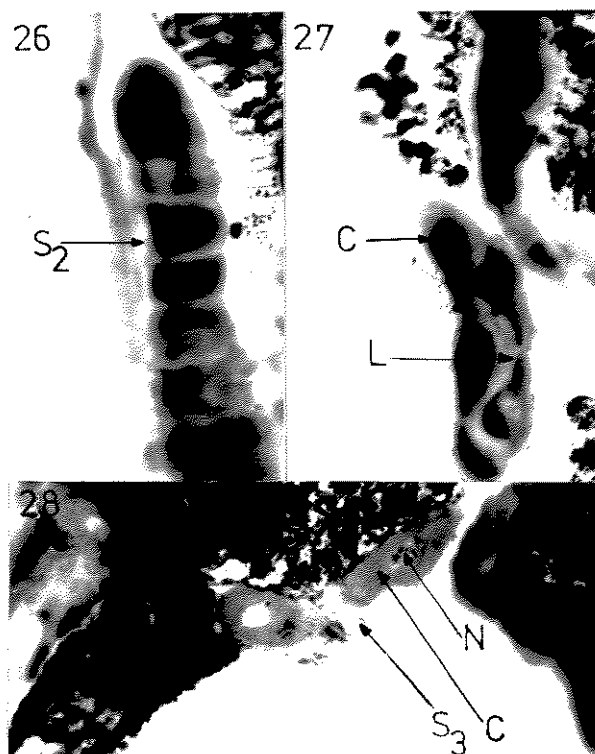
As diferentes intensidades ao Negro do Sudão foram igualmente observadas nas 3 fases do desenvolvimento estudadas.



Figs.: 22 a 25. Montagem total de glândulas salivares tratadas com Negro do Sudão.

22. Região S_1 em início de 4º estadio larval altamente reativa ao corante (D = ducto). 500X;
23. Região S_3 distal mostrando o citoplasma (C) altamente reativo, N = núcleo. 500X.
24. Porção proximal de S_3 . C = citoplasma; N = núcleo; L = lúmen. 500X.
25. Região S_2 . Porção basal das células mais coradas (B). C = citoplasma; N = núcleo; L = lúmen. 500X.

Quanto ao teste de Baker, constatou-se mesmo padrão de resposta nas diferentes regiões glandulares (Figs. 26 e 27) e em diferentes fases de seu desenvolvimento. Após a extração pela piridina, a reatividade apresentou-se sensivelmente decrescida (Fig. 28).



Figs.: 26 a 28. Teste de Baker realizado em cortes em congelação. 26. Região S_2 de larva em início de 4º estadio, fortemente corada. 437X. 27. Citoplasma (C) da região S_3 em fim de 4º estadio larval corado, enquanto o lúmen (L) não se cora. 437X. 28. Região S_3 da glândula salivar em fim de 4º estadio larval. Após a extração pela piridina a coloração apresenta-se sensivelmente decrescida. C = citoplasma; N = núcleo. 437X.

Por outro lado, em preparados tratados com Rodamina 6 G O foram evidenciados :

a) Núcleos birrefringentes fluorescentes em todas as porções glandulares, especialmente em S_2 (Fig. 29).

b) Birrefringência no contato entre as membranas celulares em S_2 (Fig. 29).

c) Células distais da região S_3 com sobreposição de birrefringência fluorescente (Fig. 30)

d) Lúmen da porção proximal de S_3 (Fig. 31) mais birrefringente que o distal da mesma. (As diferenças se relacionam apenas com a intensidade e não com o padrão de birrefringência).

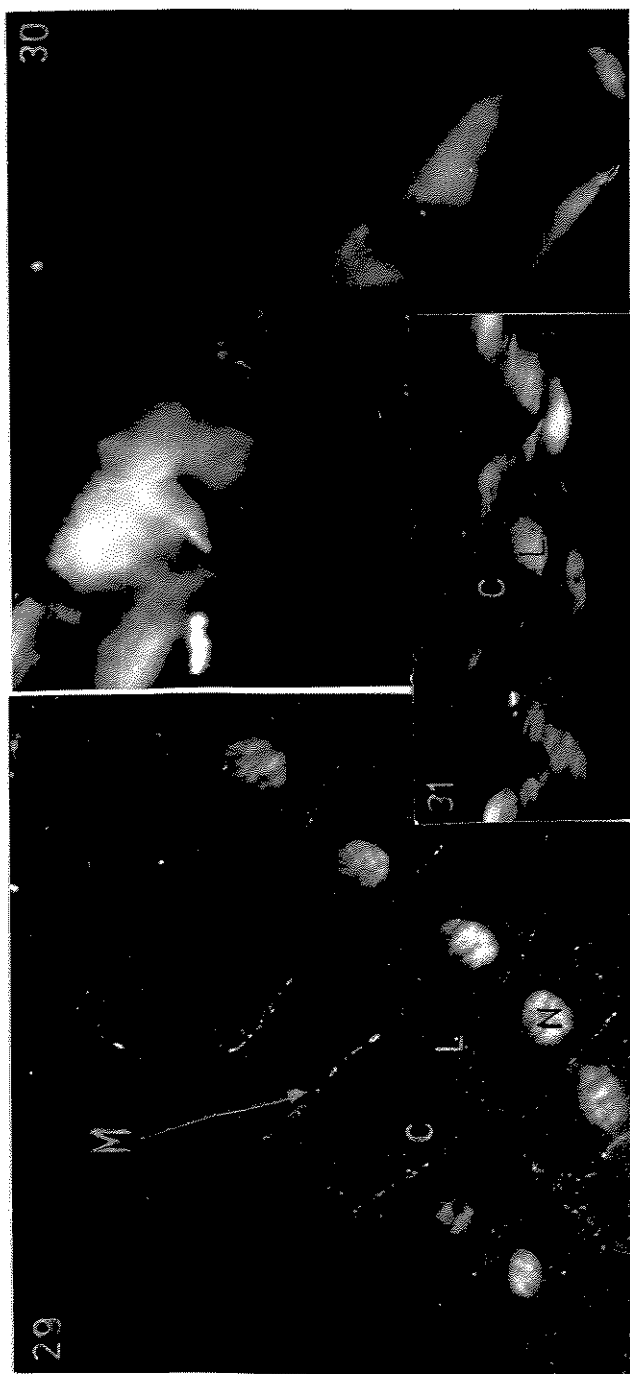
Procedendo-se a uma extração prévia com metanol-clorofórmio, destacam-se :

a) Núcleos birrefringentes.

b) Contato entre as membranas ainda birrefringentes.

c) No lúmen da região proximal de S_3 , birrefringência fluorescente, o mesmo não ocorrendo no lúmen da região distal da mesma.

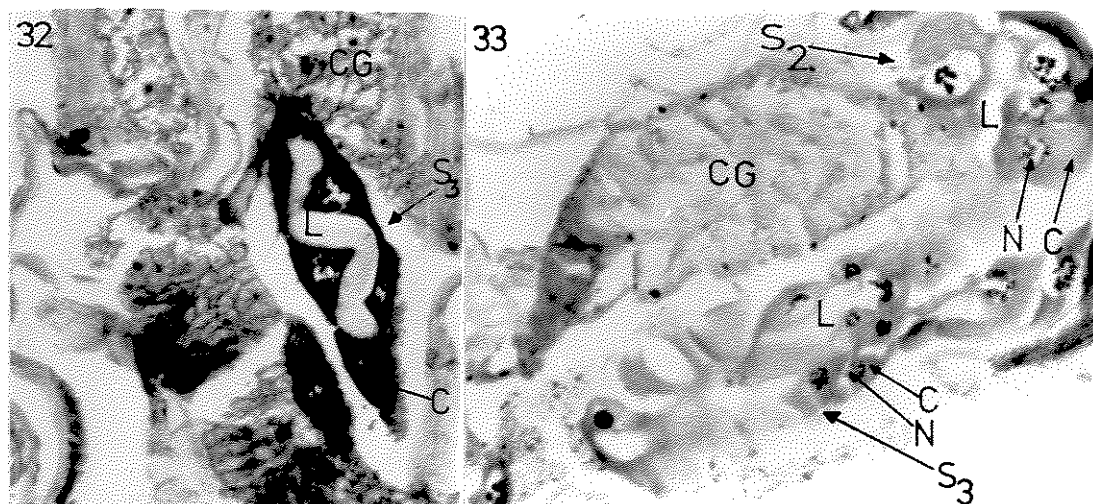
d) Em pré-pupa, o citoplasma de algumas células da região S_3 continuaram levemente birrefringentes.



Figs.: 29 a 31. Montagem total de glândulas salivares tratadas com solução de Rodamina 6 G 0. 29. Região S_2 em início de 4º estadio larval. Núcleos (N) e contato entre células contíguas na região das membranas celulares (M) altamente birrefringentes. C = citoplasma; L = lúmen. 30. Sobreposição de birrefringência fluorescente na região distal de S_3 . 400X. 31. Região proximal de S_3 onde o material no lúmen da glândula aparece altamente birrefringente (L); C = citoplasma. 256X.

4.2.5. Detecção de RNA

O citoplasma e o núcleo das células glandulares em todas as fases observadas, apresentaram-se reativos à Galocianina-alúmen de cromo (Fig. 32). Não se observaram porém, diferenças entre as diferentes porções glandulares. Tanto os preparados corados por Galocianina como os corados por azul de toluidina a pH 3,4, mostraram sensibilidade aos corantes decrescida quando as reações foram precedidas com digestão por RNase (Fig. 33). No caso da coloração obtida com a solução de azul de toluidina a pH 3,4 houve redução praticamente de 50%, quando se utilizou tratamento prévio com RNase.



Figs.: 32 e 33. Corte em parafina (10 μ m de espessura) de pré pupa submetido à reação da Galocianina-alúmen de cromo. 32. Região S_3 distal onde se observa alta reatividade no citoplasma (C), porém, no lúmen (L) a resposta é negativa. CG = corpo gorduroso. 500X. 33. Reatividade sensivelmente menor do citoplasma (C) quando o material foi previamente tratado com RNase. L = Lúmen; N = núcleo; CG = corpo gorduroso. 500X.

4.2.6. Anisotropia

As glândulas dissecadas (montagens totais) sem coloração, quando examinadas ao microscópio de polarização, revelaram intensa birrefringência na região próxima do envólucro nuclear e bordo estriado celular. A porção citoplasmática proximal da região S_1 da mesma forma que a de algumas células da região S_3 foi altamente birrefringente. (Fig. 34).

Em material no início do 4º estadio larval, submetido à coloração pelo Negro do Sudão, os núcleos e a porção basal das células epiteliais mostraram-se mais birrefringentes quando comparados com os de pré-pupa.

Em preparações coradas com Xylidine-ponceau 3RS verificou-se a presença de grãos altamente birrefringentes no citoplasma e lúmen das células glandulares. Efeitos de dicroismo foram também visualmente evidentes no citoplasma e lúmen nos preparados corados com Negro do Sudão e Xylidine - ponceau 3 RS.

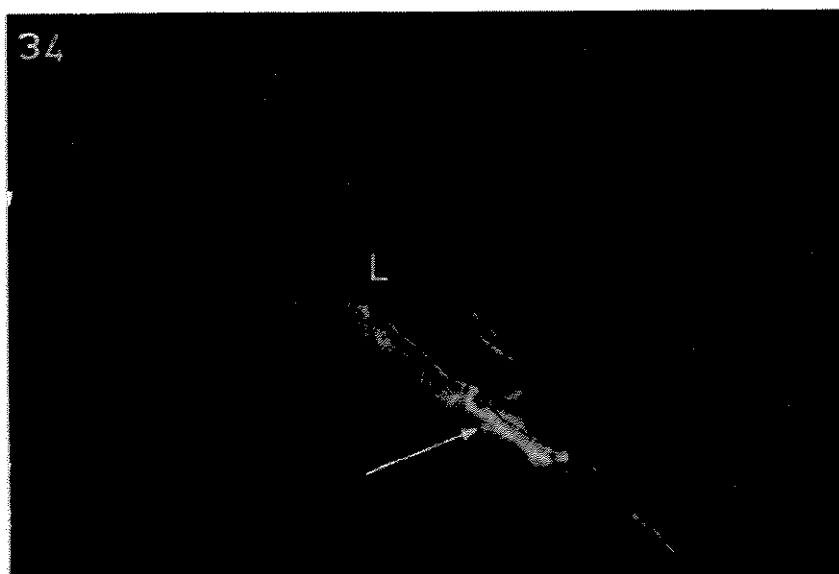


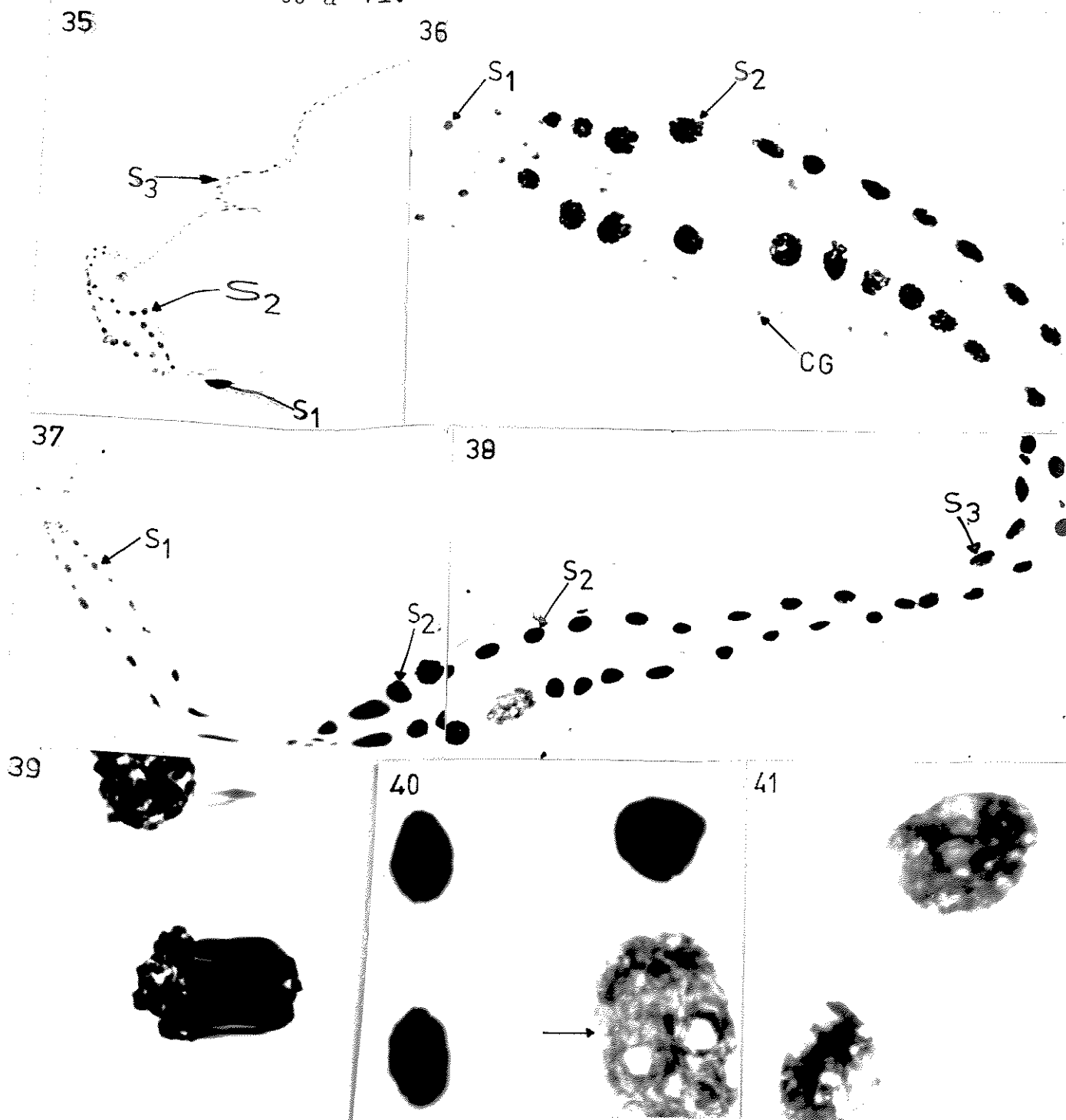
Fig. 34. Região S₁ da glândula salivar de pré-pupa não corada, observada com microscópio de polarização (analisador e polarizador cruzados). Verifica-se alta birrefringência (seta) na porção citoplasmática proximal de S₁, em contato com o lúmen (L). 1250X.

Figs. 35 a 41. Montagem total de glândulas salivares de *B. spatitergum* em diferentes fases do desenvolvimento larval submetidas à reação de Feulgen.

35. Glândula salivar de larva do 1º estadio, mostrando os núcleos das regiões S₁, S₂ e S₃. 450X. 36. Glândula salivar no início do 4º estadio, onde aparecem alguns núcleos da região S₁ e S₂. Ao lado da região S₂ aparecem alguns núcleos do corpo gorduroso (CG) 450X. 37. Núcleos da região S₁ e S₂ de pré-pupa. 450X. 38. Núcleos da região S₂ e S₃ de pré-pupa. 450X. 39. Região S₂ mostrando núcleos da glândula salivar no início do 4º estadio larval. (1800X). 40. Núcleos da região S₂ de pré-pupa. Um dos núcleos já apresenta início de degeneração. (1800X). 41. Núcleos da região S₃ com aspecto em degeneração. (1.800X).

4.3. Determinação dos Valores Feulgen-DNA nas Glândulas Salivares.

O aspecto dos núcleos das diversas regiões glandulares, submetidos à reação de Feulgen, acha-se documentado nas figuras 35 a 41.

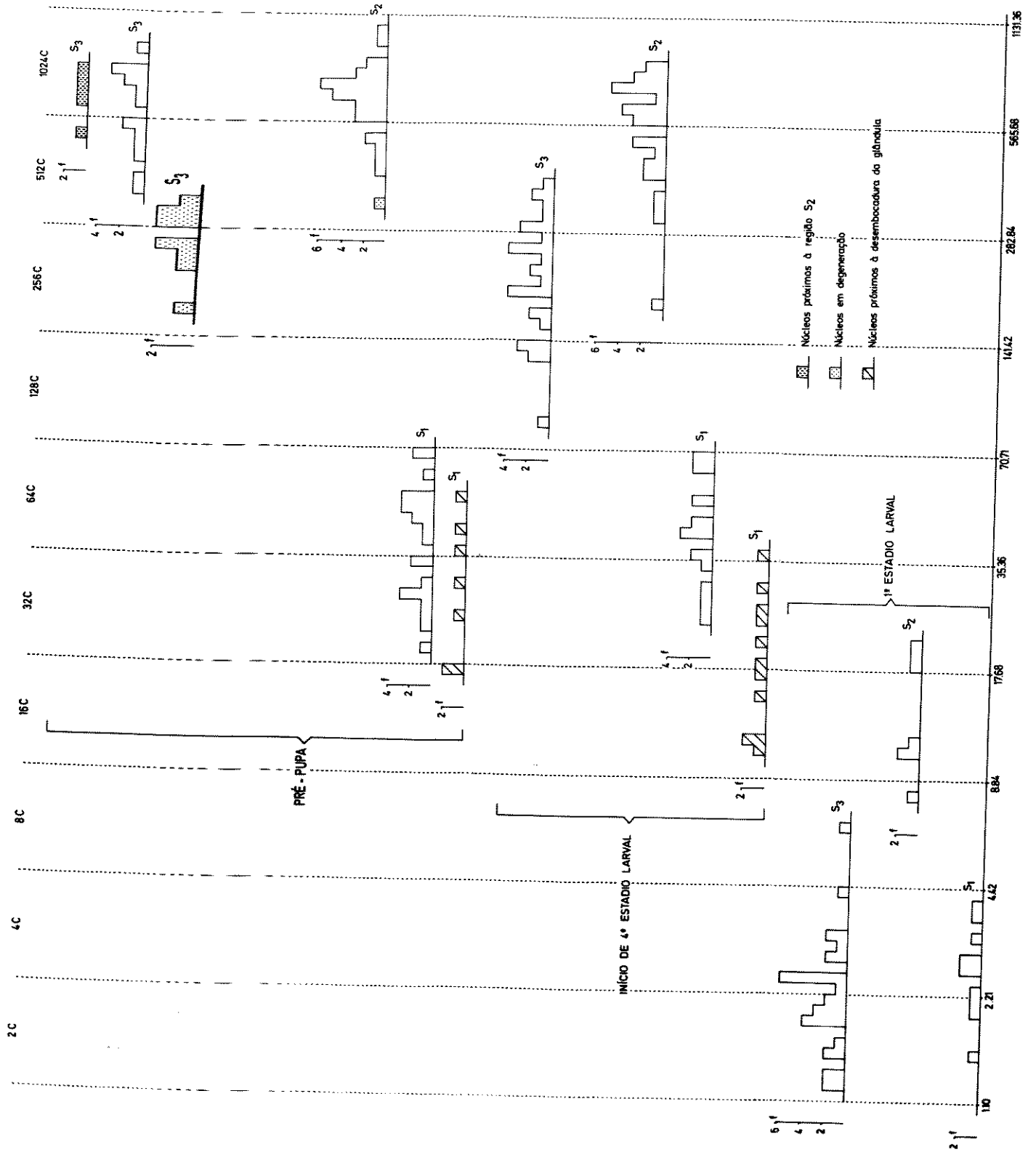


Os núcleos da região S_2 de larvas do 1º estágio, apresentavam-se maiores quando comparados com os das regiões S_1 e S_3 (Fig. 35). Porém, os núcleos das 3 regiões glandulares eram menores em relação ao das mesmas regiões de larvas do início do 4º estágio e pré-pupa (Figs. 36, 37 e 38). Os núcleos da região S_3 de pré-pupa aparentavam possuir tamanho semelhante aos da região S_2 da mesma fase do desenvolvimento. (Fig. 38). Comparando-se também núcleos da região S_2 de larvas no início do 4º estágio (Fig. 39) com núcleos da mesma região em fim de 4º estágio larval, verificou-se um aumento ligeiro no tamanho dos mesmos. Em pré-pupa começam a aparecer, na região S_3 , alguns núcleos aparentando início de degeneração (Fig. 41), eventualmente núcleos da região S_2 podem também apresentar tal aspecto (Fig. 40).

Os valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias, para as 3 regiões glandulares nas várias fases do desenvolvimento larval, foram distribuídos numa escala em P.G. de tal sorte que, entre os valores 50 e 100, 100 e 200, 200 e 400 etc, existissem 10 classes intermediárias (Ferreira col., 1967) (Fig. 42).

No presente trabalho denomina-se 2C o intervalo de duplicação com os menores valores Feulgen-DNA detectados (regiões S_1 e S_3 de larvas do 1º estágio).

Fig. 42. Histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA de núcleos das 3 regiões glandulares de *Bradusia spati-*
tegam em diferentes fases do desenvolvimento pós-
embrionário. f = frequência; histogramas hachurea-
dos = núcleos próximos à desembocadura da glândula ;
histogramas pontilhados = núcleos em degeneração; his-
togramas preenchidos com traços = núcleos próximos à
região S₂.



Através da análise dos histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA, podemos inferir que a região S_2 das glândulas salivares de larvas do 1º estadio apresenta valores Feulgen-DNA ocupando intervalos de duplicação mais elevados quando comparada com a região S_1 , na mesma fase do desenvolvimento. Os valores Feulgen-DNA para a maioria dos núcleos da região S_3 apresentam, por outro lado, uma dispersão contendo intervalos de duplicação iguais aos de S_1 . Intervalos 2C e 4C ocorrem, portanto, para as regiões S_1 e S_3 e 8C, 16C e 32C para a região S_2 , das glândulas salivares dessa fase do desenvolvimento larval.

No início do 4º estadio larval, os valores Feulgen-DNA dos núcleos da região S_1 próximos à desembocadura da glândula, (histogramas hachureados da Fig. 42) são ligeiramente inferiores àqueles mais próximos da região S_2 . Os núcleos próximos à desembocadura da glândula ocupariam os intervalos de duplicação 16C, 32C e 64C, enquanto os próximos à S_2 estariam contidos nos intervalos 32C e principalmente 64C. Ambos, porém, apresentam seus valores Feulgen-DNA sensivelmente menores que os das regiões S_2 e S_3 . Na região S_2 foram encontrados valores Feulgen-DNA distribuídos nos intervalos 256C, 512C e principalmente 1024C. Na região S_3 os valores Feulgen DNA acham-se contidos nos intervalos 128C, 256C e 512C. De modo geral, a distribuição dos valores Feulgen-DNA da região S_2 alcança os intervalos mais elevados apresentados nesta fase.

As regiões S_2 e S_3 , (mesmo de núcleos em início de degeneração) de pré-pupa continuam a ter seus valores Feulgen-DNA mais elevados que os de S_1 . Em S_1 encontraram-se valores Feulgen-DNA correspondentes aos intervalos de duplicação 16C, 32C e 64C. O intervalo de duplicação 16C é representado por núcleos próximos à desembocadura da glândula. Os valores Feulgen-DNA para S_2 e S_3 estão contidos nos intervalos 512C e 1024C, exceto os de núcleos em início de degeneração, (S_3) os quais ocupam os intervalos 256C e 512C (histogramas pontilhados). Em termos de distribuição de valores, não se constatou diferença entre os núcleos de S_3 formando o corpo mediano dessa região, e aqueles próximos a S_2 (histogramas preenchidos com traços).

Considerando-se a região S_1 ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, observa-se que do 1º para o início do 4º estadio larval, os núcleos sofreram 3 a 4 duplicações em seu conteúdo Feulgen-DNA; isso sem levar em conta pelo menos uma duplicação já ocorrida, anterior à amostragem (núcleos 4C). Dessa fase para a de pré-pupa, parece não ter havido duplicação do conteúdo Feulgen-DNA.

Quanto à região S_2 , há indicações de que ao redor de 5 duplicações do conteúdo Feulgen-DNA tenham ocorrido do 1º (momento da amostragem) ao início do 4º estadio larval. Contudo, anteriormente à amostragem de larvas do 1º estadião núcleos com até 4 duplicações do conteúdo de DNA já estavam presentes. Aparentemente não há alteração no perfil de distribuição dos valores Feulgen-DNA quando a larva passa do 4º es-

tadio larval para a fase de pré-pupa, aparentando os núcleos, portanto terem sofrido um total de 8 a 9 duplicações do conteúdo Feulgen-DNA.

No que concerne à região S_3 , 6 a 7 duplicações do conteúdo Feulgen-DNA são sugeridas como tendo ocorrido do 1º para o início do 4º estadio larval. Do 4º estadio larval para a fase de pré-pupa pelo menos mais uma duplicação deve ter ocorrido. Levando-se em conta que anteriormente à amotrigem de larva do 1º estadio pelo menos uma duplicação de DNA já havia ocorrido, na fase de pré-pupa são encontrados núcleos que sofreram 8 a 9 duplicações de seu conteúdo Feulgen-DNA.

5. DISCUSSÃO

As glândulas salivares de *Bradysia spatitergum* apresentam alguns aspectos morfológicos que diferem daqueles apresentados em outros Sciarídeos como, por exemplo *Bradysia hygida* (Sauaia e Alves, 1968) e *Rhynchosciara americana* (Moraes e Miranda, 1974). O número de células glandulares nestas espécies, é maior (*B. hygida* = 202 células (Sauaia e Alves, 1968); *R. americana* = 311 células (Moraes e Miranda, 1974) do que aquele apresentado por *Bradysia spatitergum* (126 células). Em *B. spatitergum* foram detectadas no presente trabalho aproximadamente 18 células em S₁, 23 em S₂ e 85 em S₃, enquanto em *R. americana* foram encontradas 51, 199 e 61 células para as três regiões fundamentais das glândulas (Moraes e Miranda, 1974). Larvas de *B. spatitergum* apresentam três regiões glandulares bem distintas, diferindo do que se verifica em *Bradysia hygida*, em que seis regiões glandulares foram descritas por Sauaia (1971). A região denominada ístmo por este autor, em *B. spatitergum*, correspondente à região S₁. A região S₂ (granulosa) de *B. hygida* corresponde à região filamentososa (S₂) de *B. spatitergum*. O lúmen com a forma helicoidal da região S₃ em *B. spatitergum* desde a sua porção proximal até a distal, identifica-se com o de *B. hygida* apenas com re

lação à porção distal desta, pois na porção proximal de S_3 em *B. hygida* parece haver uma modificação no tamanho do mesmo (Sauaia, 1971).

Observam-se também diferenças quanto à forma das células das glândulas salivares de *B. spatitergum* se comparadas com as de *Bradusia sp* (Cunha e col., 1969).

As glândulas salivares de *B. spatitergum* parecem identificar-se quanto à forma, disposição das células e localização do núcleo, com as glândulas salivares de *Sciara coprophila* (David e Swift, 1965). No entanto quando observadas em microscópio de fase, as células glandulares de *Bradusia spatitergum* apresentam características que indicam um índice de refração maior na porção basal das mesmas. Este achado difere daquele deduzido de fotos publicadas de glândulas salivares de *Sciara coprophila*, observadas em mesmas condições experimentais, em que o índice de refração parece ser menor (David e Swift, 1965). Possivelmente, o índice de refração maior na porção basal das células glandulares de *B. spatitergum* esteja relacionado com uma concentração maior de glicosaminoglicanas ácidas (GAGA) nesta zona; assim pelo menos o indicam os resultados obtidos após reação com azul de Alcian a pH 2,5, nestas glândulas salivares.

De acordo com a metodologia empregada para a detecção de glicosaminoglicanas neutras, e fundamentando-se nos resultados após digestão com diastase, pode-se admitir a presença de glicogênio no citoplasma das células glandulares estudadas, como também de um outro tipo de glicosaminoglicana neu

tra na região proximal de S_3 . Parece haver um aumento na quantidade de glicosaminoglicanas neutras no final do 4º estágio larval e que permanece em pré-pupa. Como a partir do 4º estágio, a concentração de glicosaminoglicanas neutras é maior no lúmen, acreditamos se trate de uma glicoproteína secretada na região proximal de S_3 . Possivelmente esteja sendo transportada para participar na estruturação do puparium, de modo semelhante ao que foi descrito em *Drosophila pseudoobscura* (Harrod, 1972).

A reatividade positiva ao PAS no bordo estriado celular mesmo após digestão enzimática, é indicativa da presença de glicoproteínas estruturais nesta porção celular. A birrefringência observada ao nível deste mesmo bordo é um dado que permite a dedução de que seus componentes apresentam elevado nível de ordenação molecular.

Nas glândulas salivares de *Bradysia spartitergum* demonstrou-se a presença de GAGA, as quais foram pesquisadas através de suas propriedades aniônicas. As técnicas utilizadas, já há longo tempo empregadas em nossos meios científicos, acham-se bem descritas por Lison (1960); Pearse (1970), Mello e Vidal (1972). Para análise dos resultados aceitam-se as pressuposições descritas a seguir. Os radicais aniônicos, responsáveis pelas reações com corantes catiônicos empregados, são: carboxílicos, sulfatos e fosfatos (Lison, 1960). Na presente pesquisa pode-se imediatamente desconsiderar a presença de radicais carboxílicos como responsáveis pela basofilia celular, pelo não retorno dessa propriedade após metila-

ção seguida de saponificação e pela observação de que se torna necessária concentração elevada de $MgCl_2$ (0,9M a 1,0M) adicionado às soluções de azul de Alcian a fim de que se core o citoplasma. Tendo-se em conta que a metilação destrói os grupos sulfatos e fosfatos (Lison, 1960), eliminando as possibilidades de saponificação e consequentemente o retorno da basofilia, admite-se a presença de radicais sulfato e fosfato nos locais que exibiram basofilia nos preparados corados com soluções de azul de toluidina de pH 4,0 a pH 2,5. Confirma esta dedução o fato de se obter uma diminuição considerável da alcianofilia somente a partir da concentração eletrolítica de 0,9M de $MgCl_2$.

Foram detectadas vesículas, na região proximal de S_3 e distal de S_2 no fim do 4º estadio larval, envolvidas por uma parede com reatividade positiva ao azul de Alcian em uma concentração eletrolítica de até 0,9M e 1,0M de $MgCl_2$ e que apresentaram também reatividade ao azul de toluidina, de modo a permitir a dedução de que as substâncias que a compõem sejam glicosaminoglicanas ácidas sulfatadas. Uma vez que estas vesículas foram encontradas no lúmen das glândulas examinadadas, conclui-se que se está diante de um processo de secreção especializado. Considerando-se que nestas vesículas por métodos apropriados, foi detectado um conteúdo anisotrópico é válido concluir-se a natureza complexa dessas vesículas. A idéia de que haja mineralização (calcificação) do interior destas estruturas é aceitável principalmente se considerarmos que reações para cálcio foram positivas em muitos grânulos citoplasmáticos.

É interessante do ponto de vista de especialização celular, lembrar-se que, o citoplasma das regiões mais ricas em glicosaminoglicanas ácidas, no presente caso sulfatadas, são, por outro lado, as mais pobres em lipídios, conforme será discutido mais adiante.

Os resultados encontrados após coloração pelo Xylidine-ponceau a pH 1,71 e 8,0 sustentam a proposição de que as proteínas glandulares, estruturais e de secreção contêm, nas condições desta pesquisa, grupos eletropositivos totais evidenciados a pH 1,71 e de arginina/lisina (mais provavelmente desta última) salientados a pH 8,0. A maior reatividade ao Xylidine-ponceau 3 RS na região S_2 , denunciando radicais eletropositivos, em adição a outros dados reportados acima, conduz à dedução de que aí ocorrem provavelmente, complexos proteoglicânicos que compõem o edifício macromolecular necessário as funções da área em apreço. De acordo com o descrito nos resultados, alguns grãos observados tanto no citoplasma como dentro do lúmen, corados com Xylidine-ponceau exibiam birrefringência, o que revela seu estado de agregação e sua ordenação molecular.

Quanto aos resultados obtidos com os métodos utilizados para a detecção de lipídios, sabe-se que o Negro do Sudão, em solução alcoólica saturada, cora os lipídios em geral, sem que se possa especificar os tipos. Contudo, quando esta reação é acompanhada de fenômenos anisotrópicos é muito provável que sejam fosfolipídios os responsáveis por tais fenômenos (Vidal e Rozzo, 1969). Assim, de acordo com o des-

crito, a região basal de todas as células sendo sudanofílicas e anisotrópicas devem ter um empilhamento de estruturas membranosas. Tal arranjo pode ser devido a uma concentração maior de organelas (retículo endoplasmático e/ou mitocôndrias) com um conseqüente ordenamento das mesmas.

Uma vez que o teste de Baker não revelou diferenças entre as várias regiões da glândula e o Negro do Sudão o fez, conclui-se que as diferenças por este detectadas devem ser provocadas por lipídios não estruturais (não fosfolipídios) os quais se fariam presentes em S_1 e porção distal de S_3 (material no lúmen). A especificidade da Rodamina foi testada por extrações com metanol-clorofórmio. Como após a extração a reatividade à Rodamina no lúmen e no citoplasma da região S_3 distal não mais se manifestou, admite-se a presença de fosfolipídios nesta porção glandular.

A sensibilidade à RNase nos preparados tratados com azul de toluidina a pH 3,4 ou por Galocianina-alúmen de cromo evidencia a presença de RNA no citoplasma e núcleo das células glandulares. Não foram detectadas visualmente diferenças quanto a este componente nas diversas regiões das glândulas e durante diversas etapas de desenvolvimento.

Os resultados citoquímicos encontrados em *B. spatitergeum* acham-se sumarizados na tabela XVIII e diferem dos relatados para *Bradysia sp* (Cunha e col., 1969), *Rhynchosciara americana* (Winter e col., 1976) e *Rhynchosciara sp* (George, 1968), sendo que, nesta última espécie está presente no citoplasma das células glandulares uma grande concentração de

glicosaminoglicanas ácidas do tipo carboxilado e que são secretadas para o lúmen da glândula, o que não se verifica em *B. spatitergum*.

Com relação aos resultados do conteúdo Feulgen-DNA, há indicações de variações ao longo das glândulas salivares de *Bradysia spatitergum* (regiões S₁, S₂ e S₃) e em diversas fases de seu desenvolvimento pós-embrionário. Fenômeno semelhante foi também já descrito em glândulas salivares de outros dípteros, como por exemplo *Drosophila hydei* (Beren-des, 1965) e *Phunhosciara sp* (Simões, 1967), neste último caso através de outro método de abordagem (passos de replicação determinados com procedimentos radioautográficos). Dentre os métodos citofotométricos a escolha do método citofotométrico de duplo comprimento de onda para avaliação dos valores Feulgen-DNA é justificada pelas suas qualidades de precisão e por melhor se prestar à análise do material em questão (Mendelsohn, 1966; Garcia e Iorio, 1966). Existe também relato de variações em conteúdo Feulgen-DNA dentro da mesma glândula salivar e ao longo de seu desenvolvimento, em outros grupos de insetos (Romer, 1966; Cruz-Landim e Mello, 1969; Mello e col., 1970). Altos valores de duplicação no conteúdo Feulgen DNA, como os detectados no presente trabalho, atingidos em algumas regiões glandulares, foram também reportados em *Drosophila hydei* (Beren-des, 1965) e *Phunhosciara sp* (Simões, 1967).

A ocorrência, em *Bradysia spatitergum*, de um conteúdo de DNA maior na região distal de suas glândulas (no

caso S_3) do que na região mais proximal (S_1) lembra o padrão de *D. hydei* (Berendes, 1965) e o de *Phynchosciara* sp (Simões, 1967). No entanto, não comparável aos organismos citados, *R. spatitergum* apresenta os valores mais elevados dos intervalos de duplicação do conteúdo Feulgen-DNA não na porção terminal, mas em S_2 .

No presente trabalho assume-se que o fenômeno de duplicação do conteúdo Feulgen-DNA se ligue ao processo de politenização das glândulas salivares. Embora não se tenha ainda determinado a existência de puffs de DNA em *R. spatitergum*, estes são de ocorrência geral em glândulas salivares de sciarídeos durante o 4º estadio larval (Breuer e Pavan, 1955; Simões, 1967; Sauaia, 1971) e é de se esperar que também se façam presentes neste díptero. A contribuição, porém, dessa síntese adicional localizada de DNA, não poderia ser considerada responsável pela elevação dos valores Feulgen-DNA devidos à politenização a ponto de duplicá-los, segundo evidências observadas pelo grupo de Lara (Mello, 1977 - comunicação pessoal).

O achado de que no 1º estadio larval existem núcleos de S_2 com valores Feulgen-DNA correspondentes aos intervalos 8C, 16C e 32C indica que nessa região, já no início da fase larval e anterior à amostragem, as replicações foram em maior número do que por exemplo, em S_3 . O fato de S_1 apresentar os menores intervalos de duplicação dos valores Feulgen-DNA possivelmente esteja relacionado com a menor atividade secretora dessa região. Conforme já ficou demonstrado com

a análise citoquímica desse material, S_1 é uma região pobre em síntese de proteínas e glicosaminoglicanas ácidas. Por outro lado, S_2 , região com os valores Feulgen-DNA mais elevados é a mais rica em proteínas e proteoglicanas. Em S_3 , contudo, que apresenta diferentes características citoquímicas do citoplasma e do produto secretado já presente no lúmen, conforme se considerem suas regiões distal e proximal, não foi encontrada, variação nos padrões de distribuição dos valores Feulgen-DNA.

6. CONCLUSÕES

1. As glândulas salivares de *Bradysia spatitergum* apresentam um aspecto morfológico típico, diferindo dos relatados para outras espécies de sciarídeos, ou seja, *Bradysia* sp, *Bradysia hygida* e *Rhynchosciara americana*. Por outro lado, identificam-se mais com as glândulas salivares de *Sciara coprophila*.

2. Os estudos citoquímicos, revelaram a presença dos seguintes componentes nas glândulas salivares de *Bradysia spatitergum*:

2.1. Glicogênio no citoplasma das células epiteliais, mais especificamente na porção distal da região S_3 .

2.2. Glicosaminoglicanas neutras outras que glicogênio nas células, especialmente da porção proximal da região S_3 , sendo produzidas em quantidade mais elevada a partir do final do 4º estadio.

2.3. Glicosaminoglicanas ácidas sulfatadas em maior concentração no citoplasma de células da região S_2 e porção proximal de S_3 .

2.4. Proteínas em proporção mais elevada na região S_2 e porção distal da região S_3 . Estas se apresentam aparentemente em maior quantidade no início do 4º estadio se comparadas com o 1º estadio larval.

2.5. Lipídios, no citoplasma e lúmen das células glandulares, apresentando uma concentração maior nas regiões S_1 e porção distal de S_3 , durante todo o desenvolvimento pós-embriônico.

2.6. RNA, no citoplasma e núcleos em todas as regiões glandulares e durante todo o desenvolvimento pós-embriônico.

2.7. A secreção do lúmen das glândulas apresenta: glicoproteína, proteínas e lipídios.

3. Observações ao nível da microscopia de polarização demonstraram, que as proteínas e os lipídios detectados citoquimicamente apresentam alta orientação molecular já no citoplasma das células glandulares.

4. O padrão de distribuição e ocorrência dos componentes citoquímicos difere daqueles descritos para *Prady-sia* sp, *Rhynchosciara americana* e *Rhynchosciara* sp.

5. Ocorrem variações nos níveis de duplicação dos valores Feulgen-DNA ao longo das glândulas salivares e em diferentes etapas do seu desenvolvimento pós-embriônico.

5.1. Os mais altos níveis de duplicação no conteúdo Feulgen-DNA são atingidos em S_2 , seguidos pelos da região S_3 . O fato de S_1 exibir os menores intervalos de du-

plicação Feulgen-DNA e S_2 os maiores, possivelmente se relacione com a menor e maior atividade secretora dessas regiões.

7. RESUMO

As glândulas salivares de *Bradysia spatitergum* apresentam um aspecto morfológico típico, quando comparadas com glândulas salivares de outros sciarídeos. Suas características citoquímicas são também particulares, quando comparadas com as de *Bradysia sp*, *Rhynchosciara americana* e *Rhynchosciara sp*. Os testes citoquímicos realizados evidenciaram a presença de glicogênio e um outro tipo de glicosaminoglicana neutra na porção distal da região S₃ das glândulas salivares de *Bradysia spatitergum*, em maior quantidade a partir do 4º estadio larval. Glicosaminoglicanas ácidas sulfatadas se fazem presentes, no citoplasma da região S₂ e porção proximal de S₃, durante todo o desenvolvimento pós-embrionário. Proteínas e lipídios foram encontradas nestas glândulas salivares (citoplasma e secreção no lúmen) em maior concentração nas regiões S₂ e S₃ distal e S₁ e S₃ distal, respectivamente. As observações realizadas ao nível da microscopia de polarização demonstram que estes componentes apresentam alta orientação molecular. O RNA citoplasmático e nuclear se mostrou presente durante todo o desenvolvimento pós-embrionário, em todas as regiões glandulares.

Os intervalos de duplicação dos valores Feulgen-DNA encontrados nas glândulas salivares, (menores em S_1 e maiores em S_2 , possivelmente se relacionem com a menor e maior atividade secretora dessas regiões glandulares respectivamente.

8. SUMMARY

The salivary glands of *Bradysia spatitergum* show a typical morphological aspect when compared with salivary glands of other Sciarid flies. Their cytochemical characteristics are also peculiar when compared with those of *Bradysia sp.*, *Rhynchosciara americana* and *Rhynchosciara sp.* Glycogen and other neutral glycosaminoglycans were specially detected in the cytoplasm of the distal part of the S_3 region of the glands, where they increase in amount from the 4th instar on. Sulphated acid glycosaminoglycans are present in the epithelial cells of the S_2 region and proximal zone of the S_3 region, during all the post-embryonic development. RNA was found in the gland epithelial cells throughout the organ and during all the post-embryonic development. Proteins and lipids are present in the cytoplasm of the epithelial cells and also in the lumen of the organ as part of the gland secretion. Their content was shown to be specially increased in S_2 and distal S_3 regions (proteins) and in S_1 and distal S_3 regions (lipids). Both protein and lipid (lipoprotein?) components were proved to display high molecular orientation patterns when studied with polarizing microscopy.

Nuclear Feulgen-DNA values were cytophotometrically evaluated in the various gland zones at the 1st and early 4th larval instars and prepupal stage. The smallest and largest duplication intervals for the Feulgen-DNA values, both ascribed to be provided by polytenization phenomena, were found in the S_1 and S_2 regions of the glands, respectively. They are possibly related with different secretion activities of these gland regions.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Berendes, H.D. 1965. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hudei*. *Chromosoma* (Berl.), 17: 35 - 77.
- Bianchi, A.G. e F.J.S. Lara. 1969. Cinética de síntese proteica na glândula salivar de *Rhynchosciara angelae* durante o desenvolvimento larval. *Ciência e Cultura*, 21: 542 - 543.
- Bianchi, A.G. e W.R. Terra. 1975. Chemical composition and rate of synthesis of the larval salivary secretion of the fly *Rhynchosciara americana*. *Journal Insect Physiol.*, 21: 643 - 657.
- Breuer, M.E. e C. Pavan. 1955. Behavior of polytene chromosomes to *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*, 7: 317 - 386.
- Comune, J.N. 1975. Contribuição ao estudo da Biologia e mapeamento dos cromossomos de *Bradysia spatitergum* (Diptera: Sciaridae). Tese de Mestrado a ser apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo.

- Cruz-Landim, C. da e M.L.S. Mello. 1969. Development of polyploidy in silk glands of *Melipona quadrifasciata* anthi-sides Lep. (Hym. Apoidea) during the larval stage. J. Exp. Zool., 170: 149 - 156.
- Cunha, A. B., J.S. Morgante, C. Pavan e M.C. Garrido. 1969. I. studies on Cytology and differentiation in sciaridae. III. Nuclear and cytoplasmatic differentiation in salivary glands of *Bradysia* sp. Studies in Genetics V. Univ. Texas Publ. 6918. 2 - 10.
- David, M.P. e H. Swift. 1965. Cytoplasmic fine structure of *Sciara* salivary glands. The Journal of Cell Biology, 27: 395 - 409.
- Deitch, A. D., 1966a. Cytochemistry of proteins. In: "Introduction to quantitative cytochemistry." (George L. Wied, ed) Academic Press, New York and London. p. 451 - 468.
- Deitch, A. D., 1966b. Cytophotometry of nuclei acids. In: "Introduction to quantitative cytochemistry". (George L. Wied, ed) Acad. Press, New York and London. p. 327 - 354.
- Fischer, E.R. e R.D. Lillie. 1954. The effect of methylation on basophilia. J. Histochem. Cytochem., 2: 81 - 87.
- Garcia, A. M. e R. Iorio. 1966. Potencial sources of error in two-wavelength cytophotometry. In: "Introduction to quantitative cytochemistry. (G. L. Wied, ed.) Academic Press. New York and London. 215 - 237.

- George, L. L. 1968. Topoquímica de polissacarídeos em glândula salivar de *Rhynchosciara* sp. *Ciência e Cultura*, 20 (2): 366 - 367.
- Hardy, D. E. 1956. New hawaiian sciaridae (Diptera) Proc. Hawaiian Entomological Society, 16 (1): 72 - 90.
- Harrod, M. J.G. 1972. Developmental studies in *Drosophila*:VI-Ultrastructural analysis of the salivary glands of *D. pseudoobscura* during the late larval period. *J. Ultrastruct Res.*, 40 (3/4) 292 - 312.
- Kato, K.I. e J.L. Sirlin. 1963. Aspects of mucopolysaccharide production in larval insect salivary cells. A combined cytochemical auto-radiographic approach. *J. Histochem. Cytochem.*, 11: 163 - 168.
- Kiefer, G. , 1970. Recent developments in Gallcyanine-chrome Alum staining. In: "Introduction to quantitative cytochemistry II." (G.L. Wied and G.F. Bahr, eds.) Academic Press, New York and London. p. 199 - 221.
- Laufer, H. , Y. Nakase e J. Vanderberg. 1963. Nucleo-cytoplasmic interactions in the development of the salivary glands of *Chironomus thumí* (Diptera). *Biol. Bull.*, 125: 359.
- Laufer, H. e Y. Nakase. 1965. Salivary gland secretion and its relation to chromosomal puffing in the diptera *Chironomus thumí*. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 53: 511.

- Leppi, T.J. e P.J. Stoward. 1965. On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 13: 406 - 407.
- Lev, R. e S. S. Spicer. 1964. Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 309 - 315.
- Lillie, R. D. e S.K. Jirge. 1975. Methylation or lactonization of methanolic reagents in histochemistry, *Histochem.* 4: 249 - 256.
- Lison, L. 1960. *Histochemie et cytochimie animales. Principes et méthodes.* Paris, Gauthier Villare.
- Mello, M.L.S. 1976a. Comunicação pessoal.
- Mello, M.L.S. 1976b. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero - e eucromatinas. Tese de Livre Docência. Departamento de Biologia Celular. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (S.P.)210p.
- Mello, M.L.S. e B.C. Vidal. 1971. Histochemical and histophysical aspects of silk secretion in *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apoidea). *Z. Zellforsch.*, 118: 555 - 569.
- Mello, M. L.S. e B.C. Vidal. 1972. Acid mucopolysaccharides as componentes of the peritrophic membrane of *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apoidea). *Ciência e Cultura*, 24 (3): 261 - 267.
- Mello, M.L.S., C.S. Takahashi e A.R.T. Gagliard. 1970. Polyploidy pattern in larval silk glands of *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apoidea). *Insects Sociaux*, 57(4):295-302.

- Mello, M.L.S. e M.C.M. Pretti. 1977. Trabalho em andamento.
- Mello, M.L.S. e V.A. Zanardi. 1976. Feulgen-DNA plug and two wavelength cytophotometry of bull spermatozoa. *Mikroskopie*, **32**: 129 - 137.
- Mendelsohn, M.L. 1966. Absorption cytophotometry: comparative methodology for heterogeneous objects and two-wavelength method. *In* "Introduction to quantitative cytochemistry (G.L. Wied, ed.). Acad. Press, New York and London. p. 201 - 214.
- Moraes, G.W.G. de e M. Miranda. 1974. Caracterização morfológica e variação funcional das regiões da glândula salivar de *R. angelae*, durante o desenvolvimento. *Ciência e Cultura*, **26** (7): 403.
- Neuhoff, V. 1973. Micro-determination of phospholipids. *In* "Micro-methods in Molecular Biology". (V. Neuhoff, ed.) Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, New York. p. 150 - 178.
- Orstein, L. 1952. The distributional error in microspectrophotometry. *Lab. Invest.*, **1**: 250 - 262.
- Patau, K. 1952. Absorption microphotometry of irregular-shape objects. *Chromosoma*, **5**: 341 - 362.
- Pavan, C. 1965. Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and problem of differentiation. *Brookhaven Symp. Biol.*, **18**: 222 - 241.

- Patterson, E.K., M.E. Dackerman e J. Schultz. 1949. Peptidase activities of salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Gen. Physiol.*, 32: 607.
- Pearse, A.G.E. 1970. *Histochemistry: Theoretical and applied*. London J.A. Churchill Ltd.
- Perkowska, E. 1963. Some characteristics of the salivary gland secretion of *Drosophila virilis*. *Exp. Cell. Res.*, 32: 259 - 271.
- Romer, F. 1966. Zytometrische Untersuchungen des DNS - Gehalts in Verschiedenen Geweben der Larvae und Imago von *Oryzaephilus surinamensis* L (Cucujidae, Coleoptera). *Biol. Zentraabl.*, 85: 409 - 438.
- Ross, E.B. 1939. The post-embryonic development of the salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.*, 65: 471 - 495.
- Sauaia, H. e M.R.A. Alves. 1968. A description of a new species of *Bradysia* (Diptera, Sciaridae). *Pap. Avul. Zool.*, 22: 85 - 88.
- Sauaia, H. 1971. Cromossomos politênicos de *Bradysia hygida*. Inibição do desenvolvimento dos puffs de DNA pela hidroxí-urêia. Tese de doutoramento, Ribeirão Preto (S.P.) 76p.
- Scott, J.R. e J. Dorling. 1965. Differential staining of acid glycosaminoglycanas (mucopolysaccharides) by Alcian blue in salt solution. *Histochemie*, 5: 221 - 233.

- Scott, J.R. e R.A. Stocwell. 1967. On the use and **abuse** of the critical eletrolyte concentration approach to the localization of tissue polyanions. *J. Histochem. Cytochem.* 15: 112 - 113.
- Silberman, M. e J. Fromer. 1974. Dynamic changes in **acid** mucopolysaccharides during mineralization of mandibular condylan cartilage. *Histochimie*, 36: 185 - 192.
- Simões, L.C.G. 1967. Síntese de DNA durante o desenvolvimento larval de *Rhynchosciara* sp. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia, Universidade de Minas Gerais.
- Souza, H.M.L. 1976. Comunicação pessoal.
- Spicer, S.S. e R.D. Lillie. 1959. Saponification as a means of selectively reversing the methylation blokeage of tissue basophilia. *J. Histochem.* 7: 123 - 125.
- Steffan, Wallace A. 1968. Redescription of *Bradusia spatitergum* (Hardy) and new records from Panama and Brazil (Diptera: Sciaridae). *Pacific Insects*, 10 (3/4): 515 - 519.
- Vidal, B.C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-ponceau 3 RS. *An Histochem.*, 15: 289 - 296.
- Vidal, B.C. e L. Bozzo. 1969. Detection of macromolecular organization of lipds in human gingia through dicroism. *Archs Oral Biol.*, 14: 333 - 335.
- Vidal, B.C. e M.L.S. Mello, 1977. Dichroism of collagen fibers. Submetido à publicação.

Wigglesworth, V.B. 1965. The principles of insect physiology.
Methnen, London.

Winter, C.E., A.G. Bianchi, W.R. Terra e F.J.S. Lara. 1976.
Diferenciação funcional nas regiões morfológicas das glân-
dulas salivares de *Rhynchosciara americana*. Ciência e Cul-
tura, 28 (7): 264 - 265.