

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/5753
IB/80100

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1984

IB/ 80100

R. 5253

RITA MARIA PEREIRA AVANCINI

ASPECTOS DA OOGÊNESE DE *Chrysomya putoria*
(WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre
em Biologia.

Campinas - SP - 1984

Classif. T
Autor Cw 15a
V. Ex.
Tombo BC/ 5753
IB/572

IB/80300
Bel 5753

Cidade Universitária "Leferino Vaz," 31 de julho de 1959

"Este exemplar corresponde a versão final de Tese defendida
pela aluna Rita Maria Bezerra Araújo e aprovada pelo comitê
 julgadora."

Angelo Pires do Prado

O presente trabalho foi realizado no
Departamento de Parasitologia da
Universidade Estadual de Campinas.

ORIENTADOR: PROF. DR. ÂNGELO PIRES DO PRADO

Meus pais e avós

início de minha vida e
base de minha formação.

Zezé

renascimento para o mundo
e ponto de equilíbrio na
procura do ser.

Com dedicação

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado, cuja ampla visão das diferentes áreas do conhecimento despertou meu interesse pela pesquisa científica e através de quem tive a oportunidade de ingressar nesta carreira.

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello pelo interesse que dedicou aos aspectos citológicos do trabalho apresentando sempre sugestões valiosas e grande incentivo. Pela leitura cuidadosa da tese e discussões significativas do assunto. Através de sua digníssima pessoa pude ter acesso aos equipamentos, drogas e demais facilidades do Departamento de Biologia Celular sem o que grande parte do trabalho não poderia ter sido realizada.

Ao Prof. Dr. Crodowaldo Pavan pela sua atuação como orientador de programa durante o curso de pós graduação, pela leitura da tese e pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. José Henrique Guimarães pela leitura da tese, pelo interesse e estímulo ao prosseguimento dos estudos.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, do Departamento de Estatística do IMECC, pela sua inestimável colaboração nos cálculos estatísticos realizados através do Laboratório de Estatística.

Ao Dr. B. R. Laurence, da London School of Hygiene and Tropical Medicine, pelo fornecimento de seus resultados experimentais, pronto e amável atendimento em minhas solicitações e pelos comentários valiosos a respeito da tese.

Ao colega Gerson Augusto Ribeiro Silveira, grande entusiasta do estudo da oogênese, cujo incentivo e amizade foram essenciais nos momentos mais críticos do desenvolvimento deste trabalho.

À colega Shirlei Maria Recco-Pimentel do Departamento de Biologia Celular pela grande ajuda nas técnicas de coloração e principalmente pela solicitude com que me atendeu.

À colega de Departamento, Dra. Marlene Tiduko Ueta, pela leitura minuciosa do manuscrito e inúmeras sugestões apresentadas.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia, que pela convivência diária sempre ofereceram apoio e sugestões aos problemas enfrentados.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Biologia Celular pela amável receptividade e ajuda dispensadas.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética e Evolução pela atenção sempre prestada.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia que de uma maneira ou de outra colaboraram para este trabalho.

À Denise Leme Ichimaru, companheira de todos os momentos do curso de graduação, pela ajuda na elaboração do Abstract.

Aos meus ex-professores do curso de graduação do Instituto de Biologia que contribuíram para minha formação e especialmente pelo contato amigo que continuaram proporcionando-me, estimulando-me através de sugestões e críticas.

À Universidade Estadual de Campinas pela possibilidade desta realização.

Aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Ao Zezé pela excepcional ajuda e compreensão em todas as etapas deste trabalho e também pelas cópias fotográficas, leitura e arte-final da tese.

TUDO MUDA

Bertold Brecht

Tudo muda. De novo começar
podes, com o último alento.
O que acontece, porém, fica acontecido: e
a água que pões no vinho, não podes mais
separar.

O que acontece, fica acontecido: a água
que pões no vinho, não podes
mais separar. Porém
tudo muda: com o último alento podes
de novo começar. •

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	
	Datação em insetos e oogênese	1
	A oogênese: divisão em fases	7
	A espécie em estudo: <i>Chrysomya putoria</i>	10
	Objetivo	12
II.	MATERIAL E MÉTODOS	
	1. Criação	14
	2. Amostragem	15
	3. Teste de desenvolvimento com dieta aprotéica	16
	4. Teste de desenvolvimento com dieta aprotéica se- guida por dieta normal	16
	5. Teste para verificação do desenvolvimento do 2º folículo em presença do 1º	16
	6. Histologia	17
	7. Montagem total	17
	8. Determinação das áreas das projeções nucleares das células tróficas	18
	9. Técnicas especiais de coloração	18
	10. Fotografias	19
	11. Cálculos estatísticos	20
III.	RESULTADOS	
	3.1.1. Morfologia do aparelho reprodutor interno ...	21
	3.1.2. Descrição das características morfológicas das fases de desenvolvimento ovariano	21
	3.1.3. Condição da segunda camada de folículos nas diferentes fases	33

3.2. Dimensões dos folículos	33
3.3. Distribuição das fêmeas pelas diferentes fases.	42
3.4. Determinação da idade cronológica através da fase de desenvolvimento ovariano.....	46
3.5. O número de folículos de <i>Chrysomya putoria</i>	48
3.6. Teste de desenvolvimento com dieta aprroteica ..	51
3.7. Teste de desenvolvimento com dieta aprroteica seguida por dieta normal	54
3.8. Teste para verificação do desenvolvimento do 2º folículo em presença do 1º	56
3.9. O núcleo das células tróficas	58
3.10. Colorações especiais para o corpúsculo nuclear de células tróficas	60

IV. DISCUSSÃO

4.1. Fases dos folículos	63
4.2. Dimensões dos folículos	63
4.3. Distribuição das fêmeas pelas diferentes fases.	64
4.4. Determinação da idade cronológica através da fase de desenvolvimento ovariano	66
4.5. O número de folículos de <i>Chrysomya putoria</i>	71
4.6. Teste de desenvolvimento com dieta aprroteica ..	72
4.7. Teste de desenvolvimento com dieta aprroteica seguida por dieta normal	75
4.8. Teste para a verificação do desenvolvimento do 2º folículo em presença do 1º	76
4.9. O núcleo das células tróficas	78
4.10. Colorações especiais para o corpúsculo nuclear células tróficas	81
4.11. Sobre a proveniência de <i>Chrysomya putoria</i>	83

V.	CONCLUSÕES	86
VI.	RESUMO	89
VII.	ABSTRACT.....	91
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

I. INTRODUÇÃO

DATAÇÃO DE INSETOS E OOGÊNESE

Os insetos sendo animais pecilotérmicos têm seus processos fisiológicos influenciados de diferentes maneiras pela temperatura ambiente (CHAPMAN, 1972). Dessa forma, certas características das populações, como taxa de desenvolvimento e taxa de mortalidade são mais úteis se expressas em unidades de tempo fisiológico do que em unidades cronológicas, ou então, pela correspondência entre ambas. Fazendo-se esta correspondência pode-se determinar a composição etária de uma população, fato que é de grande importância no estudo de espécies-praga, tanto para se determinar seu potencial epidemiológico como para avaliar a eficiência de medidas de controle tomadas contra elas.

Maneiras de estudar a composição etária das populações naturais de insetos, bem como sua dinâmica, começaram a ser objeto de estudo quando certos insetos passaram a ser reconhecidos como vetores de doenças endêmicas importantes em determinadas áreas do mundo.

O primeiro trabalho que tentou relacionar a idade cronológica a algum evento fisiológico, no caso expresso pela morfologia dos ovários de anofelinos foi descrito por CHRISTOPHERS (1911). Além de fazer uma divisão do desenvolvimento ovariano em 5 fases, morfologicamente distinguíveis, o autor fez observações de demais estruturas que pudessem acrescentar elementos a esta datação, como, glândulas salivares, espermateca, intestino médio, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi. Esses outros dados quase nada acrescentaram porém, à correlação, dos fenômenos do desenvolvimento ovariano com os 6 dias de duração total da oogê

nese naqueles anofelinos.

MER (1932) foi quem primeiro descreveu as mudanças no diâmetro da ampola dos ovidutos após a ovulação, como uma maneira de distinguir a idade de fêmeas de *Anopheles*. Após este trabalho começaram a surgir outros que centravam a atenção no aparelho reprodutor feminino, na tentativa de obter caracteres que pudessem levar a métodos mais acurados de determinar a idade cronológica (DETINOVA, 1962).

KUZINA (1942) citada por DETINOVA (1962), registrou a existência de corpos amarelos nos ovariolos de *Stomoxys paríparas*, sendo que estes resultavam das células tróficas remanescentes deixadas no local de desenvolvimento do folículo já oviposto. Outros autores observaram a mesma estrutura em *Anopheles*, até que POLOVODOVA (1947, 1949) citada em DETINOVA, (1962) demonstrou que esses corpos apresentavam padrões definidos e, assim, constituíam um guia para o número de lotes de ovos postos previamente.

Uma técnica alternativa foi proposta por DETINOVA (1945) citada em DETINOVA (1962): foram as mudanças ocorridas nas traquéias dos ovários. As minúsculas traquéolas que suprem os ovários de fêmeas nulíparas são compactamente enoveladas; quando os ovos maturam, crescendo, essas traquéolas tornam-se esticadas, de maneira que não mais reassumem a forma anterior, mesmo em períodos interovulares. Esse método foi posteriormente empregado por outros autores em diferentes insetos (ANDERSON, 1963).

Os autores russos tiveram um grande papel no desenvolvimento e aplicação de métodos de datação, que utilizam principalmente características ovarianas, no que diz respeito a populações de mosquitos transmissores de malária, resultando daí inúmeros trabalhos nas décadas de 50

e 60 (DETINOVA, 1968). Infelizmente esses trabalhos não estão disponíveis no Brasil e além disso quase nenhum apresenta versão em outra língua, o que torna nosso acesso a eles praticamente impossível.

De estudos voltados unicamente para vetores de malária esses métodos começaram a ser aplicados, tanto na URSS como em outros países, a vetores de outras doenças, como *Aedes*, *Phlebotomus*, *Glossina*, simulídeos, moscas não hematófagas e barbeiros (DETINOVA, 1968).

Com estes novos organismos em estudo, diferentes maneiras de abordar a datação foram surgindo, tanto pelo aperfeiçoamento dos métodos já existentes como pelo desenvolvimento de novos (Tabela nº 1).

Nesses métodos existe maior ou menor precisão; alguns conseguem distinguir apenas os insetos recém emergidos dos demais, outros separam insetos jovens dos sexualmente maduros; uns determinam quais fêmeas depositaram ovos (paríparas) e as que não ovipuseram ainda (nulíparas), enquanto outros revelam o número de oviposições realizadas por cada fêmea.

Assim sabemos que com diferentes precisões podemos conhecer a idade cronológica de um inseto associando-a a algum caráter fisiológico conhecido.

Atualmente um dos métodos mais empregados para datação de populações de Diptera é o relacionado ao desenvolvimento ovariano. (ANDERSON, 1963; SUNDERS, 1960; TYNDALE-BISCOE & HUGHES, 1969; PRITCHARD, 1970; BERLYN, 1978; FLETCHER et alii, 1978; ADAMS & REINECKE, 1979; CHARLWOOD & LOPES, 1980; NAYAR & KNIGHT, 1981)

Para a utilização deste método é de importância que se faça o estudo detalhado da biologia reprodutiva da espécie em

TABELA 1 - Alguns métodos utilizados para datação de insetos

Características observadas	Insetos	Autor(es)
(1) Mudanças na cor (cutícula e asas)	Chrysomelidae ³ Simuliidae ¹ Culicidae ¹ Notonectidae ⁴ Corixidae ⁴	Dunn, 1951 Corbet, 1960 Corbet, 1960 Young, 1965 Young, 1965
(2) Desgaste (asas)	Culicidae ¹ Apoidea ² Simuliidae ¹ Halictidae ² Glossinidae ¹	Perry, 1912 Michener et alii, 1955 Corbet., 1960 Daly, 1961 Saunders, 1962
(3) Deposição e crescimento das bandas cuticulares	Orthoptera	Neville, 1963

(6) Túbulos de Malpighi
(deposição de pigmentos
excretados)

Apidae² Haydack, 1957

(7) Intestino (meconium)

Apidae² Haydack, 1957

Culicidae¹ Corbet, 1960

(8) Pigmentação do
abdômem (fêmea)

Ceratopogonidae Akey & Potter, 1979

Obs.: Os números encontrados na coluna "insetos" referem-se às ordens a que os mesmos pertencem, e obedecem ao seguinte código:

(1) Diptera

(2) Hymenoptera

(3) Coleoptera

(4) Hemiptera

questão, obtendo-se dados que são de grande valor também em programas de controle de espécies-praga. Exemplo disto é o que ocorreu na Austrália a partir da década de 70, onde surgiu grande número de trabalhos que enfocavam aspectos reprodutivos da principal ameaça ao gado ovino local, *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) (CLIFT, 1971; VOGT et alii, 1974; CLIFT & MC DONALD, 1976; BARTON-BROWNE et alii, 1976; WILLIAMS et alii, 1979; BARTON-BROWNE & VAN GERWEN 1979; BEATTIE & CHENEY, 1979).

Nos EUA, paralelamente às muitas tentativas de controle de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera, Calliphoridae), programa que já data de 4 décadas (RICHARDSON, et alii, 1982), foram desenvolvidos estudos minuciosos da oogênese desta espécie (LA CHANCE & LEVERICH, 1962; LA CHANCE & BRUNS, 1963; LA CHANCE & LEVERICH, 1968; LA CHANCE & RUUD, 1977).

A OOGÊNESE: DIVISÃO EM FASES

A oogênese é um fenômeno contínuo, desde que ocorra em condições adequadas, mas que para efeito de estudos de datação ou outro qualquer é dividido em diferentes fases ou estágios. Essa divisão é arbitrária já que diferentes autores tratam do mesmo fenômeno, às vezes na mesma espécie, baseando-se em uma divisão de fases distinta, tanto pelo número total como por suas características. Para *M. domestica*, por exemplo:

BIER (1963) - 6 estágios

GOODMAN et alii (1968) - 14 estágios

ADAMS et alii (1968) - 10 estágios

SAKURAI (1973) - 7 estágios

O primeiro a fazer uma divisão do desenvol-

vimento ovariano foi CHRISTOPHER (1911), em 5 fases, estas, porém, com várias subdivisões, embora não enumeradas (uma fase pré-vitelogênica e 4 vitelogênicas). HARLOW (1956) dividiu o desenvolvimento de *Protophormia terrae-novae* (R.D.) em 5 estágios sendo 3 pré-vitelogênicos e 2 vitelogênicos. KING et alii (1956) fizeram 14 estágios para *Drosophila melanogaster* (6 pré e 8 vitelogênicos). ADAMS & MULLA (1967) dividiram o desenvolvimento de *Hippelates collusor* em 10 fases (3 pré e 7 vitelogênicas).

Os pesquisadores que têm trabalhado desde então, escolhem uma dessas divisões ou fazem suas próprias, com pequenas modificações das anteriores, como, BARTON-BROWNE et alii (1979) para *Lucilia cuprina* subdividiram os 10 estágios de ADAMS & MULLA (1967) em 12.

Estas diferentes divisões ocasionam dificuldades na comparação entre resultados dos diversos pesquisadores e alguns já prevendo isto, fazem até a correspondência entre a classificação adotada e uma outra que julgue relevante. Por exemplo, VOGT et alii (1974) para *Lucilia cuprina*, usam estágios de CHRISTOPHER (1911) mas citam a classificação de ADAMS & MULLA (1967), esta usada por outros autores que trabalham com *Lucilia cuprina*, e fazem a correspondência entre ambas. O mesmo fizeram CLIFT & MCDONALD (1976) em *L. cuprina*, usando os estágios de ADAMS (1974) e citando a correspondência com os de VOGT et alii (1974).

A divisão atende ao enfoque do trabalho de cada um e a melhor divisão seria aquela que permitisse servir ao maior número de objetivos, sem grandes prejuízos de informação.

Para estudos que visem a vitelogênese: os fenômenos bioquímicos, as células envolvidas, a dieta ideal,

as vias de incorporação, etc., não há dúvida de que estágios caracterizados pela porcentagem de deposição de vitelo a tendem melhor ao objetivo do trabalho. Foi assim que TREPTE, embora tenha adotado a classificação de BIER (6 estágios), já no seu trabalho de 1979, subdividiu-os em 9; em 1981 ampliou para 12 sendo que destes só 1 pré-vitelogênico.

No entanto, uma divisão minuciosa baseada em características moleculares ou mesmo microscópicas não atende aos objetivos dos pesquisadores de campo que trabalham normalmente com grandes amostras e com poucos recursos técnicos. Assim um método de classificação que permitisse ao pesquisador uma triagem rápida das fêmeas, e que fosse baseado em caracteres facilmente visíveis seria o indicado. É este o caso dos que se envolvem com estudos epidemiológicos. Mas mesmo que os caracteres utilizados por este pesquisador de campo sejam basicamente os morfológicos mais nítidos, é de interesse que estes possam já estar relacionados aos fenômenos fisiológicos envolvidos, muitas vezes de grande importância no estudo realizado.

É assim que uma divisão nem excessivamente resumida, com fases englobando fenômenos muitos distintos, nem muito detalhada por caracteres sutis é que foi escolhida como base para nosso estudo. Além disso como a classificação de ADAMS & MULLA (1967) parece ser a mais adotada para as diferentes espécies estudadas de Calliphoridae, achamos que para efeito de comparação seria melhor que não fugíssemos muito dos critérios adotados nesta classificação.

A ESPÉCIE EM ESTUDO: *Chrysomya putoria*

Chrysomya putoria é uma mosca da família Calliphoridae, vulgarmente chamadas "varejeiras", mas não da quelas que causam "bicheiras" ou miíases.

Miíase segundo significação mais recente dada por ZUMPT (1965) é "a infestação de vertebrados vivos por larvas de dípteros, que, pelo menos por um certo período, se alimentam de suas substâncias corpóreas líquidas ou do alimento por ele ingerido".

Das espécies do gênero *Chrysomya* somente o *C. bezziana* é biontófaga, ou seja, existe obrigatoriedade do parasitismo pelas larvas. Algumas outras espécies como *C. albiceps*, *C. chloropyga*, *C. megacephala* são necrobiontófagas. Nesses casos as larvas desenvolvem-se normalmente em substâncias orgânicas em decomposição (carcaças, fezes) e ocasionalmente podem se desenvolver sobre tecidos necrosados de animais vivos, atuando como parasitas por um curto período (ZUMPT, 1965).

Embora *C. putoria* seja estreitamente relacionada a *C. chloropyga* parece que diferem quanto a sua bionomia já que *C. chloropyga* é citada como segunda em importância nos casos de miíases na África do Sul (ZUMPT, 1965) e registros dessas ocorrências não existem a respeito de *C. pu*toria.

A distribuição das duas no continente africano é distinta: *C. chloropyga* é comum no sul da África e em elevadas altitudes da África Central e Oriental. Na África Ocidental e em partes mais quentes da África central e oriental ela é substituída por *C. putoria* (ZUMPT, 1965).

O status taxonômico de *Chrysomya putoria* é

ainda questionável. Baseando-se em estudos de genitália ZUMPT (1956a) citado em ZUMPT (1965) considerou *Chrysomya putoria* apenas uma variação de *C. chloropyga*. ZUMPT (1965) apesar de reconhecer o isolamento genético parcial das 2 formas e apresentá-las, até mesmo como espécies distintas na chave de identificação, embora "para propósitos práticos", deixa ainda o problema em aberto. Da mesma forma se refere PONT (1980). Já BOYES & SHEWELL (1975) através de estudos morfológicos dos cromossomos dessas espécies consideram-nas como duas espécies. BAUMGARTNER & GREENBERG (1984) falam sobre a existência de três fenótipos de *C. chloropyga* na África, sendo um deles a forma *putoria*, a qual seria a única que chegou à América do Sul.

Optamos pela terminologia adotada por BAUMGARTNER & GREENBERG (1984): *C. putoria* = *C. chloropyga* forma *putoria*, o que, no entanto, não encerra futuras correções a respeito da taxonomia da espécie. Sob este ponto de vista todos os trabalhos publicados no Brasil até esta data a respeito de *C. chloropyga* devem ser entendidos como referentes a *C. putoria*.

Em 1976 foi registrada a presença de *C. putoria* no Brasil, no estado do Paraná, por IMBIRIBA et alii (1977). GUIMARÃES et alii (1978) descreveram a presença não só dessa espécie como também de *C. megacephala* e *C. albiceps* no estado de São Paulo. Num pequeno intervalo de tempo as três espécies alcançaram as principais regiões urbanas do Sul-Sudeste do país (GUIMARÃES et alii, 1978) e na presente data são encontradas em todas as regiões do Brasil (PRADO & GUIMARÃES, 1983).

Sua presença no Novo Mundo, no entanto, não se restringiu ao Brasil, tendo sido registrada em outros países das Américas do Sul, Central (JIRÓN, 1979; GAGNÉ, 1981)

e em parte da América do Norte atingindo o sul dos E.U.A. (BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984). A atuação das espécies de *Chrysomya* nas Américas já começa a causar apreensões principalmente diante de alguns registros de miíases como o do Texas (EUA) por *C. rufifacies* (*C. albiceps*?) (RICHARD & GER-RISH, 1983) e um caso de miíase provocada por *C. albiceps* em Belo Horizonte (M.G.) (LEITE et alii, 1983).

Atualmente *C. putoria* é frequentadora habitual de lixões, açougues, feiras e domicílios de boa parte das cidades brasileiras, superando em número outras espécies que antes aqui predominavam, por exemplo, *Cochliomya macellaria* (GUIMARÃES et alii, 1978; BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984). Por esse hábito comunicativo são potencialmente importantes vetores de poliovírus, *Salmonella* e outros patógenos entéricos (FURLANETTO et alii, 1984) como descreve GREENBERG, (1973) para outros muscóides com esse hábito. PRADO & GUIMARÃES (1983) consideram-na neste sentido como ameaça potencial maior do que *M. domestica*.

Portanto, a presença dessa espécie na região Neotropical é duplamente sentida: diretamente, pelos aspectos sanitários envolvidos e, indiretamente, pelos deslocamentos e alterações de populações de moscas endêmicas que provocou, além de outras influências ambientais que futuramente ainda poderá ocasionar.

OBJETIVO

Pouco se sabe sobre esta espécie que tão rapidamente se dispersou por todo o território brasileiro. Julgamos que deveriam ser conhecidos alguns dados básicos sobre a biologia da *C. putoria*, principalmente no que se re

fere aos seus aspectos reprodutivos. Como já mencionado, em Diptera os métodos mais amplamente utilizados para determinar a idade fisiológica baseiam-se no exame do aparelho reprodutor das fêmeas.

Com nosso objetivo de trabalho estaríamos, então, não só fornecendo subsídios para estudos posteriores mais aprofundados sobre datação, como alguns dados biológicos necessários a futuros programas de controle que se pense em instalar.

Assim, enfatizou-se neste trabalho o estudo da oogênese de *C. putoria*:

1. duração da mesma;
2. caracterização citológica das alterações que se sucedem nos folículos ovarianos durante o processo, subdividindo-o em fases;
3. correspondência entre estas fases e a idade cronológica;
4. condições nutricionais para que o processo ocorra;
5. comparação destes dados com os disponíveis para espécies relacionadas.

Os dados do trabalho serão apresentados em itens individualizados o que acreditamos facilitará a leitura e a compreensão das discussões concernentes a cada um deles.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. CRIAÇÃO

Foram utilizados exemplares adultos de *Chrysomya putoria* resultantes de população mantida em laboratório por uma geração, no mínimo, e no máximo por cinco. A população de laboratório utilizada no desenvolvimento deste trabalho era proveniente de exemplares coletados na região do campus da UNICAMP - Campinas e era mantida a $22^{\pm}2^{\circ}\text{C}$ e 56% de umidade relativa. O método adotado para coleta dessas moscas foi o mesmo utilizado por FERREIRA (1978), e LINHARES (1981).

As moscas adultas foram mantidas em gaiolas de 30x30x48 cm de armação de ferro recobertas com tela de "nylon". As moscas das populações estoque eram alimentadas com uma dieta composta de leite em pó + açúcar (1:1) e uma pequena quantidade de levedura de cerveja em pó (12 g em 500 g da mistura). A água era fornecida à parte.

Os ovos obtidos nas gaiolas coletados sobre carcaça de camundongo, fígado cru ou carne bovina moída eram transferidos para vidros contendo meio de cultura com a seguinte composição:

leite em pó integral -	10 g
ágar -	2 g
levedura de cerveja em pó -	10 g
água -	100 ml
"nipagin" - (metil-p-hidroxibenzoato)	0,4 g
caseína	0,5 g (LEAL et

alii, 1982). Esses vidros foram mantidos em estufa a 27°C até o início da migração das larvas L3 (\pm 5 dias), fase esta que antecede a pupariação, (termo segundo FRAENKEL & BHAS

KARAN, 1973) após o que eram transferidos para um outro vidro, maior, contendo areia, na qual as larvas empupavam.

Os imagos recém emergidos eram colocados em gaiolas. Para os experimentos deste trabalho foram formadas populações com cerca de 200 exemplares, machos e fêmeas, cuja emergência ocupasse um intervalo de mais ou menos 6 horas.

Para o estudo da duração do desenvolvimento ovariano optou-se por uma dieta de fígado bovino cru que é altamente proteico e o seu valor nutritivo é homogeneamente distribuído.

A partir do primeiro dia o fígado era oferecido numa placa de Petri, por mais ou menos 3 horas por dia e água por 24 horas.

2. AMOSTRAGEM

A intervalos regulares que variaram de 6 até 12 horas, eram retiradas amostras de 10 fêmeas, em média. Estas eram dissecadas com pinças de ponta fina em solução salina 0,85% com ajuda de lupa estereoscópica. Os ovários eram retirados, colocados sobre lâmina e os ovariolos eram separados uns dos outros. Quando eram encontradas fêmeas com desenvolvimento completo dos folículos esses eram contados. Em seguida os ovários eram cobertos com lamínula e observados ao microscópio. Além das medidas da largura e comprimento máximos dos folículos, obtidos com ocular milimetrada, observava-se as diferentes características necessárias à classificação das fases. O volume dos folículos foi calculado segundo a fórmula do esferoide prolato, $V=0,5236 L^2.C.$ (KING & VANOUCEK, 1960; GOODMAN et alii, 1968).

3. TESTE DE DESENVOLVIMENTO COM DIETA APROTEICA

Neste experimento as moscas eram mantidas em gaiolas da maneira já descrita, porém com dieta composta de açúcar de cana refinado e água.

A intervalos regulares de 1 a 4 dias, algumas fêmeas eram retiradas, seus ovários examinados e classificados nas diferentes fases.

Este experimento foi feito em duas situações: uma gaiola contendo somente fêmeas e outra com machos e fêmeas.

Diariamente as moscas encontradas mortas eram retiradas das gaiolas.

4. TESTE DE DESENVOLVIMENTO COM DIETA APROTEICA SEGUIDA POR DIETA NORMAL

A determinados intervalos (com 14, 23 e 45 dias), um pequeno número de indivíduos era transferido da gaiola mantida conforme descrito no ítem anterior, para outra contendo dieta de fígado (+ 3 horas/dia) e água. Quando ovos eram encontrados depositados sobre o fígado, todas as fêmeas desta gaiola eram mortas e seus ovários examinados.

Na gaiola contendo somente as Fêmeas colocou-se fígado no término da observação do teste anterior, ou seja, após 47 dias.

Como não haveria oviposição, as fêmeas foram mortas dentro do intervalo de tempo previsto para completar-se o desenvolvimento dos folículos, baseando-nos nas condições normais de experimentação estabelecida no ítem 2.

5. TESTE PARA VERIFICAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO 2º FOLÍCULO EM PRESENÇA DO 1º

Foram preparadas gaiolas contendo somente fêmeas e a estas era oferecido fígado cru (\pm 3 horas/dia) e água por 24 horas. A intervalos de 2 a 4 dias alguns exemplares eram retirados e seus ovários examinados quanto à condição de desenvolvimento do primeiro e segundo folículos. Os folículos totalmente desenvolvidos eram contados.

6. HISTOLOGIA

Ovários de fêmeas retiradas das gaiolas utilizadas para observação do desenvolvimento normal eram manipuladas como descrito no ítem 2. e imediatamente fixados em Bouin aquoso (aldeído fórmico 37-40% - 250 ml, ácido pícrico solução aquosa saturada - 750 ml, ácido acético - 5 ml) (BEHMER et alii, 1976), em geladeira, por um período mínimo de 2 horas.

Após a fixação o material era desidratado em álcool etílico nas diferentes concentrações e finalmente diafanizado em xilol, com uma duração total de aproximadamente 2 horas. Em seguida era colocado em banho de parafina (ponto de fusão 54-58°C -QEEL) por 15 minutos e, então, incluídos em forminhas de alumínio contendo o mesmo tipo de parafina.

Foram feitos cortes finos de 7 a 10 μ m de espessura e estes montados em lâmina. Posteriormente o material foi corado com Hematoxilina-Eosina (BEHMER et alii, 1976) segundo metodologia usual. As lâminas foram montadas em bálamo do Canadá.

7. MONTAGEM TOTAL

Os ovários eram retirados das fêmeas em solução salina e a seguir fixados em ácido acético 45% por 1

minuto, lavados em água destilada e colocados em HCl 1N por 10 minutos a 60°C, em banho maria. Daí eram transferidos para frascos contendo reativo de Schiff (LILLIE, 1954) à temperatura ambiente, por 2 a 20 minutos. Em seguida eram lavados 3 vezes em água sulfurosa (metabissulfito de sódio 10% - 1 ml, HCl 1 N - 1 ml, 18 ml de água destilada) 5 minutos cada vez, e por último em água destilada.

Os ovários foram montados em lâminas com gelatina de Glicerina (gelatina - 10 ml, água destilada - 60 ml, glicerol - 70 ml, fenol - 0,25 g) e 1 gota de ácido acético 45%, seguido por um leve esmagamento.

8. DETERMINAÇÃO DAS ÁREAS DAS PROJEÇÕES NUCLEARES DAS CÉLULAS TRÓFICAS

Para determinação das áreas das projeções dos núcleos das células tróficas, foram feitos desenhos dos 4 maiores núcleos dos folículos típicos de cada fase. Para tanto, foram utilizados papel milimetrado e microscópio binocular equipado com câmara clara e ocular gradeada.

As áreas foram calculadas somando-se os quadrados milimétricos.

9. TÉCNICAS ESPECIAIS DE COLORAÇÃO

9.1. Preparo do material

Os ovários fixados por 1 minuto em ácido acético 45% foram submetidos ao esmagamento entre lâmina e lamínula e mergulhados em nitrogênio líquido, o que permitia a remoção da lamínula. A seguir, as lâminas foram mergulhadas em álcool 70% por 3 a 5 minutos. Foram então secadas ao ar e coradas por um dos processos descritos abaixo.

9.2. Colorações

9.2.1. AZUL DE TOLUIDINA

As lâminas foram submetidas a um tratamento com uma solução de RNase (*Sigma) a 0,05% a 37°C em câmara úmida por 60 minutos. A seguir, o material tratado previamente com RNase bem como aquele não tratado (controle) foram corados com uma solução de azul de toluidina (Merck) a 0,025% em tampão Mc Ilvaine a pH 4,0 (LISON, 1960) por 15 minutos. Posteriormente o material foi rapidamente lavado em água destilada, secado ao ar, diafanizado em xilol por 10 minutos e montado em bálsamo do Canadá.

9.2.2. ALARANJADO DE ACRIDINA

As lâminas foram lavadas em tampão Mc Ilvaine por 5 minutos e em seguida coradas com uma solução de alaranjado de acridina diluído (10^{-4}) no mesmo tampão por 20 minutos. Foram, então, lavadas 3 vezes (5 minutos cada), montadas nesta mesma solução e examinadas imediatamente ao microscópio de fluorescência.

9.2.3. BANDA C

Inicialmente o material foi tratado com uma solução de $Ba(OH)_2$ 5% por 90 segundos e a seguir lavado em água destilada (SUMNER, 1972). As lâminas foram, então incubadas em 2SSC (NaCl 0,3M + citrato de sódio 0,03M) a 60°C por 4 horas e 30 minutos em banho maria, lavadas em água destilada e secadas ao ar. Em seguida foram coradas com solução de Giemsa (Gurr) a pH 7 durante 30 minutos, lavadas rapidamente em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol por 10 minutos e montadas em bálsamo do Canadá.

10. FOTOGRAFIAS

Para fotografar os diferentes estágios e

alguns detalhes característicos foi utilizado um fotomicroscópio Zeiss e filme Plus-x pan (Kodak); para a fotografia nº 25 o filme foi KODAKOLOR.

11. CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

Os dados sobre a distribuição das fêmeas nas diferentes fases pelo tempo do experimento foram descritos segundo o diagrama de blocos (TUKEY, 1977).

Os comprimentos, larguras e volumes médios e respectivos desvios foram calculados pelo pacote MINITAB versão 79, implantado no computador DIGITAL DEC 10 da UNICAMP.

O valor t usado para compará-los foi calculado do segundo teste t corrigido de Welch (BICKEL & DOKSUM, 1977).

O teste usado para expressar a correlação entre comprimentos e larguras médios foi o teste Z de Fisher (ANDERSON, 1958).

III. RESULTADOS

3.1.

3.1.1. MORFOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR INTERNO

C. putoria apresenta aparelho reprodutor bastante semelhante às demais espécies estudadas da família Caliphoridae. As fêmeas apresentam 2 ovários, cada um composto de um número variável de ovários politróficos. Há 2 ovidutos laterais que se fundem para formar um oviduto comum que leva à vagina. Existem 3 espermatecas, 2 das quais agrupadas e a outra isolada. Consistem de vesículas esclerotizadas aproximadamente esféricas com dutos entrando dorsalmente na vagina. Há um par de glândulas acessórias tubulares com entrada na vagina perto dos dutos das espermatecas (Figura 1).

Em cada ovário uma rede densa de traquéias se enovela por entre os ovários. Cada ovário é um tubo que contém células germinativas, células tróficas e células do epitélio folicular, dispostas do ápice à base do ovário num arranjo que será compreendido quando da descrição das fases. Duas camadas envolvem cada ovário: uma membrana interna ou túnica própria e uma bainha celular externa. Essa dupla camada forma, na porção apical do ovário, o filamento terminal que, no conjunto, formam o ligamento suspensor do ovário, e na porção basal forma o pedicelo que liga o ovário ao oviduto lateral.

3.1.2. DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO OVARIANO

Os folículos ovarianos de um mesmo ovário apresentam desenvolvimento sincrônico e ocorrem de acordo

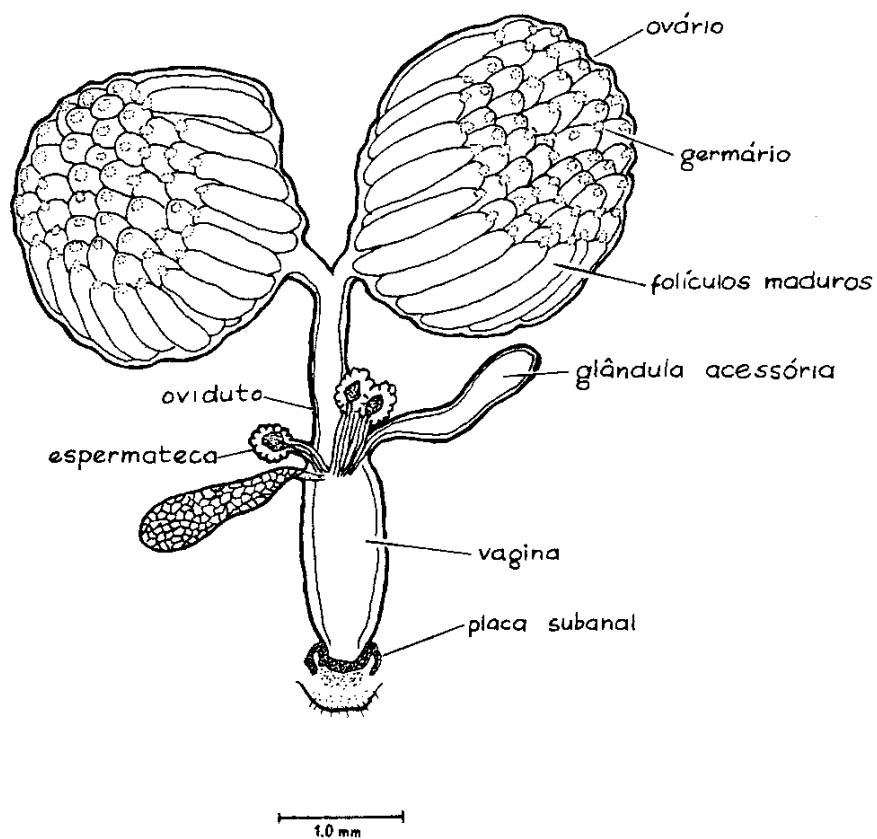
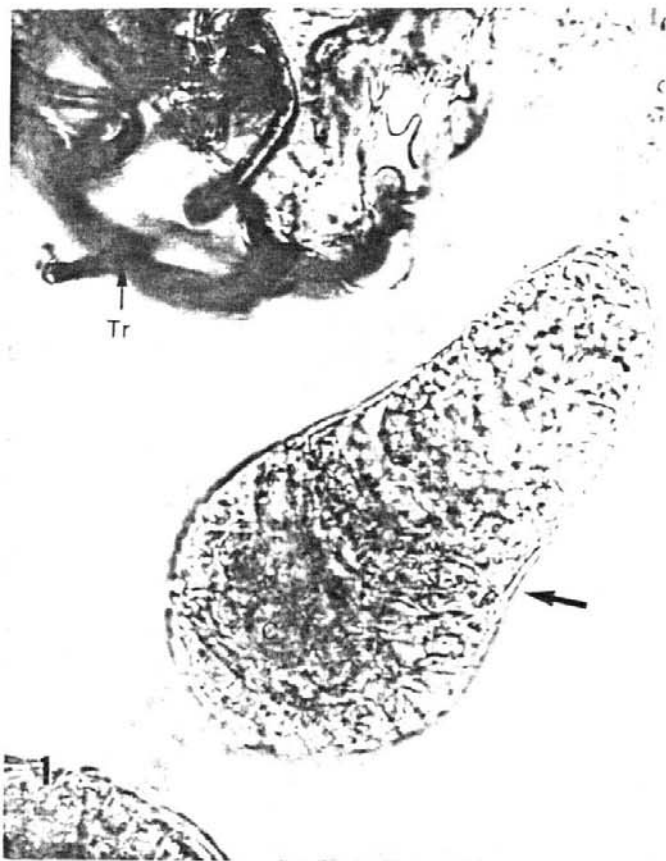


FIGURA Nº 1 - Esquema do aparelho reprodutor interno de uma fêmea com folículos maduros. Para melhor visualização, os ovários estão em vista ventral e o restante em vista dorsal.

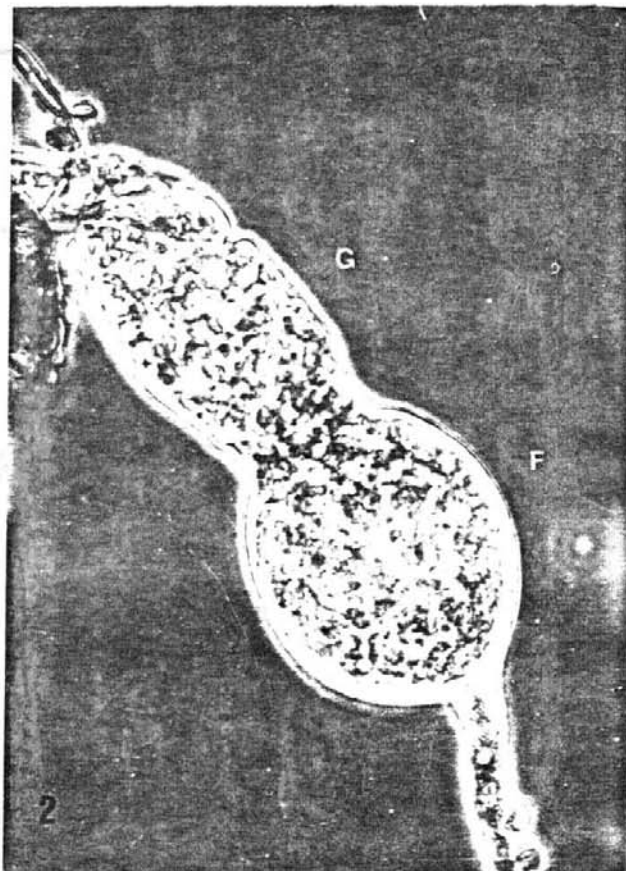
com a seguinte sequência:

FASE I - Assim que a fêmea emerge o ovaríolo contém no seu ápice um germário piriforme contendo células germinativas (oogônias) e células somáticas pré-foliculares. As oogônias sofrem uma primeira divisão dando cada uma um cistoblasto e outra célula oogonial que continuará esse tipo de divisão. Os citoblastos sofrendo 4 divisões mitóticas originarão cada um 16 células. Essas 16 células filhas formam na região posterior do germário um cisto esférico, envolvido pelas células foliculares. Este cisto é separado do restante do germário por uma camada transversal de células foliculares, e quando ele se torna completamente envolvido pelo epitélio folicular (simples) é empurrado para fora do germário e torna-se o primeiro folículo (Fotografia n° 1).

FASE II - O folículo ovariano agora totalmente separado do germário é aproximadamente esférico e os 16 cistócitos se diferenciam em 15 células tróficas e 1 oócito (Fotografia n° 2). O oócito ocupa a parte mais basal do folículo e num exame a fresco ao microscópio seu núcleo não difere em tamanho e aparência dos 15 demais. O epitélio folicular envolvendo o folículo é cuboidal (fotografia n° 3) e o número de suas células é aumentado por sucessivas divisões mitóticas (fotografia n° 4). Dentro desta fase ocorrem alterações morfológicas cromatínicas interessantes nos núcleos das células tróficas. São visíveis estruturas típicas de politenia (Fotografia n° 4) seguidas por um retorno a um estado estrutural mais pulverizado, em que não se detectam cromossomos politênicos individualizados. Nesta última fase os núcleos são maiores do que os da fase com entidades politênicas, o que é sugestivo de uma poliploidização.



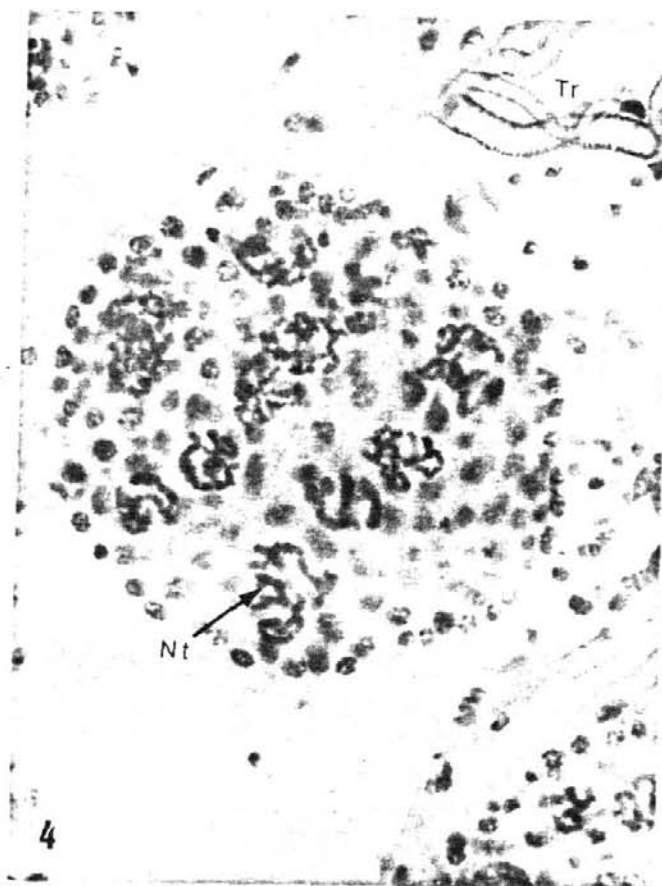
FOTOGRAFIA Nº 1
Um folículo em fase I. C: cistócitos; Tr: traquêias; seta: indentação das células foliculares. A fresco (X 720).



FOTOGRAFIA Nº 2
Folículo em fase II. Separação quase total entre folículos (F) e germário (G). A fresco, contraste de fase (X 640).



FOTOGRAFIA Nº 3
 Folículo em fase II mais desenvolvido que o da fotografia nº 2. Epitélio folicular (Ef) cubóide. Nt: núcleo de célula trófica. G=Germário Corte histológico, H.E., (X 670)



FOTOGRAFIA Nº 4
 Folículo em fase II. Núcleos das células tróficas (Nt) com cromossomos politênicos. Feulgen, montagem total, (X 880).

FASE III - O folículo torna-se maior, com os núcleos mais espaçados entre si, e os das células tróficas bem maiores que o do oócito. Este ocupa um pequeno espaço quando comparado ao ocupado pela câmara trófica (conjunto das células tróficas). As sucessivas endomitoses provavelmente se iniciam na fase anterior e continuam a ocorrer nesta e nas subsequentes. Como essas divisões não são sincronizadas nos diferentes núcleos das células tróficas, a partir dessa fase ocorre uma polarização dos mesmos, ficando os maiores e com maior ploidia localizados mais basalmente, adjacentes ao oócito, enquanto os menores e com menor ploidia são os mais apicalmente localizados. Este processo não sincronizado em todos os núcleos é bem evidente na fotografia n° 5 onde vemos as aparências dessemelhantes dos núcleos, alguns compactos e outros bastante frouxos, pouco delimitados.

Ao final da fase III os núcleos adquirem todos uma aparência mais compactada e homogênea (porém com diferentes volumes) e torna-se visível neles um corpúsculo fortemente Feulgen positivo nos núcleos (fotografia n° 6). As células do epitélio folicular já não são tão cubóides quanto na fase II, estando um pouco mais achatada, porém não pavimentosas. O núcleo do oócito é Feulgen negativo ficando somente um ponto fortemente Feulgen positivo (fotografia n° 7).

FASE IV - O folículo cresce mais, torna-se levemente elipsóide, e ao redor do núcleo do oócito começam aparecer grânulos de vitelo (fotografia n° 8). O epitélio continua como na fase III. O germário inicia a divisão para dar origem a outro folículo.

FASE V - O folículo continua a crescer e



FOTOGRAFIA Nº 5

Folículos em fase III.

Alguns núcleos pulveriza-
dos, outros mais compac-
tos. Seta: ponto forte-
mente corado nos núcleos
das células tróficas. Feu-
gen, montagem total,

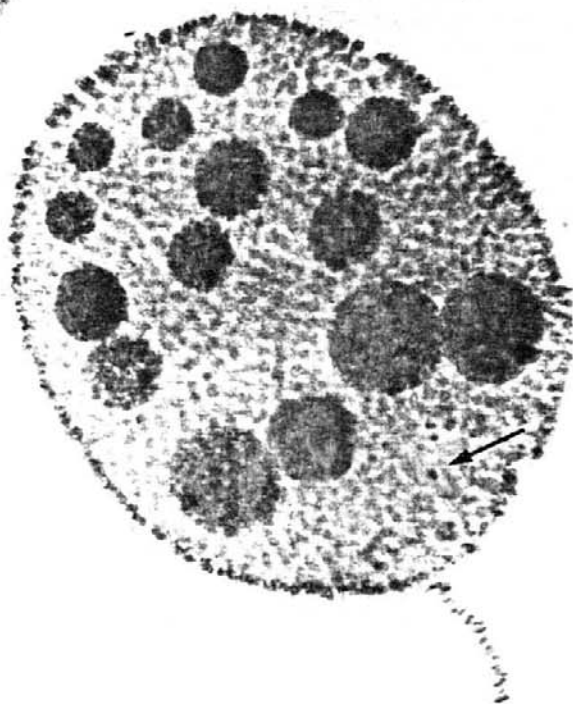
(X 360).



FOTOGRAFIA Nº 6

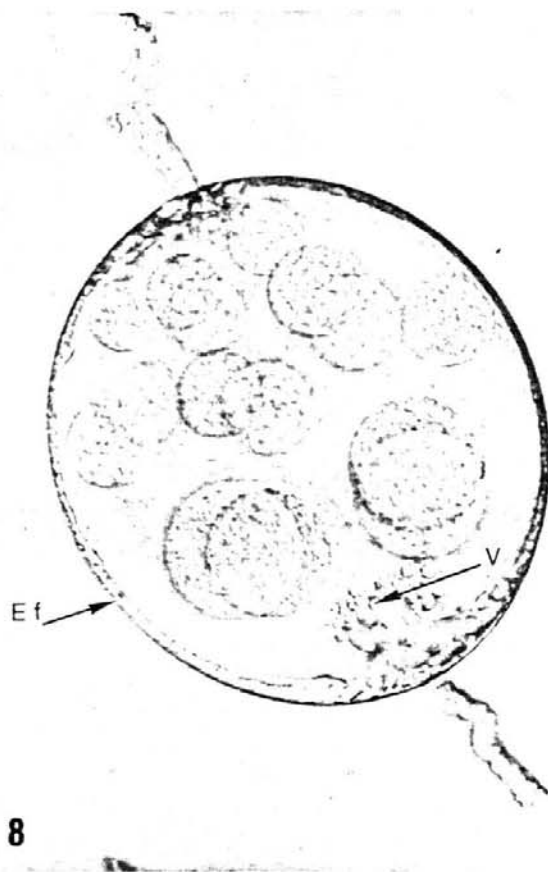
Folículo em fase III. Di-
ferentes tamanhos de nú-
cleos de células trófi-
cas (Nt). Oócito locali-
zado basalmente. No: nú-
cleo do oócito. Corte
histológico, H.E.

(X 880).



FOTOGRAFIA Nº 7
 Folículo em fase IV com
 15 núcleos de células
 tróficas visíveis. Seta:
 ponto Feulgen positivo
 no núcleo do oócito. Feul
 gen, montagem total
 (X 440).

7



FOTOGRAFIA Nº 8
 Folículo em fase IV com
 grânulos de vitelo (V)
 depositando-se ao redor
 do núcleo do oócito. A
 fresco (X 340).

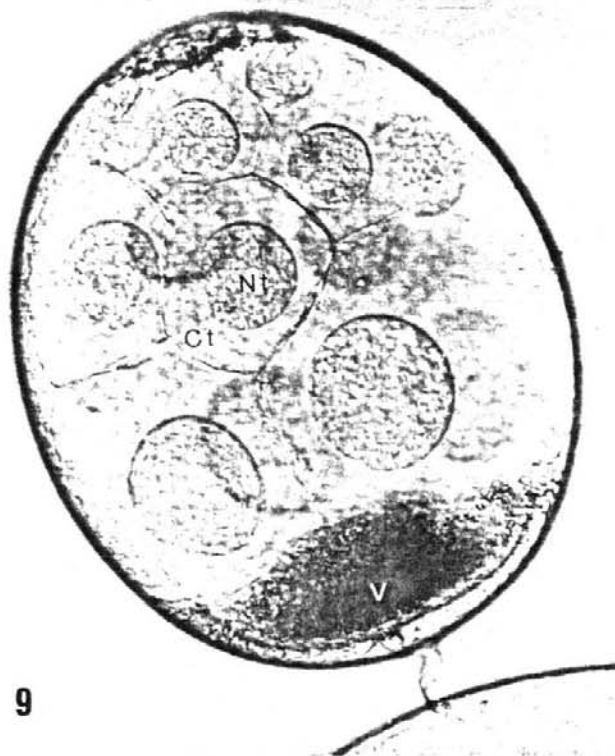
8

torna-se um pouco mais elipsóide. A deposição de vitelo toma a forma de um U invertido ao redor do núcleo do oócito (fotografias nº 9 e 10).

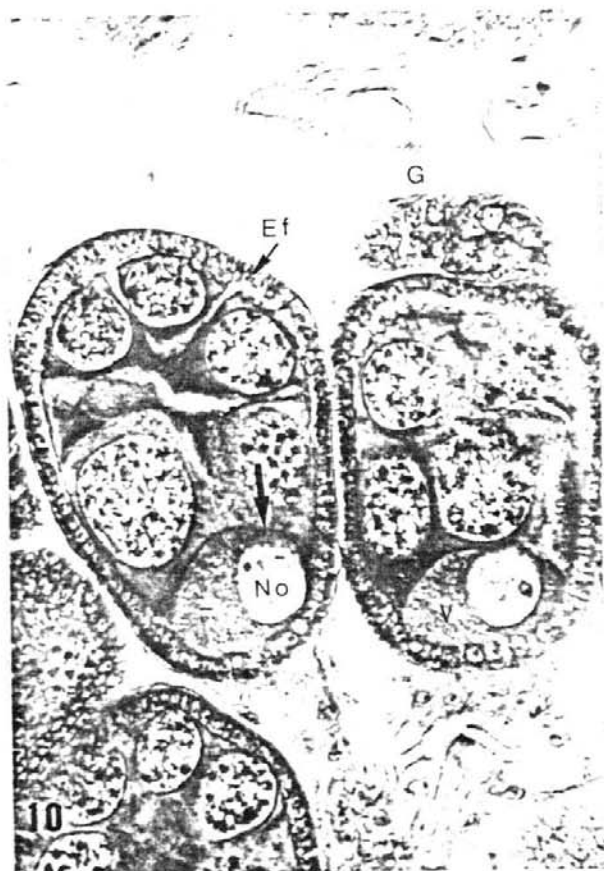
FASE VI - Nesta fase o oócito cresceu preenchido por vitelo até atingir $\pm 1/3$ do comprimento total do folículo. Parece terem cessado as divisões mitóticas das células foliculares do epitélio havendo a partir daí somente mudanças na forma e densidade das mesmas (comparar fotografias nºs 16 e 22). Assim o epitélio que circunda o oócito passou de cubóide para colunar e o que envolve as células tróficas permanece cubóide (fotografia nº 11).

FASE VII - O folículo torna-se mais alongado e o oócito já ocupa $\pm 1/2$ do comprimento total. Cerca de 8 células "border" aparecem na porção anterior da câmara trófica, originárias das células foliculares e começam sua migração posterior através da câmara trófica (fotografia nº 12, 13 e 14). O núcleo do oócito está acolado ao limite do oócito com câmara trófica (fotografia nº 15). Nesta fase as células foliculares que envolvem a câmara trófica iniciam uma migração posterior mais conspícua para a região do oócito, fazendo com que a densidade das células aí torne-se alta enquanto que na parte anterior seja baixa. Como a área superficial do folículo é ainda maior, as células que restaram envolvendo a câmara trófica tornam-se bastante achatadas, ao passo que as que estão na região com maior densidade tornam-se colunares, bastante altas.

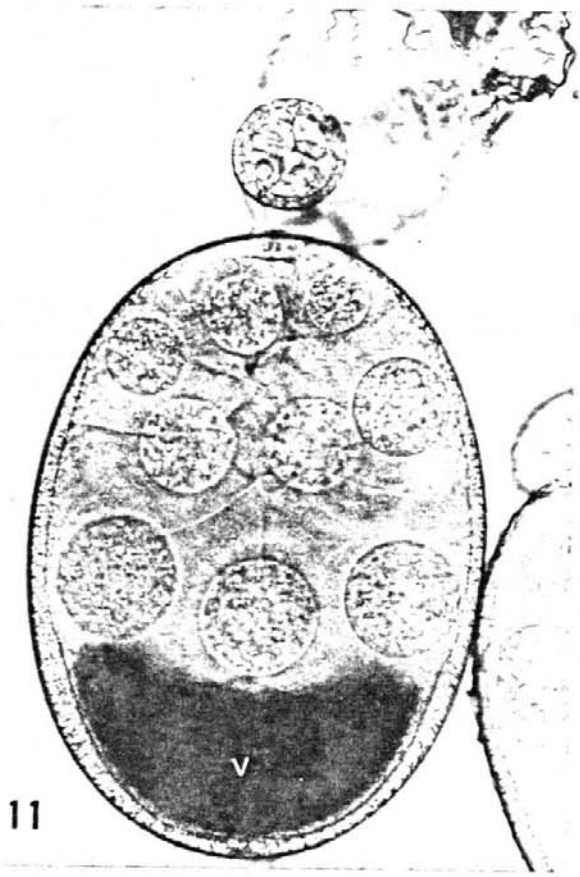
FASE VIII - O folículo está mais alongado e o oócito ocupa $\pm 2/3$ do comprimento do folículo. As células "border" terminam a migração chegando à interface oócito-câmara trófica. Células foliculares pavimentosas migram para o interior do folículo formando uma parede entre



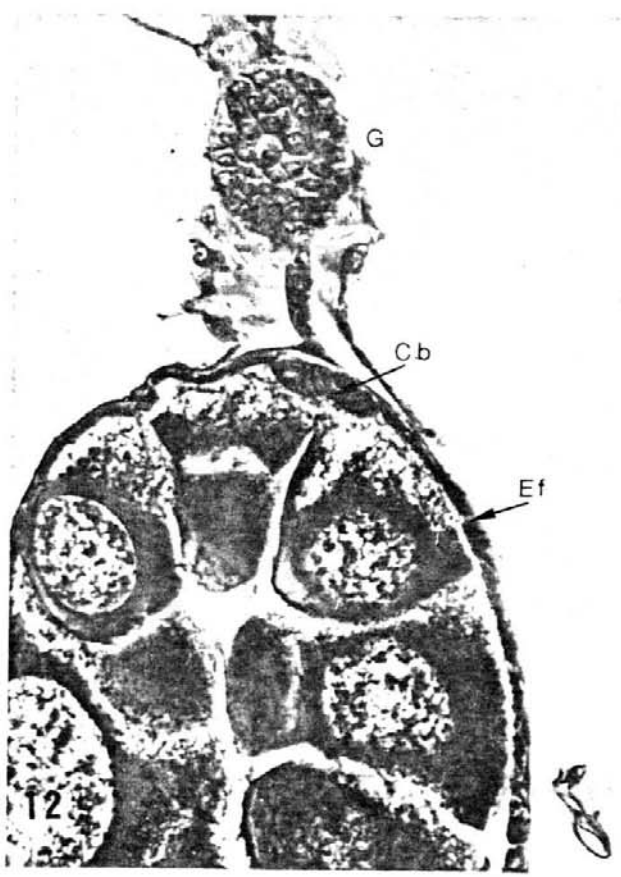
FOTOGRAFIA Nº 9
Folículo em fase V com
alguns limites visíveis
entre células tróficas
(Ct). Seta: limite en-
tre oócito e câmara trô-
fica. A fresco
(X 340).



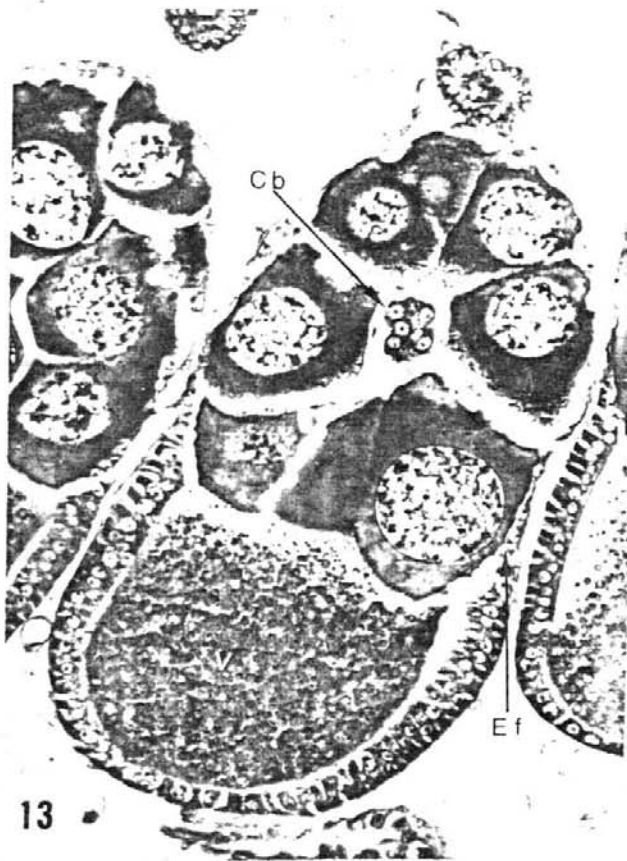
FOTOGRAFIA Nº 10
Folículos em fase V evi-
denciando a deposição
do vitelo em forma de U
invertido ao redor do
núcleo do oócito (No).
Corte histológico, H.E.
(X 460).



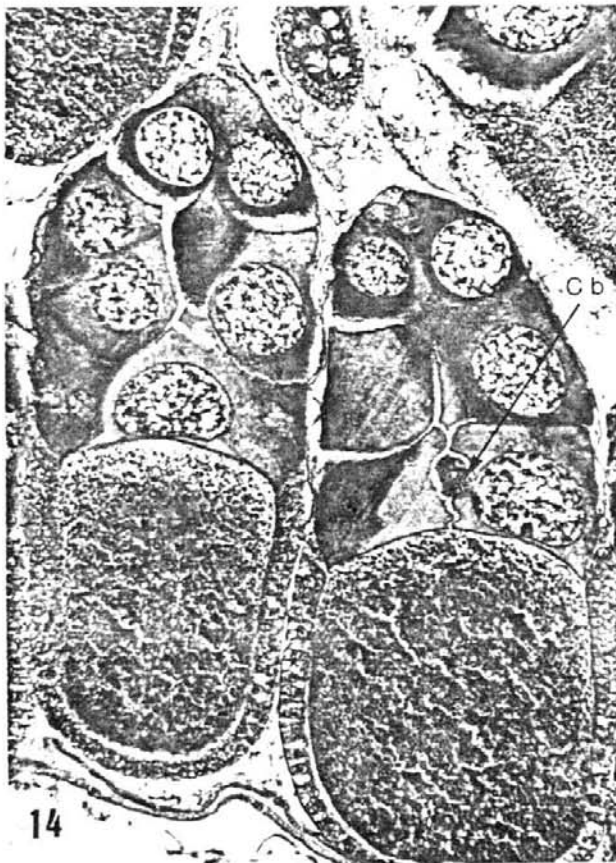
FOTOGRAFIA Nº 11
 Folículo em fase VI com
 cerca de 1/3 de vitelo
 (V) depositado. A fres-
 co (X 220).



FOTOGRAFIA Nº 12
 Folículo (parte) em iní-
 cio de fase VII. Forma-
 ção das células "border"
 (Cb) na região apical
 da câmara trófica. Cor-
 te histológico, H.E.
 (X 490).



FOTOGRAFIA Nº 13
Folículos em fase VII com migração das células "border" até à metade da câmara trófica. Transição na forma do epitélio folicular (Ef). Corte histológico, H.E. (X 240).



FOTOGRAFIA Nº 14
Folículos em fase VII com células "border" quase no final da migração. Corte histológico, H.E. (X 240).

câmara trófica e oócito. As células foliculares que circundam o oócito começam secretar a membrana vitelina (fotografia nº 16).

FASE IX - O folículo alongado tem o oócito ocupando quase que o seu comprimento total ao passo que as células tróficas em degeneração ocupam um pequeno cone anterior. As células foliculares ainda estão presentes porém bastante achatadas e nessa fase aparece o cório secretado por elas (fotografia nº 17).

FASE X - O oócito ocupa totalmente o folículo; as células foliculares e células tróficas desapareceram e vêm-se as linhas de eclosão ao longo do comprimento do folículo (fotografias nºs 18 e 21).

3.1.3. CONDIÇÃO DA 2ª CAMADA DE FOLÍCULOS NAS DIFERENTES FASES

Quando no ovariolo é encontrado um folículo em fase IV, portanto, em início de deposição de vitelo, o germário já está iniciando a formação de um 2º folículo. Na fase V e subseqüentes, esta separação do germário já se realizou e a partir da fase VII, o 2º folículo está com os núcleos das células tróficas polarizados, mas sem iniciar a vitelogênese (Fase III) (fotografia nº 19).

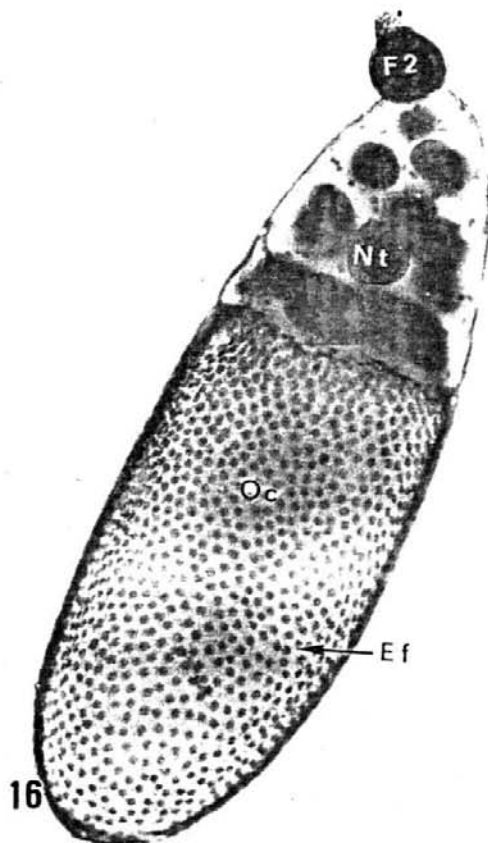
3.2. DIMENSÕES DOS FOLÍCULOS

Pela Tabela nº 2 pode-se ver que houve crescimento do comprimento do folículo totalizando 20 vezes, a partir do comprimento inicial (fase II). O comprimento da fase I encontrado maior do que o da fase II deve-se ao fato que na fase I o folículo ainda não se separou do germário e, assim, a medida representa folículo + germário. A partir



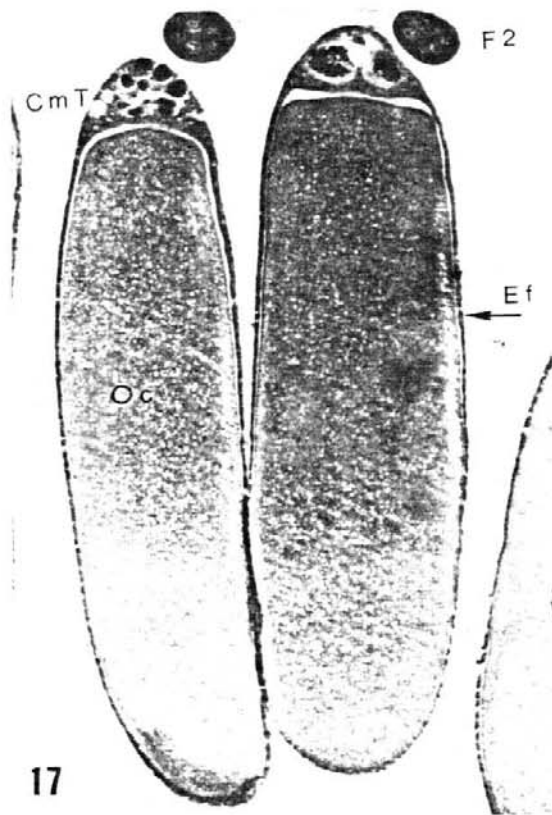
15

FOTOGRAFIA Nº 15
 Folículo em fase VII. Ef: indicando transição do epitélio folicular de pavimento, ao redor da câmara trófica, para colunar, ao redor do oócito. Seta: núcleo do oócito, no limite entre oócito e câmara trófica. A fresco, (X 170).



16

FOTOGRAFIA Nº 16
 Folículo em fase VIII com núcleos das células foliculares bem visíveis, salientando a diferença na densidade das mesmas ao redor do oócito e da câmara trófica. F₂: folículo seguinte. Feulgen, montagem total (X 140).



17

FOTOGRAFIA Nº 17
Foliculos em fase IX com câmara trôfica (CmT) reduzida ao cone apical. Epitêlio folicular bastante achatado ao redor do oócito (Oc). Membrana vitelínica presente entre oócito e epitêlio folicular (Ef). Segundo folículo (F2) presente. Corte histológico, H.E. (X 135).



18

FOTOGRAFIA Nº 18
Folículo em fase X. A fresco (X 90).



FOTOGRAFIA Nº 19

Folículos da primeira (F1) e segunda (F2) camadas. F1 em fase V e F2 em fase II. Ger_mário (G). Corte histológico, H.E. (X 560).

de fase II, após a diferenciação do folículo, a medida refere-se somente a ele. O teste t de WELCH corrigido para os graus de liberdade só não mostrou significância quando comparou fase IX e VIII, indicando que não há acréscimo no comprimento entre essas fases.

A largura aumenta até a fase VIII cerca de 12 vezes e, a partir daí, diminui até a fase X cerca de meia vez. O teste t mostrou não haver mudança na largura entre a fase VI e VII (Tabela nº 3).

O volume do folículo aumenta até a fase VIII de cerca de 2539 vezes, diminuindo posteriormente até a fase X. No final o volume atingido pelo folículo foi em torno de 1140 vezes o inicial (Tabela nº 4).

Até que o folículo alcance um comprimento de 345 *um* (fase V) o aumento do mesmo é devido principalmente às células tróficas, cujos núcleos atingiram um volume 10 vezes maior que o existente na fase I. Quando atinge a fase V o oócito ainda ocupa pequeno volume dentro do total do folículo. A partir de então o oócito começa a crescer consideravelmente, o que é evidenciado pela aumentada deposição de vitelo, chegando finalmente a ocupar a totalidade do folículo.

A Tabela nº 5 apresenta a correlação entre comprimento e largura de cada fase. Existe boa correlação somente nas fases de II a VI.

TABELA 2 - Comprimento médio em um do folículo ovariano nas diferentes fases, e respectivo desvio. Valores do teste t obtidos para cada 2 fases sucessivas, com os graus de liberdade (G.L.) e significância do mesmo valor (valor p).

fase	n	μ m comprimento X	desvio	valor t	G.L.	valor p
I	22	101,53	10,38			
II	78	70,78	13,60	-11,41	23	\ll .0005
III	66	157,38	47,16	14,42	66	\ll .0005
IV	86	207,18	47,13	6,45	68	\ll .0005
V	22	345,88	78,48	7,93	24	\ll .0005
VI	37	560,45	144,45	7,39	26	\ll .0005
VII	14	779,57	157,87	4,53	18	\ll .0005
VIII	22	1380,14	238,71	9,09	15	\ll .0005
IX	10	1350,05	83,18	-0,52	20	> .25
X	90	1447,49	74,97	3,55	9	< .005

TABELA 3 - Largura média em μm do folículo ovariano nas diferentes fases e respectivo desvio. Valores do teste t obtidos para cada 2 fases sucessivas, com os graus de liberdade (G.L.) e significância do mesmo (valor p).

fase	n	μm		valor t	G.L.	valor p
		largura X	desvio			
I	22	34,98	3,69	10,40	35	\ll .0005
II	78	51,27	11,96	17,52	67	\ll .0005
III	66	133,29	36,39	6,56	68	\ll .0005
IV	86	171,36	34,39	9,50	26	\ll .0005
V	22	265,09	42,88	3,95	26	< .0005
VI	37	326,61	76,81	1,13	21	> .10
VII	14	349,72	60,19	6,89	13	< .0005
VIII	22	475,88	42,78	-7,78	14	\ll .0005
IX	10	363,38	36,19	-4,12	9	< .0025
X	90	311,51	49,38			

TABELA 4 - Volume médio em μm^3 do folículo ovariano nas direntes fases, e respectivo desvio. Valores do teste t obtidos para cada 2 fases sucessivas, com os graus de liberdade (G.L.) e significância do mesmo valor.

fase	n	μm^3		desvio	valor t	G.L.	valor p
		volume	X				
I	22	66.152,82		16.075,65			
II	78	108.711,94		73.906,42	4,71	45	\ll .0005
III	66	1.813.266,4		1.635.323,9	8,46	65	\ll .0005
IV	86	3.603.972,1		2.472.505,3	5,36	72	\ll .0005
V	22	13.954.056,0		8.524.099,6	5,57	22	\ll .0005
VI	37	31.840.874,0		20.112.703,0	5,67	28	\ll .0005
VII	14	52.420.166,0		23.541.940,0	2,40	17	\ll .01
VIII	22	167.979.626,0		48.087.503,0	9,61	16	\ll .0005
IX	10	94.189.769,0		18.676.224,0	-6,24	19	\ll .0005
X	90	75.541.414,0		25.234.330,0	-2,88	9	\ll .01

TABELA 5 - Correlação entre comprimento e largura dos folículos de cada fase ovariana, valor obtido pelo teste Z de FISHER e significância desses (valor p).

Fase	correlação C/L	Teste Z FISHER	valor p
I	0,341	1,548	> .01
II	0,633	6,464	« .0005
III	0,921	12,664	« .0005
IV	0,932	15,245	« .0005
V	0,950	7,985	« .0005
VI	0,674	4,770	« .0005
VII	0,339	1,171	> .10
VIII	0,453	2,129	> .010
IX	-0,001	0,003	> .90
X	0,143	1,343	> .01

3.3. DISTRIBUIÇÃO DAS FÊMEAS PELAS DIFERENTES FASES

A figura 2 nos mostra a distribuição pelas diferentes fases do desenvolvimento ovariano das 341 fêmeas amostradas no decorrer do tempo que durou o experimento. Este teve início à 0 hora, ou seja, quando as moscas começaram a emergir e encerrou-se às 235 horas, com 100% da amostra atingindo a fase X, isto é, completando o desenvolvimento ovariano.

Cada bloco representa a distribuição das fêmeas em uma dada fase no tempo. Para uma fase n, por exemplo, o primeiro traço horizontal é o primeiro quartil, que delimita que no máximo 75% daquelas fêmeas atingiram a fase n num horário mais avançado e 25% delas, no máximo, antes desse horário. O segundo traço horizontal é a mediana, indicando que, no máximo, 50% dos indivíduos da fase n apareceram além desse horário e 50% no máximo, antes dele. O terceiro traço é o segundo quartil onde 75%, no máximo, daquelas fêmeas atingiram a fase n abaixo desse horário e 25% acima. Os pontos representados por um círculo vazio são chamados pontos soltos e se localizam na região delimitada por uma diferença interquartílica e uma diferença e meia, acima do segundo quartil ou abaixo do primeiro. Os pontos representados por círculo cheio são ditos pontos desgarrados, localizando-se na região acima ou abaixo de uma diferença interquartílica e meia.

Através dessa representação podemos perceber que, na maioria das fases, os primeiros 50% das fêmeas atingem o desenvolvimento correspondente a uma fase n num intervalo de tempo proporcionalmente menor que o dispendido pelos outros 50% do total das fêmeas da fase n. Por exemplo, a

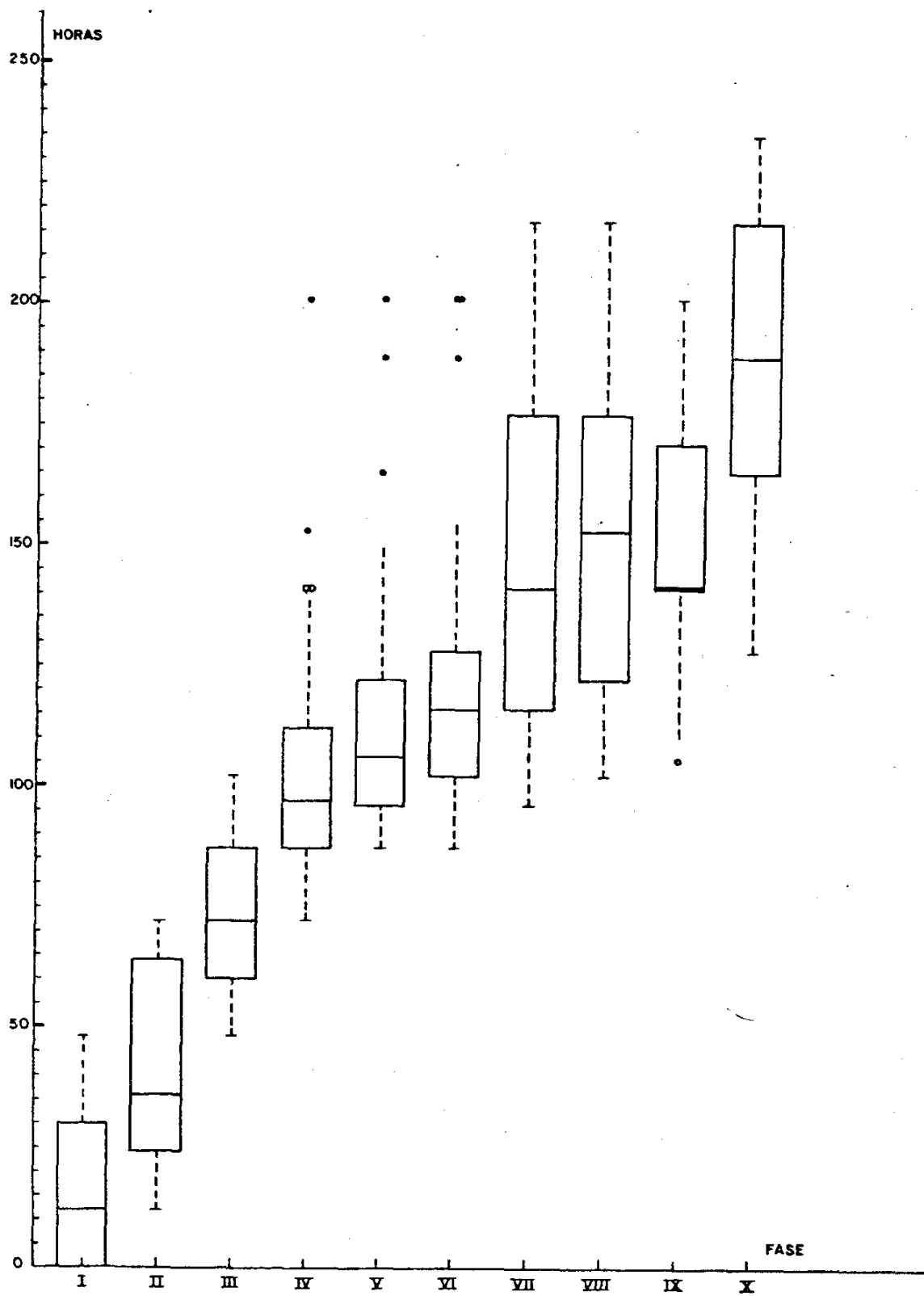


FIGURA Nº 2 - Diagrama de blocos de Tukey representando a distribuição das fêmeas amostradas durante o experimento pelas 10 fases de desenvolvimento ovariano. (Vide texto).

partir da primeira aparição da fase II, em 12 horas 50% das fêmeas atingiram-na, enquanto passaram-se mais 36 horas aparecendo indivíduos com essa fase, os outros 50%. Na fase V, 19 horas após a primeira aparição já tinham surgido os primeiros 50% dos indivíduos e os outros 50% só foram completados com mais 95 horas. Na fase IX, a mesma situação: os primeiros 50% apareceram em 34 horas após a hora 107, ao passo que foram necessários mais 60 horas para que esta fase ocorresse pela última vez no experimento. Neste caso houve uma chegada maciça à fase IX por muitas fêmeas num mesmo horário o que fez com que praticamente 50% do total se concentrassem ao redor desse horário, enquanto os 50% restantes se distribuíram pelas outras 60 horas, tornando o primeiro quartil e a mediana coincidentes.

O único caso em que ocorreu o inverso, isto é, onde os primeiros 50% se distribuíram por um período mais longo que os outros 50%, foi a fase X. Nesta, o aparecimento dos primeiros 50% se prolongou por 61 horas e foram necessários mais 46 horas para que se totalizassem os 100%.

O gráfico nº 1 foi feito usando-se os blocos da figura nº 2. Obteve-se a linha central ligando-se os pontos médios das linhas horizontais que representam as medianas, a linha superior ligando-se os pontos médios dos segundos quartis e a linha inferior os dos primeiros quartis.

Os dados acima do gráfico são um resumo da figura nº 2. e representam para cada fase:

- número total de indivíduos na fase n.

* - último horário em que foi encontrada uma fêmea na fase n.

*	16	26	25	48	16	31	20	25	19	115
*	48	72	102	201	201	201	217	217	201	235
J ₂	30	64	87	112	122	128	177	177	171	217
M	12	36	72	97	106	116	141	153	141	189
J ₁	0	24	60	87	96	102	106	122	141	165
*	0	12	48	72	87	87	96	102	107	128

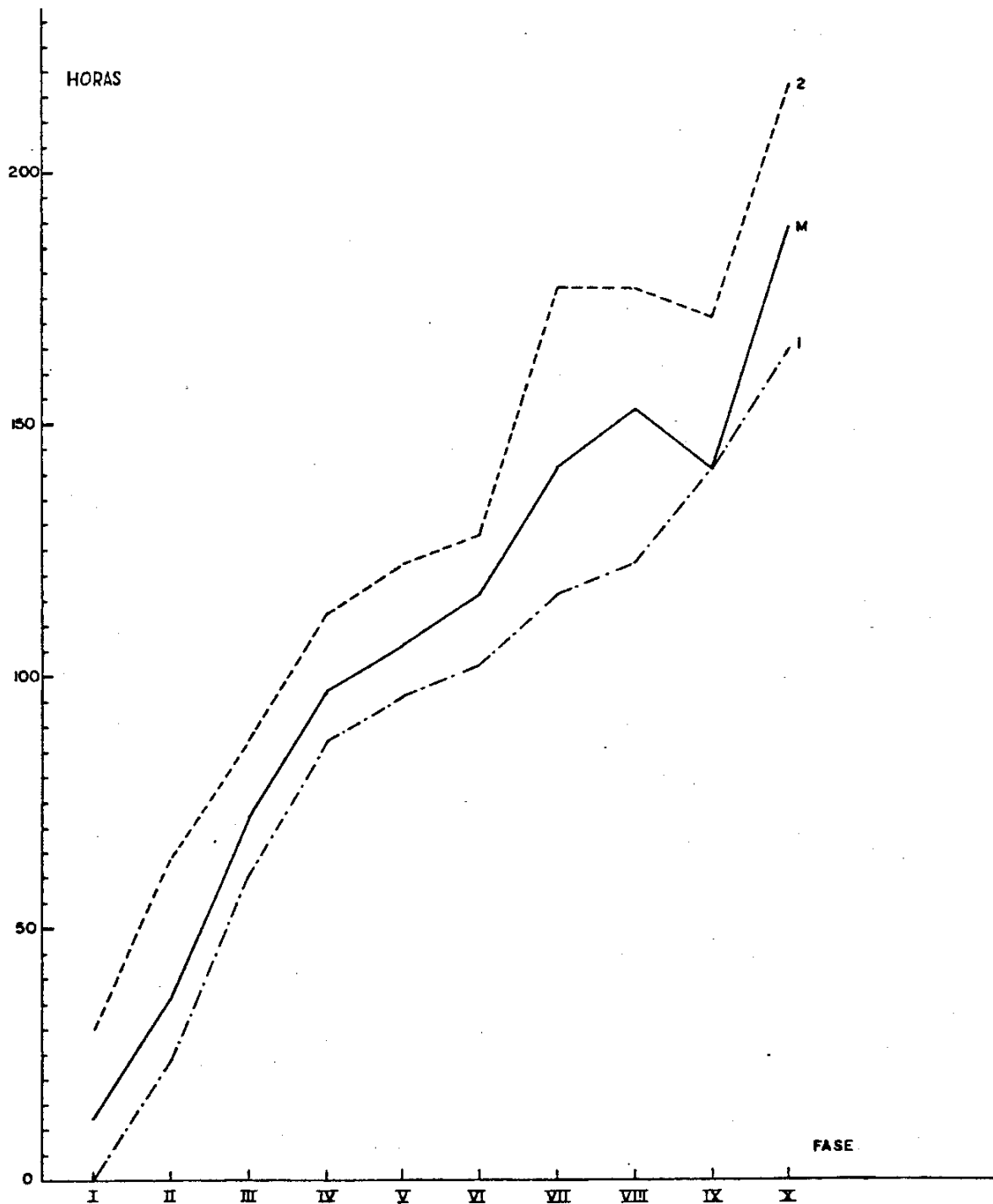


GRÁFICO N° 1 - Obtido a partir da Figura n°2, onde a ligação entre os pontos médios dos 1ºs quartis resultou na linha 1, entre os dos 2ºs quartis, na linha 2 e entre os das medianas na linha M. Os dados acima estão explicados no texto.

- J_2 - hora que representa o segundo quartil da fase n.
M - hora da mediana da fase n.
 J_1 - hora que representa o primeiro quartil da fase n.
* - primeiro horário em que foi encontrada uma fêmea na fase n.

Percebe-se que até a fase VI as três linhas do gráfico mantiveram-se relativamente paralelas, já que a relação de crescimento foi mais ou menos constante entre os pontos dos respectivos quartis e mediana de fases subsequentes. Esse crescimento ordenado é sentido mesmo após a fase IV, quando as curvas sofreram uma inclinação, indicando uma distribuição mais concentrada no tempo dos 50% centrais das fêmeas.

A partir de VII, aliando um crescimento muito rápido dos diferentes pontos, a uma distribuição irregular em alguns casos, o paralelismo entre as linhas deixou de existir.

A inflexão na linha central da fase IX é explicada pelo que foi dito a respeito do desenvolvimento rápido num determinado horário proporcionando a coincidência da mediana e 1º quartil. A inflexão existente na linha superior é devida ao fato de IX ter o segundo quartil com valor inferior ao de VII e VIII, ou seja, uma distribuição mais concentrada no tempo.

3.4. DETERMINAÇÃO DA IDADE CRONOLÓGICA ATRAVÉS DA FASE DE DESENVOLVIMENTO OVARIANO

Através da tabela nº 6, dada uma fase de de-

TABELA 6 - Transformações normalizadoras da idade, intervalos de 95% de confiança para os dados transformados e correspondentes intervalos para os dados brutos, segundo as fases de desenvolvimento ovariano.

Fase	Função Aplicada	$\hat{\gamma}(x) \pm 1,96 \frac{Si}{\sqrt{ni}}$	$\hat{\alpha}$	\bar{x}	\underline{x}
I	$\sqrt{T+1}$	3,79 \pm 1,90	13,36	31,38	2,57
II	\sqrt{T}	6,22 \pm 0,47	38,69	44,76	33,06
III	T	74,88 \pm 7,17	74,88	82,05	67,71
IV	$\ln(T-^{*}+5)$	3,55 \pm 0,20	95,50	101,81	90,34
V	$\ln(T-^{*}+5)$	3,34 \pm 0,41	110,20	124,10	100,73
VI	$\ln(T-^{*}+5)$	3,47 \pm 0,27	114,14	124,10	106,53
VII	\sqrt{T}	12,12 \pm 0,64	144,89	162,82	131,79
VIII	\sqrt{T}	12,22 \pm 0,49	149,33	159,01	135,26
IX	$\log T$	2,12 \pm 0,11	131,83	169,82	102,33
X	$T^{1,3}$	929,81 \pm 36,93	195,05	198,92	187,12

Obs. * valor mínimo das regiões

envolvimento ovariano de uma fêmea nulípara determinamos a idade provável α , compreendida num intervalo de 95% de confiança determinado pelos limites inferior $\underline{\ell}$ e superior $\bar{\ell}$.

Para cada fase, o método utilizado foi o ajustamento do seguinte modelo linear:

$$Y_F = \gamma_F + \xi_F$$

onde F é uma determinada fase, Y_F é uma transformação das idades que normaliza a distribuição da fase, γ_F a média da transformação e ξ_F é o erro aleatório da transformação da idade na fase, devido a fatores incontroláveis.

Por exemplo na fase I a transformação foi $\sqrt{T+1}$, isto é, $Y_I = \sqrt{T_I+1}$. O parâmetro γ_I representa o valor mais provável de $\sqrt{T+1}$. Aplicando a transformação inversa de Y em γ_I obtêm-se $\alpha_I = \gamma_I^2 - 1$, a idade mais provável.

A figura nº 3 obtida com os valores $\bar{\ell}$ e $\underline{\ell}$ dessa tabela nos completa a indicação dada pela figura nº 2 a respeito das sobreposições das fases. Para as fases V e VI foi realizado teste t aproximado de Welch ($t_{26} = -0,249$) resultando não significativo a $\alpha = 0,05$. O mesmo foi feito para as fases VII e VIII ($t_{37} = -0,188$) com igual resultado. Assim, vê-se que as fases V e VI não ocorrem temporalmente de maneira distinta bem como VII e VIII. A fase IX, como já salientado na figura nº 2 ocorreu num intervalo bastante grande, que compreende os intervalos das fases VIII, VII, VI e parte de V.

3.5. O NÚMERO DE FOLÍCULOS DE *Chrysomya putoria*

O número médio de folículos maduros, por ová

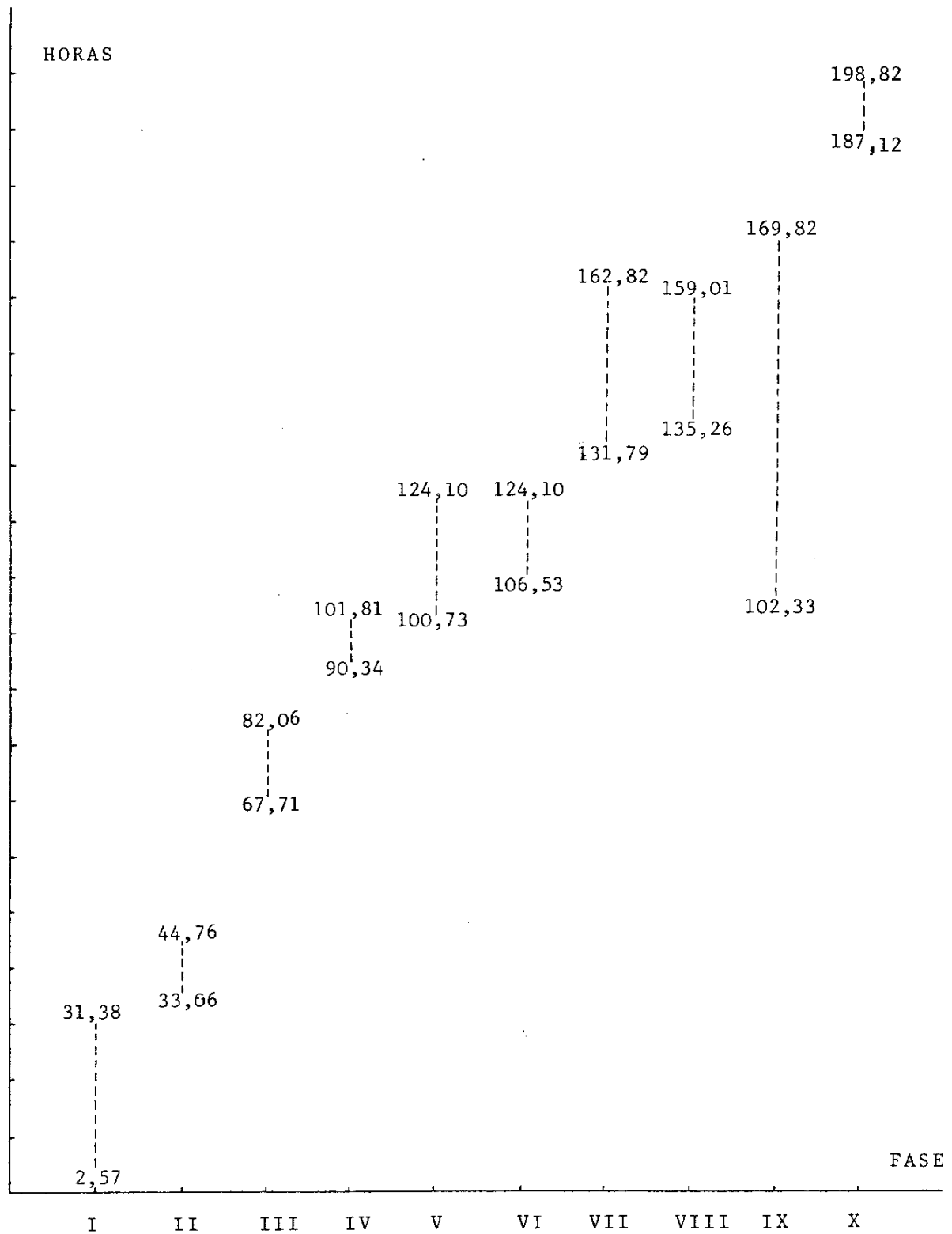


FIGURA Nº 3 - Representação gráfica dos intervalos em horas da distribuição das fêmeas pelas diferentes fases de desenvolvimento ovariano, com 95% de confiança.

rio, encontrado para *C. putoria* foi 76,57, com um desvio padrão de 11,842.

Quando número de folículos e horários em que foram encontrados são colocados num gráfico obtemos o seguinte:

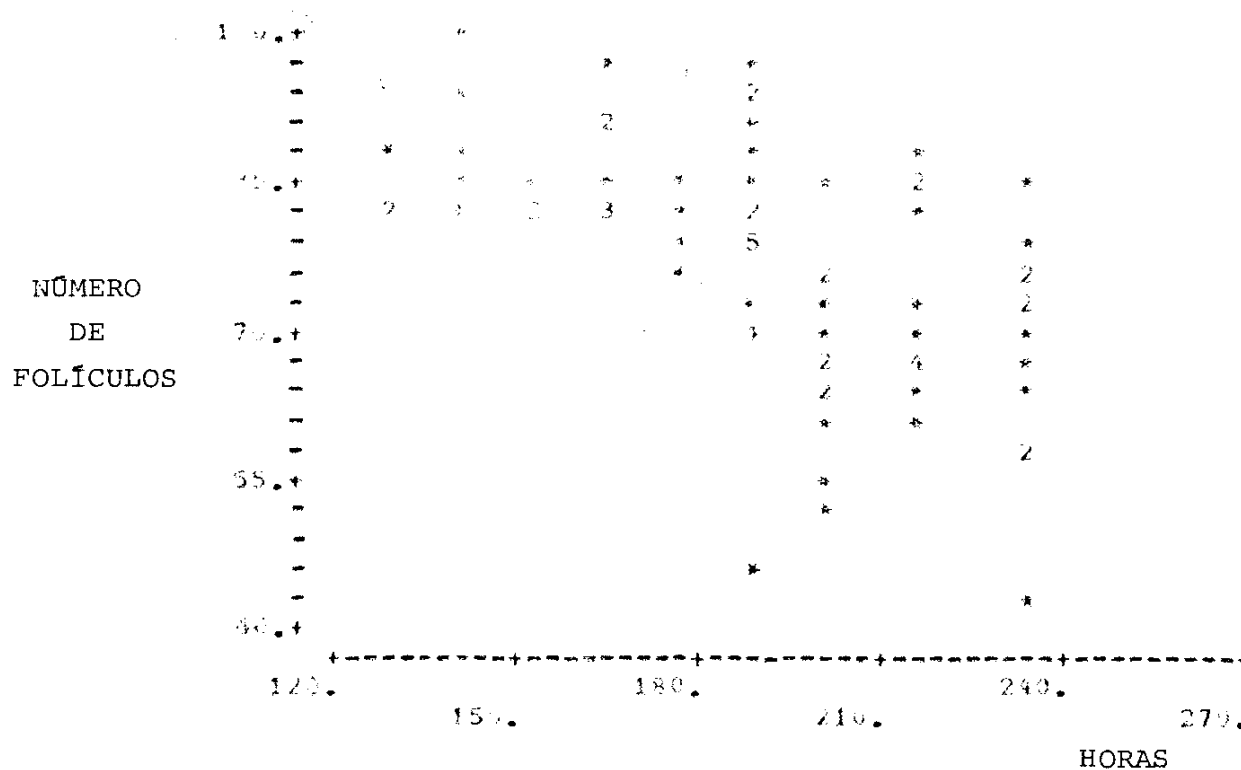


Gráfico Nº 2 - Número de folículos maduros encontrados por ovário de fêmea no decorrer do experimento.

A correlação entre horário e número de folículos resultou $-0,532$ e o teste de Fisher para este valor foi altamente significativo. ($p < .001$).

Pelo gráfico podemos perceber que há uma di-

visão aproximada dos valores em dois grupos: um até 177 horas e outro após este horário. Os valores do 1º grupo apresentam média de 85,636 e desvio padrão 5,9725: a média do 2º grupo é 72,945 e o desvio 11,688. O teste t de Welch feito para estes dois conjuntos resultou valor $t = 6,264$, $GL = 43$; valor $p < 0.001$ (altamente significativo).

Portanto, ao redor desse horário há uma mudança no número de folículos/fêmea, ou seja, diminui o número de folículos/fêmea com o passar do tempo.

Os ovos normalmente são encontrados em grandes massas sobre o fígado ou carne colocados para oviposição. Os locais mais procurados parecem ser os mais úmidos do substrato. Assim, além do desenvolvimento sincrônico dos folículos, a deposição dos mesmos também é feita de uma só vez pelas fêmeas.

As moscas normalmente bastante agitadas quando da abertura das gaiolas para manutenção, parecem tornar-se indiferentes a este fato quando estão no processo de oviposição, podendo, mesmo, serem retiradas do local com a mão.

3.6. TESTE DE DESENVOLVIMENTO COM DIETA APROTEICA

As fêmeas submetidas à dieta aprroteica não mostraram qualquer desenvolvimento dos folículos ovarianos além da fase III, ou seja, a vitelogênese não foi iniciada nem mesmo após 47 dias de vida imaginal, como mostram as Tabelas nº 7 e nº 8.

TABELA 7 - Fases de desenvolvimento alcançadas pelos folículos ovarianos de moscas submetidas a dieta aprorteica em gaiolas contendo machos e fêmeas.

DIA	Nº DE FÊMEAS	FASE DO FOLÍCULO
1	6	I
5	6	II
6	10	II
8	6	III
10	8 2	II III
14	5 1	II III
16	1 6	II III
18	1 4	II III
21	6 1	II III
22	1 6	II III
23	6	II
27	4 1	II III
30	6	II
33	6	II
38	5	III
40	2 4	II III
42	1 4	II III
45	3	III

TABELA 8 - Fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos de moscas submetidas a dieta aprroteica em gaiolas contendo somente fêmeas.

DIA	Nº DE FÊMEAS	FASE DO FOLÍCULO
8	10	II
19	5	III
26	6	II
34	5	III
44	6	III
47	5	III

OBS.: A classificação dos folículos nas diferentes fases foi feita usando as características que mais os aproximavam daquelas observadas nas fases descritas com dieta padrão, pois ocorrem alterações nas formas dos folículos sob dieta aprroteica.

3.7. TESTE DE DESENVOLVIMENTO COM DIETA APROTEICA SEGUIDA POR DIETA NORMAL

Em todas as gaiolas onde foi acrescentado fígado, após diferentes períodos sob dieta aprroteica, houve ogênese completa (Tabelas nº 9 e nº 10). No caso das gaiolas com machos e fêmeas, os ovos aí encontrados eram férteis e os indivíduos resultantes desses ovos foram criados sob dieta normal produzindo ovos igualmente férteis.

Na gaiola somente com fêmeas, o tempo decorrido após introdução de fígado (14 dias) foi suficiente para que existissem até duas camadas de ovos.

TABELA 9. Fases de desenvolvimento alcançadas pelos folículos ovarianos de fêmeas submetidas a dieta aprroteica seguida por dieta normal em gaiolas com machos e fêmeas.

14 dias com açúcar + 6 dias com fígado	
nº de fêmeas	fase dos folículos
3	IV
1	V
1	VI
2	VII
2	X

23 dias com açúcar + 7 dias com fígado	
nº de fêmeas	fase dos folículos
2	VIII
9	X

45 dias com açúcar + 10 dias com fígado	
nº de fêmeas	fase dos folículos
3	VI
1	X

TABELA 10. Fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos de fêmeas submetidas a dieta aprroteica seguida - por dieta normal em gaiola contendo somente fêmeas.

47 dias com açúcar + 14 dias com fígado	
nº de fêmeas	fase dos folículos
1	X
2	X + X (2 camadas)

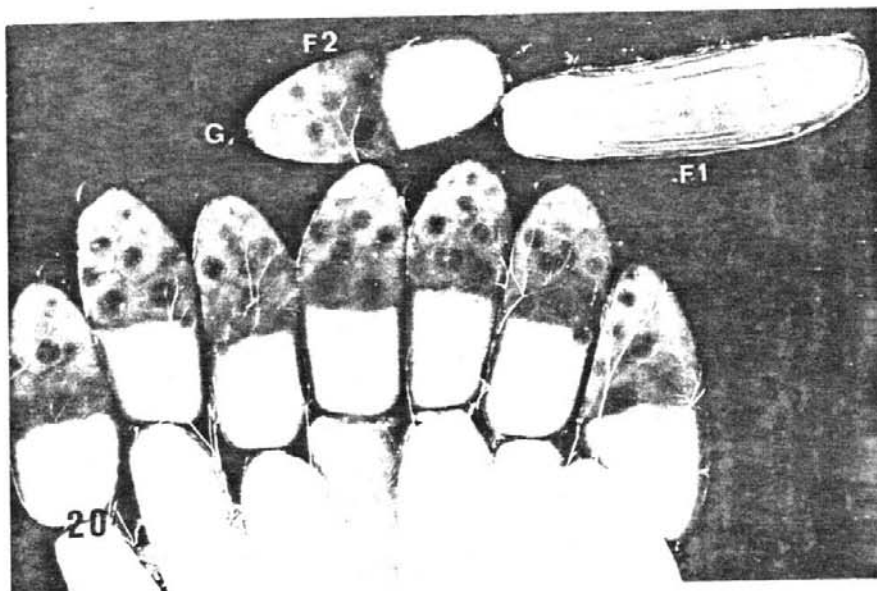
Obs.: Folículos de IV a VI são os do segundo lote das que já haviam oviposto.

3.8. TESTE PARA VERIFICAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO 2º FOLÍCULO EM PRESENÇA DO 1º

De acordo com os dados da tabela nº 11, após 34 dias sob as condições assinaladas, todas as fêmeas apresentavam duas camadas de folículos ovarianos completamente desenvolvidos. Aos 21 dias uma fêmea já apresentava as duas camadas.

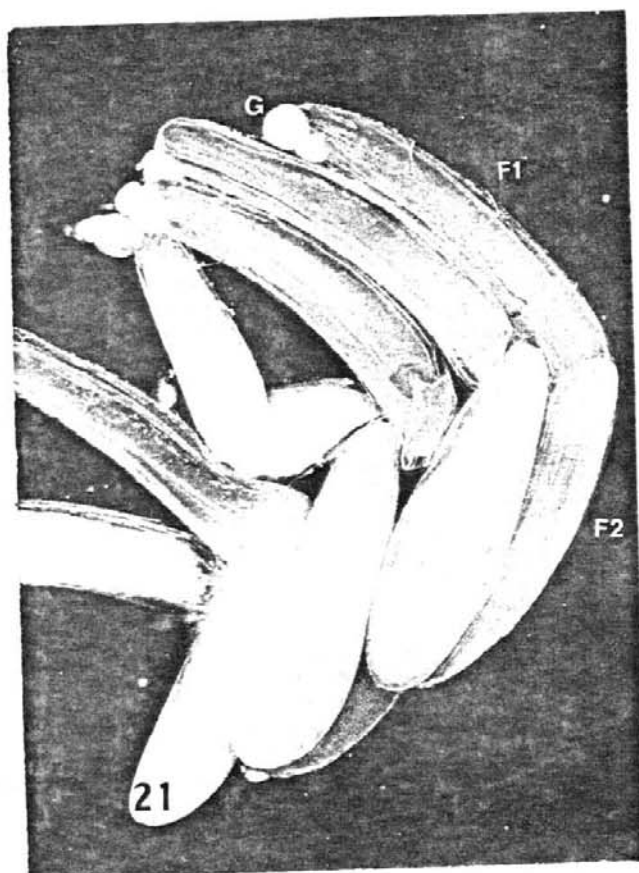
TABELA 11 - Fases de desenvolvimento dos dois primeiros folículos ovarianos de fêmeas sob dieta normal e em ausência de machos.

DIA	Nº FÊMEAS	FASE 1º FOL.	FASE 2º FOL.	Nº FOL. FASE X
9	1	VII		
	1	VII		
	3	X		
13	3	X	III	69;68
				76;71
				94;92
21	4	X	III	60;54
				44;49
				59;51
	79;73			
25	1	X	X	161;152
	2	X	IV	71;77
				64;41
	1	X	V	48;47
1	X	VI	83;86	
29	2	X	IV	65;53
				78;74
	2	X	V	60;63
				63;49
	2	X	VI	58;53
				82;84
31	2	X	III	78;81
				61;61
	2	X	IV	65;33
				59;61
1	X	VII	52;40	
34	3	X	X	148;139
				283;217
				173;153



FOTOGRAFIA Nº 20

Folículo da primeira camada (F1) em fase X e da segunda (F2) em fase VII. A fresco (X 45). Epi-iluminação



FOTOGRAFIA Nº 21

Folículos da primeira (F1) e segunda (F2) camadas e: fase X. Germário (G). A fresco (X 40). Epi-iluminação.

Na fotografia nº 20 pode-se ver a presença da primeira camada de folículos em fase X e a seguinte em VII e na fotografia nº 21 vê-se duas camadas de folículos em fase X e um terceiro lote já separado do germário.

3.9. O NÚCLEO DAS CÉLULAS TRÓFICAS

Sabemos que quando o volume de um núcleo ou célula de forma aproximadamente esférica sofre uma duplicação ocorre multiplicação da área do mesmo corpo por um fator de $\sqrt[3]{4}$ (PALKOVITS & FISCHER, 1968).

Assim, estão representadas no gráfico nº 3 as áreas das projeções dos núcleos das 4 maiores células tróficas dos folículos no decorrer das várias fases de desenvolvimento. Neste gráfico as linhas verticais separam intervalos crescentes que guardam entre si a relação de 4. Estes intervalos corresponderiam a uma relação de duplicação de volumes dos núcleos dos quais se calculou a área. Com base nos dados do primeiro intervalo de área (fase I) concluiu-se que o crescimento final das áreas corresponde a um aumento de volume de no máximo 13 vezes o inicial. Concluiu-se também que o maior número de duplicações do volume ocorreu na fase II com relação à I e na fase III com relação à II, e que o aumento máximo é atingido na fase VI, e, então, se mantém até fase VIII, com posterior declínio (fase XI).

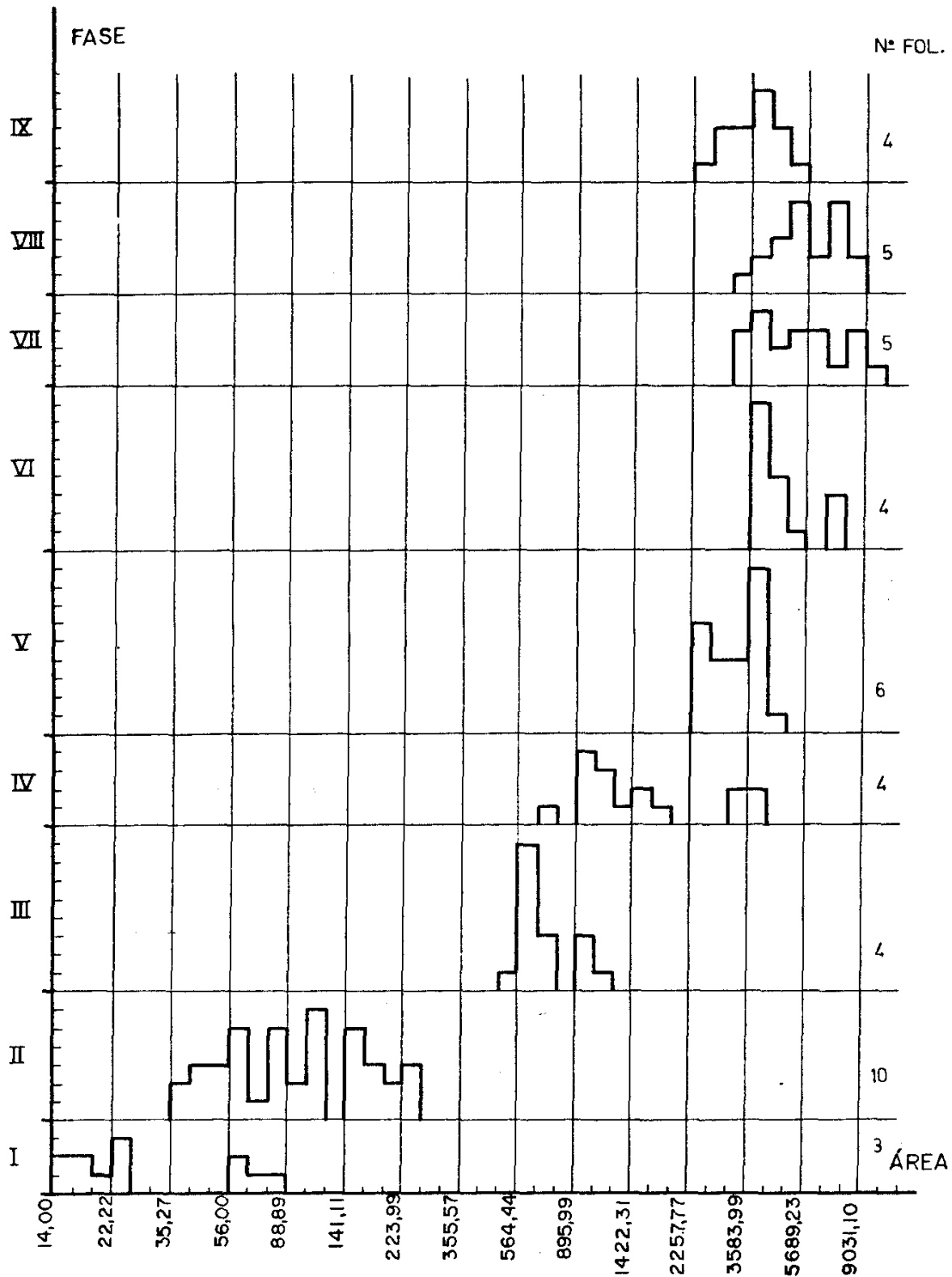
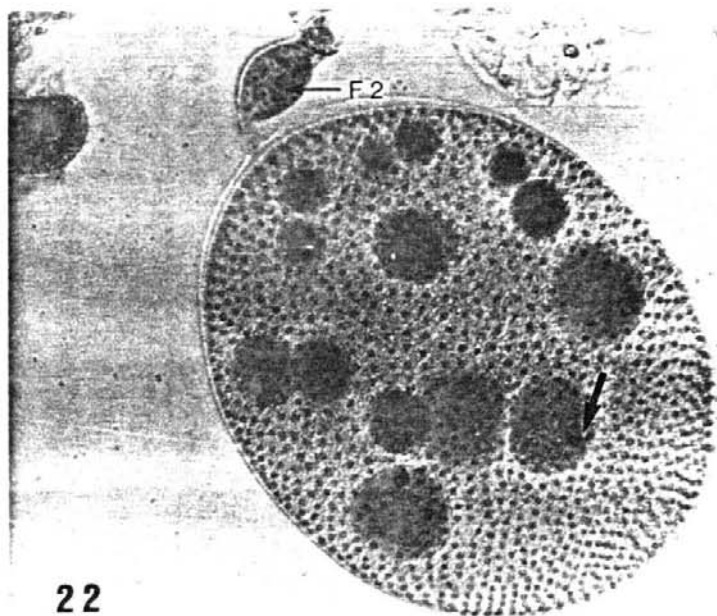


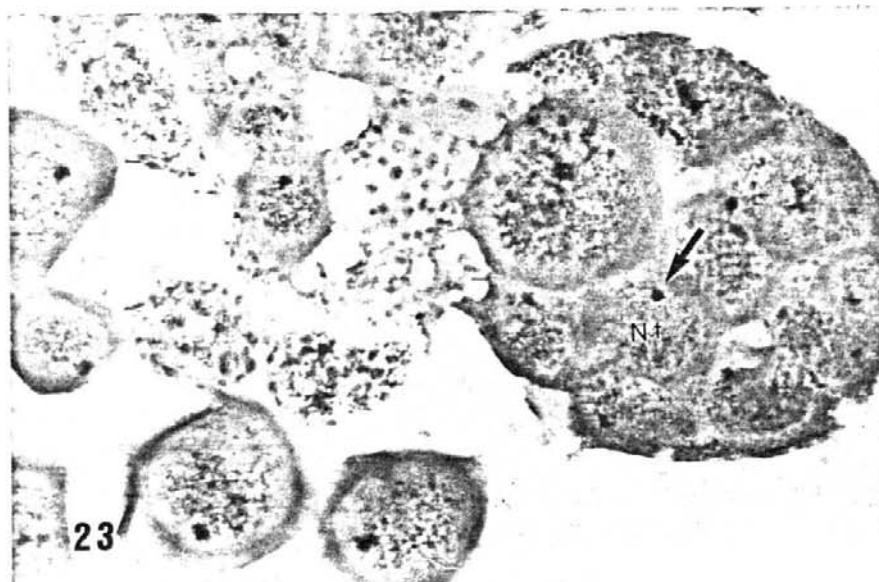
GRÁFICO Nº 3 - Áreas das projeções dos núcleos das 4 maiores células tróficas dos folículos nas diferentes fases de desenvolvimento ovariano. As linhas verticais representam as duplicações sucessivas que sofrem os volumes desses núcleos.

3.10. COLORAÇÕES ESPECIAIS PARA O CORPÚSCULO NUCLEAR DE CÉ-
LULAS TRÓFICAS

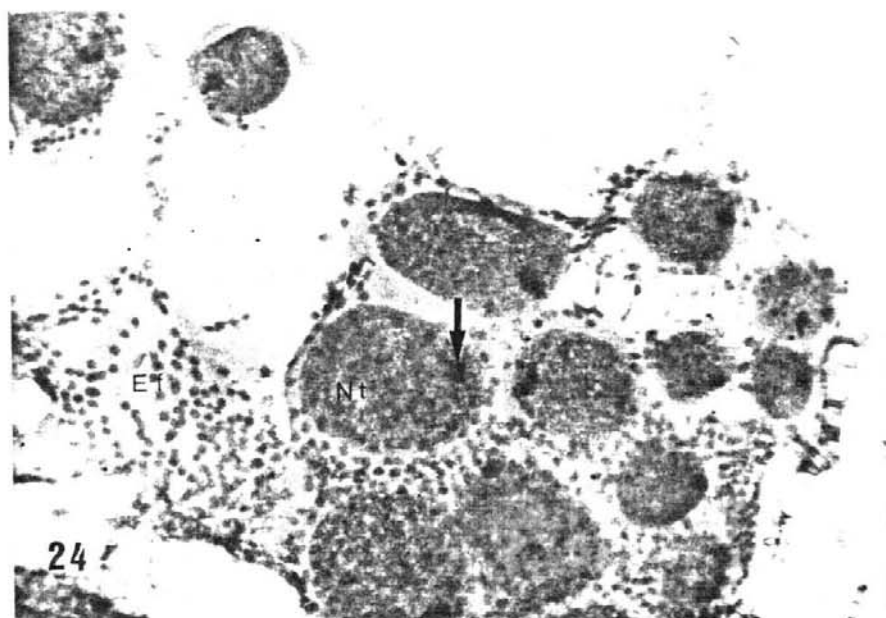
Tratamento	Resultado
Feulgen	+ (Fotografia nº 22)
Azul de Toluidina	+
RNase + Azul de Toluidina	+ (Fotografia nº 23)
Banda C	+ (Fotografia nº 24)
Alaranjado de Acridina	+ (fluorescência verde) (Fotografia nº 25)



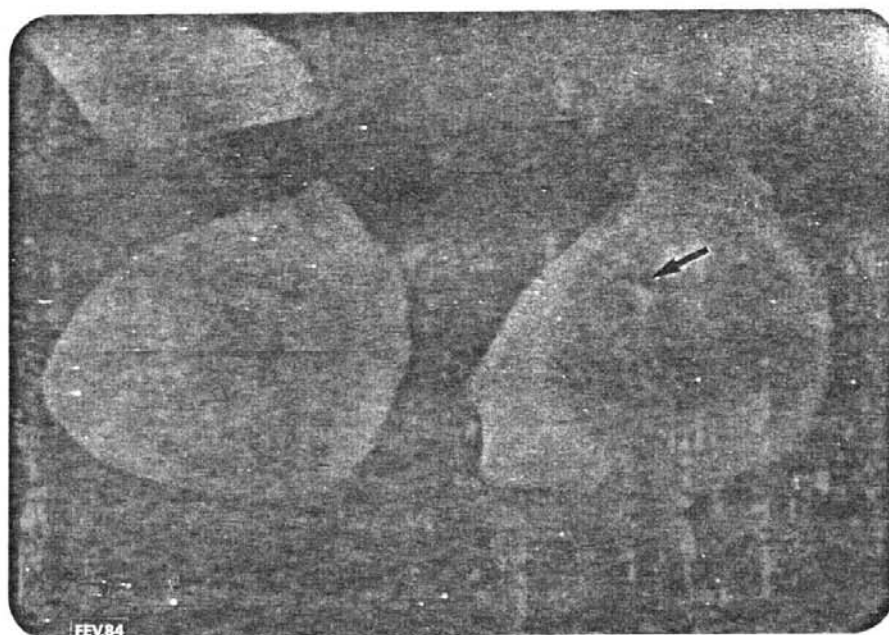
FOTOGRAFIA Nº 22- Ponto mais fortemente corado nos núcleos das células tróficas (seta). Feulgen, montagem total (X 255).



FOTOGRAFIA Nº 23- Núcleos das células tróficas (Nt) com ponto mais corado (seta). Tratamento com RNase seguido por coloração com azul de toluidina (X 225).



FOTOGRAFIA Nº 24 - Ponto mais fortemente corado nos núcleos das células tróficas (Nt) (seta). Ef: epitélio folicular destacado. Banda C (X 250).



FOTOGRAFIA Nº 25 - Ponto com fluorescência verde (seta) nos núcleos das células tróficas. Alaranjado de acridina (X 135).

DISCUSSÃO

4.1. FASES DOS FOLÍCULOS

4.2. DIMENSÃO DOS FOLÍCULOS

Embora SPRADBERRY & SANDS (1976) tenham adotado a classificação de ADAMS (1974) para subdividir a oogênese de *Chrysomya bezziana*, estes autores descreveram o folículo em fase II de desenvolvimento como já individualizado do germário, porém contando apenas com 8 cistócitos em seu interior. O número final de 16 cistócitos é atingido na fase III, decorrente provavelmente da última divisão mitótica. Nesse aspecto vemos que *Chrysomya putoria* apresenta desenvolvimento ovariano mais semelhante ao das demais espécies descritas para a família Calliphoridae: *Cochliomyia hominivorax* (ADAMS & REINECKE, 1979) e *Lucilia cuprina* (BEATTIE & CHENEY, 1979) do que ao de *Chrysomya bezziana*, que é do mesmo gênero.

Ainda nos referindo à fase II da oogênese de *C. putoria* percebemos que ocorrem semelhanças com relação ao fenômenos descritos em *Calliphora erythrocephala* onde o aspecto de politenia típica nos núcleos das células tróficas é perdido logo no início das replicações endomitóticas (de 16n para 32n ou 32n para 64n) (RIBBERT, 1979).

Imediatamente antes que se inicie o crescimento marcante do oócito de *Rhynchosciara angelae* (Basile, 1965) é que aparece a politenia típica no núcleo das células tróficas os quais finalizaram o processo de replicação do material cromatínico. Esta politenia foi interpretada pelo autor como representativa de síntese preferencial em determinados loci gênicos necessários no processo da vitelogenese. Em *C. putoria*, no entanto, a politenia aparece mes

mo em situações onde o oócito não irá se desenvolver, como acontece quando as fêmeas estão sob dieta aprroteica (ítem 4.6). Nesta espécie é a partir de fase V, quando o volume nuclear dos trofócitos praticamente atingiu o seu máximo (final das aplicações) (ítem 4.9) que o oócito começará a crescer vigorosamente. Além disto, RIBBERT (1979) mostrou, em linhagem de *Calliphora erythrocephala* selecionada para manter a politenia por toda a oogênese, que o padrão de pufes não se altera durante este processo.

Assim, mais do que a forma apresentada pelos cromossomos das células tróficas, seria o número final de cromátides atingido que precederia o crescimento marcante do oócito.

Em relação ao tamanho do folículo é interessante a ausência de referências à diminuição do volume após fase VIII, pelos autores que trabalharam com oogênese em outros dípteros (GOODMAN et alii, 1968; BEATTIE & CHENEY, 1979; TREPTE, 1981). Esta diminuição (altamente significativa) poderia ter como explicação a compactação do material interno (vitelo) aliada à substituição talvez incompleta do espaço deixado pelas células tróficas em degeneração.

4.3. DISTRIBUIÇÃO DAS FÊMEAS PELAS DIFERENTES FASES

C. putoria completa o desenvolvimento de seus primeiros folículos ovarianos com 195 horas (8 dias), em média, sob as condições descritas, embora com 128 horas já se encontrem fêmeas com folículos maduros. Deve-se lembrar que nos ciclos subsequentes, embora não estudados, este tempo deve ser menor, pois o 2º folículo está em fase III quando o 1º está completo.

Quando este tempo é comparado com o de ou-

tros insetos também com ovários meroísticos (Tabela 12), ou seja, onde existe a presença de células nutritivas, vemos que, apesar das diferentes condições experimentais, eles guardam entre si certas semelhanças.

TABELA 12

inseto	tempo-horas	autor(es)
<i>M. domestica</i>	84-96	Sakurai, 1973: Goodman et alii, 1968
<i>M. domestica</i>	145	Trepte, 1979
<i>C. hominivorax</i>	152	Adams & Reinecke, 1979
<i>C. hominivorax</i>	120-144	La Chance & Burns, 1963
<i>L. cuprina</i>	96	Beattie & Cheney, 1979
<i>C. bezziana</i>	144-168	Spradbery & Sands, 1976
<i>Lyperosia exigua</i>	144	Khurad & Thakare, 1980

Se no entanto compararmos-los com a duração da oogênese em insetos com ovários panoísticos, isto é, sem a presença de células tróficas, como por exemplo, *Gryllus domesticus*, 2400 horas, ou *Locusta migratoria*, 1000 horas (DE WILDE & DE LOOF, 1973), vemos a grande discrepância no tempo consumido.

Isto está de acordo com as teorias atuais a respeito da função das células tróficas, estas com capacidade de síntese aumentada pela poliploidia. Elas seriam as fornecedoras de RNA: ribossomais 28 S, 18 S, e 5 S, RNA de transferência (4S) e grandes quantidades de fração de pequeno peso molecular (TELFER, 1975).

Recebendo essa grande quantidade de RNA, a maquinaria para síntese proteica do oócito estaria engajada no encurtamento do tempo de vitelogênese e por consequência da embriogênese. Mesmo sabendo que a síntese da maior parte da proteína do vitelo é realizada fora do folículo e que

em alguns casos a proteína circulante na hemolinfa e a do oócito não são totalmente idênticas, o mecanismo de transformação no oócito não é mencionado (TELFER, 1975). Mas já que o que distingue os 2 tipos de ovários são as células tróficas e o principal produto dessa é RNA, a vitelogênese de alguma forma deve ser afetada por esse fluxo aumentado nos ovários meroísticos. Dessa forma, como para os demais Diptera até então estudados, podemos considerar que nosso resultado de duração da oogênese está de acordo com a teoria de ENGELS (1970) de que na evolução dos Holometabola meroísticos a eficiência no crescimento do oócito desenvolveu-se principalmente pelo aumento da capacidade de transporte do RNA.

4.4. DETERMINAÇÃO DA IDADE CRONOLÓGICA ATRAVÉS DA FASE DE DESENVOLVIMENTO OVARIANO

Vimos pelos dados apresentados na tabela nº 6 e complementados pela figura nº 3 que existem sobreposições nos intervalos de idade prováveis de algumas fases.

Muito embora não descrita por outros autores (ADAMS & REINECKE (1979) para *Cochliomyia hominivorax*; BEATTIE & CHENEY (1979) para *Lucilia cuprina*) a sobreposição parcial era um fato esperado por tratar-se de um fenômeno contínuo, que na realidade não apresenta limites estanques, mas que é artificialmente devidido em fases. Assim surgem folículos durante o experimento que não podem mais ser considerados como estando em fase VI, por exemplo, mas que por outro lado ainda não apresentam características muito típicas de fase VII. Neste caso a classificação é decidida pelo conjunto de características que torna os folículos mais próximos de uma ou de outra fase. Quando este fe-

nômeno é analisado na população, uma amostra pode conter, como no exemplo, fêmeas mais próximas de fase VI enquanto outras mais próximas de VII, sendo a proporção entre elas as mais variadas.

Como resultado dessas interpretações e também de variações individuais, surgem as distribuições de fases com algumas sobreposições de horários. Essas, facilmente identificáveis na figura nº 2 ocorrendo principalmente até fase V, seriam esperadas entre fases vizinhas. No entanto, casos como o da fase IX, onde a amplitude do horário em que ocorreram foi muito grande, nos remetem a um outro tipo de discussão.

Como sabemos, tanto por relatos de outros autores (ENGELMANN, 1968) como por nossas próprias observações, o desenvolvimento ovariano é afetado por vários fatores ambientais. Foram tomadas precauções para que aqueles mais óbvios não interferissem negativamente no experimento. Assim, havia poucas larvas por vidro de criação, para que sobrasse alimento; as fêmeas amostradas, apesar de não mensuradas sob qualquer aspecto, não apresentavam variações evidentes de tamanho; o alimento (fígado) era colocado na gaiola tempo suficiente para que muitas moscas já o tivessem até abandonado, saciadas que estavam.

Consideramos, então, que condições equivalentes de desenvolvimento foram oferecidas a todas as fêmeas. Vimos, inclusive, que o tempo total do experimento (235 horas) foi suficiente para que algumas fêmeas completassem o desenvolvimento da primeira camada e apresentassem vitelogênese adiantada na segunda camada, ao mesmo tempo em que outras mal iniciavam a primeira vitelogênese. Logo, a variação temporal na maturação ovariana apresentada pela po

pulação, supomos que seja devida a fatores intrínsecos a ela. O fato da variação não constituir-se um erro experimental foi até certo ponto confirmado por Dr. B.R. LAURENCE numa comunicação pessoal, quando nos informou que os seus dados para *C. putoria*, na Tanzânia, apresentavam o mesmo tipo de distribuição. Existe a possibilidade que nossas condições experimentais tenham tido falhas nos mesmos pontos que as dele, no entanto, é uma indicação de que o fato existe em diferentes populações, submetidas a condições distintas, já que a dieta utilizada por ele difere da nossa.

Atualmente se sabe que o controle da vitelogenese nos insetos é exercido conjuntamente pelo hormônio do corpora alata e pelo hormônio cerebral (ENGELMANN, 1970). Sabe-se ainda que os anautógenos são regulados também pela ingestão de proteínas (ENGELMANN, 1970; APPLIN, 1979). Os estímulos desencadeadores do processo, como agem os dois hormônios, qual é ativado em primeiro lugar, são ainda motivo de muita controvérsia. Desde que os insetos estudados diferem grandemente na sua biologia e fisiologia reprodutiva, mesmo que para algumas espécies as hipóteses estejam mais claramente demonstradas, comparações e analogias podem ser infundadas. Diante disto preferimos nos limitar a fatos mais gerais para hipótese de trabalho, ou seja, os dois hormônios e a dieta.

Supomos que algumas fêmeas da população amostrada necessitem uma quantidade grande de alimento para que iniciem sua vitelogenese, alimento este que poderá agir a nível de estímulo para as glândulas e/ou como substrato para síntese de vitelo proteico pelos corpos gordurosos. Para outras fêmeas essa síntese pode ser iniciada com menores quantidades de alimento. A variação também pode ocorrer na

fase larval, com algumas sendo capazes de armazenar mais reservas e, às custas dessas, iniciar precocemente a deposição do vitelo. Outras, por alguma característica metabólica, não armazenam substâncias, o que faz com que a vitelogenese seja iniciada só a expensas da dieta do adulto.

Com essas suposições estamos admitindo que a variação ocorrida não é só explicada por fatores ambientais mas sim também por diferenças intrínsecas, possivelmente genéticas, entre as fêmeas da população amostrada. Assim a população estudada não é homogênea em relação à vitelogenese, apresentando em alguns momentos, uma divisão em grupos; como por exemplo, quando fazemos uma observação na figura nº 2 entre 120 e 130 horas, revelando basicamente 2 estados: um de início de vitelogenese (IV, V, VI) e outro de vitelogenese adiantada (VI, VIII e IX).

Nas fases vitelogênicas, portanto, a correlação não é tão exata, apenas nos indicando a faixa etária possível daquelas fêmeas. É assim que ao encontrar-se uma fêmea em fase VII ou VIII, não constitui um grande êxito fazer-se a separação em uma ou outra fase já que o intervalo de idade possível da fêmea seria muito semelhante para uma ou outra, ou seja de 131 a 162 horas (tabela nº 6). O mesmo seria válido para as fases V e VI já que encontrando fêmeas numa dessas fases a idade provável da mesma seria praticamente igual ou seja, entre 100 horas e 124.

Como foi apresentado, o teste t para fase V e VI nos mostrou que não se tratam de duas fases distintas. Como as características de fase V apareciam no desenrolar das observações julgávamos de relevância separar V e VI como eventos fisiológicos distintos, detectáveis em diferentes períodos. Com esta particularização estávamos introdu-

zindo uma fase intermediária que a classificação de ADAMS & MULLA (1967) não considerava. Os resultados da tabela nº 6, no entanto, nos mostram ser desnecessária essa subdivisão já que as duas fases temporalmente se sobrepõem. A introdução de V serviu-nos, porém, para detalhar a maneira que ocorre a distribuição do vitelo, partindo do folículo em fase IV, com poucos grânulos ao redor do oócito, até chegar a VI com 1/3 de deposição, já sem a forma basal convexa do vitelo característica de V (fotografia nº 10º). O preenchimento de todo o terço basal do folículo, desfazendo a imagem de U invertido típica de fase V deve ocorrer rapidamente, haja visto o pequeno número de folículos encontrados - (16) quando comparado com fase IV e VI.

Assim para a finalidade de correlacionar idades, a divisão em tal número de fases, principalmente nas vitelogênicas, talvez não seja necessária, já que nos acrescentam muito pouca informação quanto à precisão do horário. Um número menor de fases vitelogênicas seria mais acertado para este fim.

Em condições naturais não há dúvida de que o intervalo de duração da oogênese será alterado, na dependência da quantidade e qualidade da alimentação disponível, tanto para as larvas quanto para as fêmeas adultas, da temperatura ambiente, da densidade a que as larvas ficaram submetidas e de outros fatores ambientais. No entanto, as condições de laboratório foram as mais próximas das ideais, oferecendo os itens explicitados acima de maneira que o desenvolvimento se completasse no tempo mínimo viável. Acreditamos com isto que dificilmente estaremos superestimando a idade de uma fêmea, pois um tempo muito inferior ao obtido para cada fase seria bastante improvável ocorrer.

Determinamos, então, através do conhecimen-

to do desenvolvimento ovariano qual a idade mínima que uma fêmea nulípara teria. A idade máxima seria estimada através de estudos mais complexos.

4.5. O NÚMERO DE FOLÍCULOS DE *C. putoria*

O fato do número total de folículos maduros ser variável de uma mosca para outra deve-se a vários fatores. As pequenas diferenças devem-se a erros de contagens, por exemplo, ou mesmo a variações individuais. As grandes discrepâncias, porém, não são explicadas por erros metodológicos e sim por diferenças mais nítidas entre os indivíduos, as quais apareceram mais após 177 horas. Como percebemos no gráfico, há uma nítida diminuição no número de folículos após este horário, caracterizando a presença de dois grupos. As que completam mais rapidamente a vitelogênese, o fazem em maior número de folículos que as que alcançam mais tardiamente. Não sabemos se estas últimas sofrerem o processo de reabsorção descrito por BARTON-BROWNE et alii (1979) para *L. cuprina*, por TREPTE e TREPTE-FEUERBORN (1980) para *M. domestica* e SPRADBERRY & SCHWEIZER (1981) para *C. bezziana*, ou se originalmente já não teriam potencial para desenvolver um número tão alto de folículos quanto os do primeiro grupo. Parece que é um fenômeno raro o amadurecimento completo de todos os folículos (TREPTE & TREPTE-FEUERBORN, 1980; SPRADBERRY & SCHWEIZER, 1981) e a porcentagem de reabsorção é variável em função da idade da fêmea e da fase da oogênese em que ela se encontra (TREPTE & TREPTE-FEUERBORN, 1980) podendo ir de 5% até excepcionalmente 100% de reabsorção.

A atresia, ainda não completamente explicável, é controlada por interação de hormônios e fatores nu-

tricionais sendo que o hormônio juvenil é de grande significância (BELL & BOHM, 1975).

Dois fatores poderiam estar explicando os 2 grupos do gráfico nº 2; diferenças genéticas que caracterizariam potenciais diferentes de maturação de ovos e/ou decorrências fisiológicas de condições não muito favoráveis levando à reabsorção de maior número de folículos em um grupo (horário) que em outro.

Sincronia ovariana e oviposição em massa seriam explicadas pelo hábito gregário das larvas, já que um grande número delas estaria menos exposto à dessecação. Segundo TREPTE & TREPTE-FEUEBORN (1980) e SPRADBERRY & SCHWEIZER (1981), os folículos não são mais reabsorvidos após estarem maduros; assim, supondo que um número tão pequeno como 42 (x2) seja oviposto, significaria que a quantidade de larvas resultantes seria suficiente para que a sobrevivência das mesmas não fosse comprometida. Talvez um número menor do que este já comprometesse a sobrevivência do grupo, o que poderia explicar o fato de não se ter encontrado fêmeas com número menor de folículos. Se houve reabsorção, então este foi o nível máximo atingido. Existe potencial para que sejam postos até cerca de 200 ovos por fêmea, contando com o amadurecimento de um só ciclo de folículos.

Como as contagens dos folículos foram feitas antes da oviposição não podemos afirmar que todos sejam ovipostos, já que não foi estudada retenção de ovos nesta espécie.

4.6. TESTE DE DESENVOLVIMENTO COM DIETA APROTEICA

A linhagem utilizada de *C. putoria* não manifestou-se autógena, empregando aqui a definição dada por

BAXTER et alii (1973): "a habilidade de um inseto adulto recebendo nada mais do que uma dieta de manutenção produzir ovos através da mobilização de recursos". Inicialmente este termo, cunhado por ROUBAUD (1929) foi aplicado com sentido restrito à produção de ovos por mosquitos que não tinham se alimentado com sangue. No decorrer do tempo, autogenia adquiriu uma variedade de conotações para descrever a relação entre maturação de ovos de insetos e nutrição, e foi SPIELMAN (1971) quem ampliou o termo para incluir espécies **não** hematófagas.

Embora existam insetos que possam mobilizar reservas de outros tecidos (BAXTER et alii, 1973), a maioria deles obtém reservas de tecidos armazenados durante alimentação larval. Portanto, o desenvolvimento autógeno pode ser reduzido ou mesmo impedido em adultos derivados de larvas mal nutridas. Acreditamos que a maneira através da qual as larvas de *C. putoria* foram criadas, com abundância de meio nos vidros, não afetou a expressão de sua autogenia no que se refere à quantidade de alimento disponível. Sabe-se também que a qualidade da dieta afeta essa expressão em alguns dípteros hematófagos (BAXTER et alii, 1973). No nosso caso não foram feitos testes nutricionais qualitativos no estudo da ovogênese, já que o meio larval utilizado foi o mesmo em todos os experimentos.

No trabalho de LEAL et alii (1982) quando esse meio é comparado à carcaça, vê-se que o peso máximo atingido pelas larvas com essa dieta é de 53 mg contra 61,5 mg da carcaça e o tempo total gasto para o desenvolvimento foi de 78 horas contra 63 horas na carcaça.

Em relação à qualidade da dieta larval podemos considerar que muitas espécies de Calliphoridae e Sarco

phágidae mostram uma migração larval precoce quando a quantidade do meio é limitada ou sua qualidade baixa (KAMAL, 1958). Se tomarmos essa migração precoce como uma medida da qualidade do meio percebemos que no trabalho de LEAL et alii (1982) ela não ocorreu, já que o peso máximo de 53 mg foi atingido após um intervalo de tempo maior que aquele gasto pelas larvas que se alimentaram em carcaça. Assim, mesmo que o peso final atingido seja menor no meio de cultura utilizado, a sua qualidade não é tão inferior a ponto de desencadear uma pupariação precoce.

Existe, no entanto, a possibilidade que com carcaça ou com outra dieta qualquer suplementada se demonstre a expressão da autogenia nesta ou em outra linhagem de *C. putoria*.

Conhecem-se trabalhos onde com uma dieta suplementada foi possível aumentar a autogenia de 2% para 61% em *M. domestica* (ROBBINS & SHORTINO, 1962). No entanto a mesma dieta aplicada a outra linhagem não levou à autogenia (BAXTER et alii, 1973). Assim percebemos que além das condições ambientais influenciando na expressão da autogenia existe também variação genética dentro da mesma espécie, tornando possível, inclusive, distinguir linhagens pela sua habilidade em iniciar deposição de vitelo sem dieta adequada como o fez LAURENCE (1964) para *Aedes togoi*.

A manifestação de anautogenia não foi influenciada pela presença de machos já que nas duas gaiolas, com fêmeas somente e na que contava com machos e fêmeas, o fenômeno observado foi o mesmo. Essa influência refere-se à fertilização em si ou mesmo ao contato já que influências de outro tipo, como feromônio, por exemplo, se ocorrem, podem continuar existindo pois na câmara de criação os machos es-

tão presentes nas demais gaiolas.

Quando consideramos a existência de anautogenia nas populações naturais de *C. putoria* podemos supor que se não houver proteína disponível em quantidade suficiente a composição das populações sofrerá alterações, fato elementar que deve ser considerado num programa de controle dessa espécie.

É também importante saber-se que a dieta influencia o desenvolvimento ovariano de uma espécie para que se façam as devidas restrições à datação de uma população baseada em características ovarianas. Quando essa característica da espécie é ignorada, ao analisar-se uma fêmea, através do desenvolvimento de seus ovários, pode-se estar considerando-a mais jovem do que na realidade ela é, já que uma dieta insuficiente pode levar a um atraso no desenvolvimento dos folículos ovarianos. Esse fato reforça o que foi salientado no ítem 4.4. de que pelo desenvolvimento ovariano podemos saber a idade cronológica mínima de uma fêmea e não a idade máxima.

4.7. TESTE DE DESENVOLVIMENTO COM DIETA APROTEICA SEGUIDA POR DIETA NORMAL

Ao contrário do que poderia ser pensado, um período prolongado sem dieta proteica, e conseqüentemente, sem vitelogênese nos folículos ovarianos (ítem 4.6.), não torna esse fenômeno irreversível. Como se viu, mesmo após 47 dias de carência nutricional as fêmeas foram capazes de produzir ovos viáveis quando suplementadas com proteína. Esse período (47 dias) representa 50% da vida média das fêmeas dessa espécie (MONTEIRO F., comunicação pessoal).

Pelo que se sabe de outras espécies, corpo-

ra alata e células neurosecretoras medianas são tecidos essenciais para desenvolvimento de ovos maduros em diversas espécies de Diptera (APPLIN, 1981). Segundo explicações de diferentes grupos de endocrinologistas de insetos, a proteína atua estimulando a secreção de hormônio nesses dois locais (PAPPAS & FRAENKEL, 1978; APPLIN, 1979). Sem a ingestão de proteína, pelo menos as células medianas neurosecretoras tornam-se quiescentes em *Lucilia sericata* segundo relata APPLIN (1979).

Supondo-se que processo semelhante ocorra em *C. putoria*, a quiescência poderia ser quebrada a qualquer momento pela ingestão de dieta adequada.

Parece que a estratégia reprodutiva da espécie é de só produzir ovos quando existirem condições mínimas de sobrevivência para as futuras larvas; assim sem proteína não há ovos e, portanto, larvas.

Em termos epidemiológicos a quebra da provável quiescência é um fator determinante já que, mesmo que matéria orgânica (carcaças, lixões) não esteja disponível durante um longo período, a qualquer momento que ela volte a existir, o potencial reprodutivo da população é restabelecido.

4.8. TESTE PARA VERIFICAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO 2º FOLÍCULO EM PRESENÇA DO 1º.

Ao contrário de outras espécies já estudadas da família Calliphoridae, em *Chrysomya putoria* ocorre diferenciação do 3º folículo ovariano, com total separação do germário, quando o 1º folículo, totalmente desenvolvido, ainda está presente no ovário.

Segundo ADAMS & REINECKE (1979) em *Cochlio-myia hominivorax* o 3º folículo não deixa o germário até que o 1º tenha sido oviposto, assim como o 2º ciclo de folículos não se desenvolve além de fase 5 (dele) nesta situação.

Para *Lucilia cuprina* as opiniões são contraditórias já que CLIFT (1972) citado em BEATTIE & CHENEY (1979), afirma que em determinadas condições pode ocorrer desenvolvimento total do penúltimo folículo, mesmo em presença de folículos terminais maduros. Já VOGT et alii (1974) dizem que o desenvolvimento do 2º e subseqüentes folículos é inibido em presença de folículos maduros.

Em outros dipteros muscóideos como os estudados por PAPPAS & FRAENKEL (1978), *Phormia regina* e *Sarcophaga bullata* a exemplo do demonstrado por ADAMS et alii (1968) para *M. domestica*, a presença do 1º folículo em vitelogênese inibe o desenvolvimento do penúltimo. A explicação é dada pelo hormônio oostático produzido pelo último folículo cuja ação contraria a do hormônio juvenil do corpora alata, esse necessário ao desenvolvimento dos folículos (ADAMS et alii, 1968). Isto foi concluído pelos autores acima quando aplicaram análogos do Hormônio juvenil e conseguiram desenvolvimento dos penúltimos folículos.

No caso de *C. putoria* mesmo que esse hormônio exista ele só age em determinadas situações já que a abundância de alimento proteico provavelmente anula a ação do hormônio oostático em favor do hormônio juvenil (CLIFT, 1971).

No nosso experimento ocorreu desenvolvimento completo de pelo menos mais um lote de folículos, apesar de ser em condições experimentais. É importante salientar que

o aparecimento do 2º lote vitelogênico pode ocorrer em um intervalo de tempo menor, o que foi constatado num experimento preliminar onde com 17 dias duas fêmeas apresentavam 502 e 375 folículos respectivamente. Provavelmente as condições, principalmente as alimentares, não se repetiram; no entanto, achamos relevante relatar que o fenômeno pode existir.

Quando *C. putoria* é comparada a outras espécies nas quais não ocorre o fato demonstrado pelo nosso experimento vemos que torna-se epidemiologicamente significativo, já que as demais não multiplicam seu potencial reprodutivo sem estarem fertilizadas ou em ausência de local adequado para ovipor. Para *C. putoria* existe a possibilidade de dobrar o número de ovos a serem postos quando do encontro das condições adequadas para ovipor.

4.9. O NÚCLEO DAS CÉLULAS TRÓFICAS

Como já foi dito (item 4.1., 4.2. e 4.3) uma função importante das células tróficas é suplementar as funções sintéticas do núcleo do oócito produzindo RNA para armazenamento no ovo (TELFER, 1975). Replicações endomitóticas, levando a altos graus de poliploidia e, conseqüentemente, aumento do DNA disponível, aumentam a capacidade das células tróficas de desempenhar esta função (TELFER, 1975).

No trabalho de JACOB & SIRLIN (1959), em *Drosophila*, foi feita estimativa da quantidade de DNA através de métodos auto-radiográficos e dentro deste estudo, contagens de grãos e cálculos de "volume de DNA" nas secções levaram a diferentes conclusões sobre a ploidia final. Os autores salientam que existe uma boa correlação entre os dois métodos até fase 9 (classificação de KING, et alii (1956)) e que a-

pós esta, o cálculo através do "volume de DNA" leva a superestimativas da ploidia.

Por outro lado, num trabalho sobre órgãos larvais de *Apis mellifera*, MELLO & TAKAHASHI (1969) mostram que o aumento no volume nuclear não acompanha em mesma proporção o aumento na quantidade de DNA, excedendo-o.

Alguns autores estudando células tróficas de dípteros chegaram a estabelecer um número de duplicações para volumes nucleares ao redor de 8, com *Drosophila* (PAINTER & REINDORP, 1939) citado em JACOB & SIRLIN (1959), o que foi reafirmado por JACOB & SIRLIN (1959). Assim, não é descartada a possibilidade de que o aumento das áreas indicando 13 duplicações de volume nuclear para *C. putoria* seja um dos casos onde o conteúdo de DNA não acompanhe este aumento. Pouco podemos afirmar sobre a ploidia final das células tróficas, além de que elas atingiriam no máximo 13 vezes a inicial.

Assim como existem variações nas dimensões dos folículos estas ocorrem também nas áreas dos núcleos o que faz com que exista mais de uma classe de áreas em determinadas fases do desenvolvimento. A discussão do fato envolve também, o mesmo tipo de explicação apresentada para a dificuldade da classificação em fases em transição. Isto é bem ilustrado nos casos das fases I e IV. Nestas fases o grupo de 4 núcleos que se destacam das classes principais provavelmente deveriam estar colocados, respectivamente, em II e V. No entanto, no exame a fresco, as características utilizadas para decidir em que fase se classificariam devem ter dado maior peso àquelas em que foram colocados. Pela distribuição das áreas, vemos, entretanto, que eles estariam muito bem representando as respectivas fases sucessivas. Mesmo que

IV e V não sirvam como fases referíveis à idade cronológica, vimos por mais esse dado, áreas nucleares, que são fases morfológica e fisiologicamente distintas.

As fases VI, VII e VIII possuem áreas distribuídas em duas classes principais, contando, portanto, com alguns núcleos da amostra com o dobro de volume dos seus demais.

Como já mencionamos no item 3.1.2. o núcleo das células tróficas do folículo em fase II apresenta diferentes estados cromatínicos. Com esses dados, a respeito da variação dos volumes nucleares, percebemos que a multiplicidade volumétrica apresentada pela fase II seria corroboradora da diversidade de imagens visualizadas num exame citológico. Núcleos com cromossomos politênicos típicos não puderam ser representados por esta técnica, já que a delimitação do espaço nuclear total fica dificultada pela agregação do material cromatínico em unidades bem individualizadas. No entanto, foram considerados núcleos do mesmo folículo onde alguns dos 15 núcleos dos trofócitos apresentavam cromossomos politênicos. Assim, estes núcleos representam estados imediatamente anteriores ou posteriores ao estado de politenia típica, que dessa maneira estão incluídos nas diferentes classes referentes à fase II. Outra parte dos volumes nucleares corresponde aos que apresentam pequenas e múltiplas condensações, antes de ocorrer uma maior pulverização do material cromatínico, que foram interpretados como início de um processo de poliploidização.

De acordo com o que vimos no item 3.2. os folículos sofrem uma redução no volume total após a fase VIII. Coincidentemente com este processo existe o surgimento da membrana vitelínica entre as células foliculares e o ooplas-

ma e entre este e a câmara trófica. Assim, supomos que, após a formação dessa membrana, a incorporação de substâncias no ooplasma seja praticamente inexistente. Daí inferimos que a quantidade de vitelo acumulada até esta fase seja praticamente a mesma existente no folículo maduro (fase X). Portanto, as células tróficas já sem função iniciariam seu processo de degeneração, explicando a diminuição do volume nuclear. Com o desaparecimento dessas 15 células o volume do folículo total também se reduziria, já que não seria substituído por igual quantidade de vitelo.

4.10. COLORAÇÕES ESPECIAIS PARA O CORPÚSCULO NUCLEAR DE CÉLULAS TRÓFICAS

O grande corpúsculo nuclear presente nas células tróficas que aparecia intensamente corado em vermelho nas lâminas submetidas à reação de Feulgen nos deixou intrigados sobre a sua natureza. Mesmo que a sua unicidade e fácil delimitação morfológica pudessem sugerir tratar-se de nucléolo, sabemos que este possui grande quantidade de proteína, pouco RNA e raramente DNA (extracromossômico) (MELLO, 1984). Embora as purinas do RNA sejam também removidas pela hidrólise ácida do método de Feulgen, sabe-se que apenas as desoxirriboses se comportam como verdadeiros aldeídos, dando reação positiva (MELLO & VIDAL, 1978). Proteínas também não se coram pela reação de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1978). Assim estávamos diante de um corpúsculo contendo DNA, possivelmente cromatínico.

A basofilia nuclear detectada com soluções de azul de toluidina a pH 4,0 e 3,4 admite-se que seja devi-

da à presença de ácidos nucléicos (LISON, 1960). O pré-tratamento com RNase em algumas lâminas mantendo os corpúsculos intensamente corados pelo azul de toluidina nos reforçou a indicação dos mesmos conterem DNA.

Por outro lado o resultado da fluorescência-verde após coloração com alaranjado de acridina excluiu realmente a possibilidade de tratar-se de RNA. Além disso, estruturas alongadas, exibindo fluorescência vermelho-alaranjada quando da coloração com o alaranjado de acridina, nos mesmos núcleos, são altamente sugestivas de se tratarem de corpos nucleolares.

A coloração pelo Giemsa após o método da banda C (SUMNER, 1972), tornando mais corada a região desse corpúsculo nuclear nos levou a concluir tratar-se de um corpo cromatínico, muito possivelmente heterocromático.

Essas colorações foram testes simples, porém de alta confiabilidade, que nos deram indicação da natureza provável desses corpúsculos das células tróficas fazendo com que não fossem erroneamente interpretados como nucléolos, iniciativa tentadora quando os observamos nas primeiras preparações.

ADAMS & REINECKE (1979) e BEATTIE & CHENEY (1979) não se referiram a esta estrutura quando, utilizando a reação de Feulgen, trabalharam com *Cochliomyia hominivorax* e *Lucilia cuprina*, respectivamente.

Esse corpúsculo, que aparece após a fase III e é visível até à fase VIII da oogênese de *C. putoria* merecerá no futuro estudos mais aprofundados que possam nos reforçar essa suposição e provavelmente indicar algo sobre sua função dentro das células tróficas, e, por conseguinte, da própria oogênese.

4.11 SOBRE A PROVENIÊNCIA DE *Chrysomya putoria*

O primeiro trabalho que se referiu à proveniência do gênero *Chrysomya* que então havia sido registrado no Brasil, foi o de GUIMARÃES et alii (1979). Nele os autores mencionam a intensificação dos intercâmbios comerciais entre países e, conseqüente aumento de viagens transoceânicas, como fatos representativos da introdução de insetos exógenos nos continentes. No caso específico de *C. putoria* (então referida como *C. chloropyga*), a chegada da África teria sido possibilitada pelos refugiados angolanos que aportavam frequentemente nesta época (1975/1976) à costa sul do Brasil, com carregamentos inclusive de animais domésticos. Assim, segundo a hipótese dos autores, *C. putoria* teria vindo da costa ocidental africana, muito possivelmente de Angola.

Esta suposição teórica foi reafirmada por AZEREDO -ESPIN & PAVAN (1983) quando, baseados em estudos morfológicos dos cromossomos da espécie, concluíram tratar-se de *C. chloropyga*, com provável local de origem da África oeste, pois os cariótipos encontrados pelos autores se assemelhariam aos descritos de material proveniente daquela região. No entanto, os cariótipos africanos comparados referem-se a material da África do Sul e Etiópia (BOYES & SHEWELL, 1975; ULLERICH, 1976) localizados respectivamente, no sul da África e na África oriental, o que a nosso ver em nada corrobora a hipótese de origem a partir da África ocidental.

Baseando-nos no estudo que realizamos sobre o desenvolvimento ovariano da espécie no Brasil, aliado ao que se sabe sobre o assunto na espécie africana, fazemos uma outra suposição a respeito da região de origem de *C. putoria*.

O padrão de desenvolvimento ovariano apresentado por *C. putoria*, e discutido no presente trabalho, provocou grande surpresa ao Dr. B. R. LAURENCE, quando aqui esteve, por ser muito semelhante ao que ele encontrava para uma linhagem dessa espécie proveniente da Tanzânia (África oriental). Além dessa linhagem ele mantém uma outra, proveniente da África ocidental (Libéria), que apresenta desenvolvimento ovariano diferente do encontrado por ele para a linhagem da Tanzânia, e por mim, para a do Brasil. As duas linhagens africanas não produzem cruzamento fértil. A linhagem do Brasil, no entanto, quando cruzada com a linhagem da Tanzânia produziu F1 fértil, e, na ocasião da redação desse trabalho encontrava-se em F2 (comunicação por carta do Dr. B. R. LAURENCE).

Primeiramente podemos supor que na África o desenvolvimento ovariano dessa espécie apresente uma distribuição clinal ao longo do continente, no sentido leste-oeste, e que as duas linhagens sejam os extremos desse cline, não intercruzáveis. Considerando-se também que o potencial genético da espécie poderia ter-se mantido íntegro em qualquer desses pontos, podemos pensar, (ainda a favor da hipótese de origem a partir da África Ocidental), que as condições ambientais no Brasil tenham favorecido um padrão de desenvolvimento ovariano semelhante ao apresentado pela espécie na costa oriental africana, muito embora fossem provenientes do extremo oposto do suposto cline. Por outro lado não podemos deixar de considerar a hipótese mais fundamentada pelos fatos disponíveis: a de que *C. putoria* existente no Brasil tenha vindo da região oriental da África.

Até o momento algumas das informações necessárias à elaboração de uma hipótese profundamente alicerça-

da não estão disponíveis, e, com as que dispomos, podemos afirmar, baseando-nos no padrão de desenvolvimento ovariano, que *C. putoria* existente no Brasil é semelhante à da Tanzânia (África oriental) e que as duas são intercruzáveis. Acreditamos que este assunto deverá se expandir nos próximos anos adquirindo novos contornos e proporcionando maiores esclarecimentos para este início de polêmica. Mesmo que a origem a partir da África oriental seja futuramente contestada, julgamos de grande relevância o fato de que a comparação de um padrão de desenvolvimento, baseado em aspectos morfológicos do ovário, forneceu fortes indícios da semelhança entre duas linhagens, que experimentos clássicos de cruzamento (macho x fêmea e fêmea x macho) vieram somente confirmar.

Reafirmamos, então, a importância de estudos básicos da biologia das espécies, que acreditamos colaborar, inclusive, para esclarecimentos sobre locais de origem e rotas de dispersão das mesmas.

V. CONCLUSÕES

1. *Chrysomya putoria* apresenta uma média de 76 (\pm 11,8) folículos por ovário. Os ovários são do tipo meroístico politrófico, contando com 15 células tróficas em cada folículo.
2. A $22^\circ \pm 2^\circ$ C e 56% UR, com dieta proteica adequada *Chrysomya putoria* completa seu primeiro ciclo ovariano em 8 dias, no máximo, processo rápido, como nos demais insetos com ovários meroísticos.
3. Dentro da população amostrada existem variações no tempo gasto pelas fêmeas para iniciar a vitelogênese nos folículos.
4. O desenvolvimento dos folículos é sincrônico e a deposição dos ovos é realizada em massa, o que poderia estar relacionado ao hábito gregário das larvas.
5. *C. putoria* é anautógena já que em ausência de dieta proteica não há vitelogênese nos seus folículos ovarianos. A estrutura das populações naturais poderá sofrer alterações se ocorrer este tipo de deficiência nutricional.
6. O potencial reprodutivo da espécie é mantido mesmo após um período longo sem dieta adequada, o que torna possível o recrudescimento da população quando da volta a condições favoráveis de alimentação.

7. *C. putoria* demonstrou desenvolvimento completo da segunda camada de folículos mesmo sem ter ocorrido a oviposição dos primeiros. A possibilidade de multiplicar o número de folículos maduros deve ser devidamente considerada em estudos da dinâmica populacional desta espécie.
8. Se a ploidia dos núcleos das células tróficas acompanhar o aumento de volume dos mesmos, então, no momento de maior tamanho dos núcleos, ela seria 13 vezes maior que a ploidia existente nestes na fase I de desenvolvimento.
9. Os núcleos das células tróficas dos folículos ovarianos de *C. putoria* apresentam, a partir da fase III, corpúsculo de DNA bastante evidente até à fase VIII de desenvolvimento ovariano.
10. Através do conhecimento do desenvolvimento ovariano de uma fêmea nulípara pode-se determinar a idade cronológica mínima da mesma.
11. A subdivisão do desenvolvimento ovariano em 10 fases adotada neste trabalho, mostrou-se muito detalhada para a finalidade de datação. No entanto, é de grande utilidade quando se estudam particularidades dos fenômenos do desenvolvimento, sendo que em estudos futuros com este enfoque deveria mesmo ser subdividida, principalmente no que se refere à fase II, onde ocorrem diferentes condições estruturais da Cromatina.
12. *C. putoria* existente no local desta pesquisa apresenta padrão de desenvolvimento ovariano bastante semelhante

ao de *C. putoria* da Tanzânia (África oriental) e produz descendência fértil quando é cruzada com ela. É levantada a hipótese da espécie *C. putoria* do Brasil ser proveniente da África oriental.

VI. RESUMO

Neste estudo foram investigados alguns aspectos básicos da biologia reprodutiva de *C. putoria* mosca varejeira, da família Calliphoridae, de introdução recente no Brasil.

As moscas foram mantidas em gaiolas de criação sob dieta padrão composta por fígado bovino cru (3 horas/dia) e água à vontade.

Constatou-se que são necessários, no mínimo, 6 dias para que as fêmeas tenham seus folículos ovarianos totalmente desenvolvidos, o que ocorre de maneira sincrônica. Este desenvolvimento é possível quando a fêmea recebe dieta proteica adequada, pois do contrário não se inicia a deposição de vitelo nos folículos. Portanto, sob dieta constituída por açúcar e água, *C. putoria* manifestou-se como autógena. Porém, mesmo após um período prolongado sob dieta aproteica, *C. putoria* manteve seu potencial reprodutivo, pois desenvolveu normalmente os folículos quando passou a ter acesso ao fígado.

Esta espécie foi capaz de desenvolver os folículos da segunda camada mesmo quando os primeiros não tinham ainda sido ovipostos, multiplicando dessa forma o número de ovos a ser deixados numa postura.

Os fatos acima mencionados podem ter uma ampla repercussão nas populações naturais, pois se ai também ocorrerem, sabemos que: em ausência de matéria orgânica proteica, as fêmeas não desenvolvem ovos, mas que quando o alimento volta a existir, o processo é retomado e, consequentemente, novos indivíduos surgirão; além disto, em ausência de condições ideais para oviposição, o estoque dos folícu-

los maduros irá sendo multiplicado.

Os ovários são do tipo meroístico politrófico contando em média com 76 folículos por ovário. Existem 15 células tróficas por folículo e o núcleo destas pode apresentar uma ploidia final de até 13 vezes a inicial, estimativa feita a partir das áreas das projeções dos núcleos obtidas de montagem total com coloração de Feulgen. No início do processo de multiplicação desse material nuclear são visíveis cromossomos politênicos típicos. Esses núcleos apresentam um corpúsculo de DNA bastante evidente o qual não encontramos descrito para outras espécies da família.

C. putoria apresenta desenvolvimento ovariano bastante semelhante ao que ocorre para a espécie na Tanzânia (África oriental) e com ela produz descendentes férteis. Este fato nos fez pensar na hipótese de sua origem a partir da África oriental e não da ocidental como anteriormente suposto.

Julgamos que com o presente estudo serão oferecidos subsídios para bem fundamentar futuros programas de controle dessa espécie-praga.

VII. ABSTRACT

This study was carried out to investigate some basic aspects concerning the reproductive biology of a blowfly, *Chrysomya putoria* (Calliphoridae) which has recently been introduced in Brazil.

Adult flies were kept in cages and were fed on fresh cattle liver during 3 hours a day and water "ad libitum".

Results showed that females presented a synchronic development of ovarian follicles, a process which took 6 days at least to be completed.

No yolk deposition in the follicles was started out unless a proper protein diet has been supplied. Therefore, *C. putoria* was an anautogenous species when fed only with sugar and water. However *C. putoria* maintained its reproductive potential presenting normal follicle growth when liver was available even after a long time under an aprotic diet.

The concerned species was able to develop the second batch of eggs when the first one had not been laid yet. Thus, the amount of eggs of a certain oviposition could be multiplied.

Great changes in populations structure can be expected if the facts above also occur in the field since females do not complete oogenesis without proteic matter, but when it is present again in the field, eggs can be produced and, consequently, new flies will be risen. In addition, when ideal conditions for egg laying do not occur, there will be mature follicle batches multiplication.

In this species, ovaries are classified as merostic polytrophic, each one presenting 76 follicles in average. There are 15 nurse cells in a follicle and their nucleus may present a final ploidy 13 times greater than the initial one, which was estimated in view of the nucleus areas projections obtained in Feulgen-stained whole mounts. Typical polytenic chromosomes can be seen at the beginning of this nuclear material multiplication. Those nuclei present a very remarkable DNA body which we did not find described for other Calliphoridae species.

C. putoria ovarian development pattern is very similar to that of Tanzania (Eastern Africa) species. When these two species are crossed, fertile progeny is produced. This leads to the hypothesis of its origin from the Eastern Africa instead of the Western one as previously described.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T.S. The role of juvenile hormone in housefly ovarian follicle morphogenesis. J. Insect Physiol., 20:263-76, 1974.
- ADAMS, T.S. & MULLA, M.S. The reproductive biology of Hippelates collusor (Diptera: Chloropidae) II-Gametogenesis. Ann. ent. Soc. Am., 60(6):1177-82, 1967.
- ADAMS, T.S. & REINECKE, J.P. 1979. The reproductive physiology of the screw worm Cochliomyia hominivorax (Diptera: Calliphoridae). I-Oogenesis. J. med. Ent., 15(5-6):472-83.
- ADAMS, T.S.; HINTZ, A.M. & POMONIS, J.G. Oostatic hormone production in houseflies, Musca domestica, with developing ovaries. J. Insect Physiol., 14:983-93, 1968.
- AKEY, D.H. & POTTER, H.W. Pigmentation associated with oogenesis in the biting fly Culicoides variipennis (Diptera: Ceratopogonidae) : determination of parity. J. med. Entomol. 16(1):67-70, 1979.
- ANDERSON, J.R. Methods for distinguishing nulliparous from parous flies and for estimating the ages of Fannia canicularis and some other cyclorraphous Diptera. Ann. ent. Soc. Am., 57:226-36, 1963.
- ANDERSON, T.W. An introduction to multivariate statistical analysis. New York, John Wiley & Sons, 1958, p. 78-9.

- APPLIN, D.G. Effect of diet on the neuroendocrine system and egg development in the sheep blowfly, Lucilia sericata. Physiol. Entomol., 4:291-9, 1979.
- APPLIN, D.G. Long-term effects of diet on the neuroendocrine system of the sheep blowfly, Lucilia sericata. Physiol. Entomol., 6:129-34, 1981.
- AZEREDO-ESPIN, A.M.L. & PAVAN, C. Karyotypes and possible regions of origin of three species of Calliphoridae (Diptera) recently introduced in Brazil. Rev. Brasil. Genet. 6 (4):619-38, 1983.
- BARTON-BROWNE, L., VAN GERWEN, A.C.M. & WILLIAMS, K.L. Oocyte resorption during ovarian development in the blow fly Lucilia cuprina. J. Insect Physiol., 25:147-53, 1979.
- BARTON-BROWNE, L., BARTELL, R.J., VAN GERWEN, A.C.M. & LAWRENCE, L.A. Relationship between protein ingestion and sexual receptivity in female of the Australian sheep blow fly Lucilia cuprina. Physiol. Entomol., 1(4):235-40, 1976.
- BASILE, R. Estudo da espermatogênese e da ovogênese em Rhynchosciara angelae e da síntese de ácidos nucleicos e proteínas no ovário. Tese de doutoramento, Universidade de São Paulo, 58 p., 1966.
- BAUMGARTNER, D.L. & GREENBERG, B. The genus Chrysomya R-D. (Diptera, Calliphoridae) in the New World. J. med. Ent., 21:105-13, 1984.

- BAXTER, J.A., MJENI, A.M. & MORRISON, P.E. Expression of autogeny in relation to larval population density of Sarcophaga bullata Parker. Can. J. Zool., 51(11):1189-93, - 1973.
- BEATTIE, G.A.C. & CHENEY, J. Oogenesis in L. cuprina. I - Development of the nurse cell nuclei, the oocyte nucleus and the follicle cells. Aust. J. Zool., 27(3):331-48, 1979.
- BEHMER, O.A., TOLOSA, E.M.C. & FREITAS NETO, A.G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, EDART, Ed. da Universidade de São Paulo, 1976. 257 p.
- BELL, W.J. & BOHM, M.K. Oosorption in Insects. Biol. Rev., 50:373-96, 1975.
- BERLYN, A.D. The field biology of the adult sheep headfly, Hydrotaea irritans in south-western Scotland. Bull. ent. Res., 68:431-6, 1978.
- BICKEL, P.J. & DOKSUM, K.A. Mathematical statistics. Basic ideas and selected topics. San Francisco, Holden-Day, - 1977, p.
- BIER, K. Synthese, interzellulärer Transport, und Abbau von Ribonukleinsäure in Ovar der Stubenfliege Musca domestica. J. Cell Biol., 16:436-40, 1963.
- BOYES, J.W. & SHEWELL, G.E. Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). Genetica, 45:435-88, 1975.

- CHAPMAN, R.F. The insects: structure and function. London, English University Press, 1972, 819 p.
- CHARLWOOD, J.D. & LOPES, J. The age-estructure and biting behaviour of Stomoxys calcitrans (L.) (Diptera: Muscidae) from Manaus, Brazil. Bull. ent. Res. 70: 549-55, 1980.
- CHRISTOPHERS, S.R. 1911. The development of the egg follicle in Anophelines. Paludism, 2:73-89.
- CLIFT, A.D. Control of germarial activity and yolk deposition in nonterminal oocytes of Lucilia cuprina. J. Insect. Physiol., 17(4):601-6, 1971.
- CLIFT, A.D. The nutritional and endocrine control of re-production of the Australian sheep blow-fly, Lucilia cuprina (Wied) Ph.D. Thesis, University of Sydney. Apud BEATTIE, G.A.C. & CHENEY, J. Oogenesis in Lucilia cuprina (Wied.) (Diptera: Calliphoridae) I. Development of nurse cell nuclei, the oocyte nucleus and the follicle cells. Aust. J. Zool., 27:331-47, 1979.
- CLIFT, A.D. & MCDONALD, F.J.D. Some relationships between diet and ovarian development in Lucilia cuprina. Aust. J. Zool. 24(1):87-93, 1976.
- CORBET, P.S. Recognition of nulliparous mosquitoes without dissection. Nature, Lond., 187(4739):525-6, 1960.

- DALY, H.V. Biological observation on Hemihalictus lustrans, with a description of the larva (Hymenoptera: Halictidae). J. Kans. ent. Soc., 34:134-41, 1961.
- DETINOVA, T.S. Determination of the physiological age of female Anopheles from the changes of the tracheal system of the ovaries. Med. Parazit. (Mosk.), 14:45, 1945.b. - Apud DETINOVA, T.S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. W.H.O. Monogr. Ser., 47, 1962. 215p.
- DETINOVA, T.S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. World Health Organ. Monograph Ser. 47, 1962, 215p.
- DETINOVA, T.S. Age structure of insect populations of medical importance. A. Rev. Ent., 13:427-50, 1968.
- DE WILDE, J. & DE LOOF, A. Reproduction. In: ROCKSTEIN, M. ed. The physiology of insecta. New York, Academic, 1973. cap. 2, p.11-95.
- DUNN, E. Wing coloration as a means of determining the age of the Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineta Say.). - Ann.appl.Biol., 38:433-4, 1951.
- ELLISON, F.R. & HAMPTON, E.N. Age determination using the apodeme structure in adult screwworm flies (Cochliomyia hominivorax). J.Insect.Physiol., 28(9):731-6, 1982.
- ENGELMANN, F. Endocrine control of reproduction in insects. A. Rev. Ent. 13:1-26, 1968.

- ENGELMANN, F. The physiology of insect reproduction. Oxford, Pergamon, 1970, 307 p.
- ENGELS, W. Geschwindigkeit des RNS-Transports im Einährverband der Dermapteren in Vergleich mit anderen Insekten - meroistischen Ovarytyps. Zool. Anz., 33(suppl.):30-39, 1970. Apud DE WILDE, J. & DE LOOF, A. Reproduction. In: ROCKSTEIN, M., ed. The physiology of insecta. New York, Academic, 1973. cap. 2, p. 11-95.
- FERREIRA, M.J.M. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. Revta. bras. Biol., 38: - 445-54, 1978.
- FLETCHER, B.S.; PAPPAS, S. & KAPATOS, E. Changes in the ovaries of olive flies (Dacus oleae (Gmelin)) during the summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. Ecol. Entomol. 3:99-107, 1978.
- FRAENKEL, G. & BHASKARAN, G. Pupariation and pupation in Cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. Ann. ent. Soc. Am. 66 (2): 418-22, 1973.
- FURLANETTO, S.M.P., CAMPOS, J.L.C., HARSI, C.M., CANDEIAS, J. A.N., BURALLI, G.M. & ISHIHATA, J.K. Microrganismos enteropatógenicos em moscas africanas pertencentes ao gênero - Chrysomya. Revta. Paul. Micr. (no prelo).
- GAGNÉ, R.J. Chrysomya spp Old World Blow flies (Diptera: Calliphoridae), recently established in the Americas. Entomol. Soc. Am. Bull. 27: 21-2, 1981.

- GOODMAN, T., MORRISON, P.E. & DAVIES, D.M. Cytological changes in the developing ovary of the house fly fed milk and other diets. Can. J. Zool., 46:409-26, 1968.
- GREENBERG, B. Flies and Disease vol. II. Biology and disease transmission. Princeton, Princeton University Press, 1973, 447p.
- GUILLOT, F.S.; CAPPEDGE, J.R.; GOODENOUGH, J.L.; ADAMS, T.S. & AHRENS, E. Behavior and reproductive status of native female screw worms attracted to a host. Ann. ent. Soc.Am., 70(4):588-90, 1977.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A.P. & LINHARES, A.X. Three newly introduced species of Chrysomya Robineas-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae), Revta. bras. Ent., 22(1):53-60 , 1978.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A.P. & BURALLI, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of Chrysomya Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae).Revta. bras. Ent., 23(4):245-55, 1980.
- HARLOW, P.M. A study of ovarial development and its relation to adult nutrition in the blowfly, Protophormia terrae-novae (R.-D.). J. exp. Biol., 33:777-97, 1956.
- HAYDAK, M.H. Changes with age in the appearance of some internal organs of the honey bee. Bee Wld., 38:197-207, - 1957.

- IMBIRIBA, A.S., IZUTANI, D.T., MILHORETTO, I.T. & LUZ, E. In
trodução de Chrysomya chloropyga (Wiedemann, 1818) na re-
gião Neotropical (Diptera: Calliphoridae). Archos Biol.
Tecnol., Curitiba, 20:35-9, 1977.
- JACOB, J. & SIRLIN, J.L. Cell function in the ovary of Dro-
sophila. I - DNA classes in nurse cell nuclei as determined
by autoradiography. Chromosoma, 10:210-28, 1959.
- JIRÓN, L.F. Sobre moscas califóridas de Costa Rica (Dipte-
ra: Cyclorrapha). Brenesia 16: 221-22, 1979.
- JOHNSTON, J.S. & ELLISON, J.R. Exact age determination in
laboratory and field-caught Drosophila. J.Insect.Physiol.,
28(9):773-9, 1982.
- KAMAL, A.S. Comparative study of thirteen species of
sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera).
I/Bionomics. Ann. ent. soc. Am., 51:261-71, 1958.
- KING, R.C. & VANOUCEK, E.G. Oogenesis in adult Drosophila
melanogaster. X. Studies on the behavior of the follicle
cells. Growth, 24:333-8, 1960.
- KING, R.C., RUBINSON, A.C. & SMITH, R.F. Oogenesis in adult
Drosophila melanogaster. Growth, 20:121-57, 1956.
- KHURAD, A.M. & THAKARE, V.K. Cytology and histochemistry of
the ovary in the buffalo-fly, Lyperosia exigua (De Meijere)
(Diptera: Muscidae). Int. J. Invert. Reprod. 2:297-309,
1980.

- KUZINA, O.S. On the gonotrophic relationships in horse-flies (Stomoxys calcitrans and Haematobia stimulans . Med. Parazit. (Mosk.), 11:70-78, 1942. Apud DETINOVA, T.S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. W.H.O. Monogr. Ser., 47, 1962, 215p.
- LA CHANCE, L.E. & BURNS, S.B. Oogenesis and radiosensitivity in Cochliomyia hominivorax. Biol. Bull., 124(1):65-83, - 1963.
- LA CHANCE, L.E. & LEVERICH, A.P. Radiosensitivity of - developing reproductive cells in female Cochliomyia hominivorax. Genetics, 47:721-35, 1962 .
- LA CHANCE, L.E. & LEVERICH, A.P. Cytology of oogenesis in chemosterilized screw-worm flies, Cochliomyia hominivorax, as related to endomitosis in nurse cells. Ann. ent. Soc. Am., 61:1188-97, 1968.
- LA CHANCE, L.E. & RUUD, R.L. Cytological identification of native and irradiated released screw-worm flies in trap catches. J. econ. Ent., 70(4):501-4, 1977.
- LAURENCE, B.R. Autogeny in Aedes (Finlaya) togoi Theobald (Diptera, Culicidae). J. Insect Physiol., 10:319-31, 1964.
- LEAL, T.T.S., PRADO, A.P. & ANTUNES, A.J. Rearing the larvae of the blowfly Chrysomya chloropyga (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) on oligidic diets. Revta. bras. Zool., 1(1):41-44, 1982.

- LEITE, A.C.R., GUIMARÃES, M.P., MADEIRA, N.G. & LIMA, W.S. -
Primeira ocorrência no Brasil de mÍiase em bezerro por
Chrysomya albiceps (Diptera: Calliphoridae). Archos Bras.
Med. Vet. Zoot., 35(2):287-8, 1983.
- LEWIS, D.J. Observation on Simulium damnosum in the Southern
Cameroons and Liberia. Ann. trop. Med. Parent., 54:208-23,
1960.
- LILLIE, R.D. Histopathologic technic and practical histo-
chemistry. New York, Blakiston Co., 1954, 50lp.
- LINHARES, A.X. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagi-
dae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil.
Revta. bras. Ent., 25:189-215, 1981.
- LISON, L. Histochemie et cytochimie animales. Paris, Gauthier-
-Villars, 1960, 607p.
- MELLO, M.L.S. Nucléolo. Estrutura, ultra-estrutura e compo-
sição. A biogênese de ribossomos e outras funções. In:
VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., ed. Biologia celular básica.
Rio de Janeiro, Ateneu, 1984 (no prelo).
- MELLO, M.L.S. & TAKAHASHI, C.S. DNA content and nuclear
volume in larval organs of Apis mellifera. J. Apic. Res.,
10(3):125-32, 1971.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. Ciência e
Cultura, 30(6):665-76, 1978.

- MER, G.G. Experimental study on the development of the ovary in Anopheles elutus, Edw. (Dipt. Culic.). Bull. ent. Res., 27:351-9, 1932.
- MICHENER, C.D., CROSS, E.A., DALY, H.V., RETTENMEYER, C.W. & WILLE, A. Additional techniques for studying the behavior of wild bees. Insectes soc., 2:237-46, 1955.
- NAYAR, J.K. & KNIGHT, J.W. Ovarian development in Culex nigripalpus and its implication for disease transmission. Ent. expl. & appl. 29:49-59, 1982.
- NEVILLE, A.C. Daily growth layers for determining the age of grass hopper populations. Oikos, 14(I):1-11, 1963.
- PAINTER, T.S. & REINDORP, E.C. Endomitosis in the nurse cells of the ovary of Drosophila melanogaster. Chromosoma, 1:276-83, 1939. Apud JACOB, J. & SIRLIN, J.L. Cell function in the ovary of Drosophila. I. DNA classes in nurse cell nuclei as determined by autoradiography. Chromosoma, 10:210-28, 1959.
- PALKOVITZ, M. & FISCHER, J. Karyometric investigations. Budapest, Akadémiai Kiadó, 1968.
- PAPPAS, C. & FRAENKEL, G. Hormonal aspects of oogenesis in the flies Phormia regina and Sarcophaga bullata. J. Insect. Physiol., 24:75-80, 1978.
- PERRY, M.E.L. Malaria in the Jeypore Hill tract and adjoining coast land. Paludism, 5:32-40, 1912.

- POLOVODOVA, V.P. Age changes in the female reproductive system of Anopheles and age composition of mosquito populations. Tese, 1947. Apud DETINOVA, T.S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. W.H.O. Monogr. Ser., 47, 1962, 215p.
- POLOVODOVA, V.P. Determination of the physiological age of female Anopheles. Med. Parazit. (Mosk.), 18:352-355, 1949. Apud DETINOVA, T.S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. W.H.O. Monogr. Ser., 47, 1962, 215p.
- PONT, A.C. Family Calliphoridae. In: CROSSKEY, R.W., ed. Catalogue of the Afro-Tropical regions. London, British Museum (N.H.), 1980. cap. 90, p.779-800.
- PRADO, A.P. & GUIMARÃES, J.H. Estado atual da distribuição e dispersão das espécies do gênero Chrysomya R-D. na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). Revta. bras. Ent., 26(3/4): 225-31, 1983.
- PRITCHARD, G. The ecology of a natural population of Queensland fruit fly, Dacus tryoni. III- The maturation of female flies in relation to temperature. Aust. J. Zool., 18:77-89, 1970.
- RIBBERT, D. Chromomeres and puffing in experimentally induced polytene chromosomes of Calliphora erythrocephala. Chromosoma 74: 269-98, 1979.
- RICHARD, R.D. & GERRISH, R.R. The first confirmed field case of myiasis produced by Chrysomya sp (Diptera:Calli-

phoridae) in the continental United States. J. Med Entomol. 20 (6): 685, 1983.

RICHARDSON, R.H., ELLISON, J.R. & AVERHOFF, W.W. Autocidal control of screw worms in North America. Science 215: 361-70, 1982.

RIEMANN, J.G. A cytological study of radiation effects in testes of the screw-worm fly, Cochliomyia hominivorax (Diptera: Calliphoridae). Ann. ent. Soc. Am., 60(2):308-20, 1967.

ROBBINS, W.E. & SHORTINO, T.J. Effect of cholesterol in the larval diet on ovarian developments in the adult house fly. Nature, 194(4827):502-3, 1966.

ROSAY, B. Anatomical indicators for assessing the age of mosquitoes: the teneral adult (Diptera: Culicidae). Ann. ent. Soc. Am., 54:526-9, 1961.

ROUBAUD, M.E. Cycle autogène d'attente et générations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun Culex pipiens L. C.R. Acad. Sci., Paris, 188:735-8, 1929.

SAKURAI, H. Studies on the ovarian development in the housefly, Musca domestica vicina Macquart. I-Stages of oogenesis and the functions of the follicle. Jap. J. med. Sci. Biol., 26:239-48, 1973.

- SAUNDERS, D.S. The ovulation cycle in Glossina morsitans - Westwood (Diptera: Muscidae) and a possible method of age determination for female tsetse flies by the examination of their ovaries. Trans. R. ent. Soc. Lond., 112(pt 9) : 221-38, 1960.
- SAUNDERS, D.S. Age determination for female tsetse flies and the age composition of samples of Glossina pallidipes Aust., G. palpalis fuscipes Newst. and G. brevipalpis - Newst. Bull ent. Res., 53:579-95, 1962.
- SCHLEIN, Y. Age grouping of anopheline malaria vectors (Diptera: Culicidae) by the cuticular growth lines. J. med. Ent., 16(6):502-6, 1979.
- SPIELMAN, A. Bionomics of autogenous mosquitoes. A. Rev. Ent., 16:231-48, 1971.
- SPRADBERY, J.P. & SANDS, D.P.A. Reproductive system and terminalia of the Old World screw-worm fly, Chrysomya bezziana Villeneuve (Diptera: Calliphoridae). Int.J.Insect Morph. & Embryol. 5(6):409-21, 1976.
- SPRADBERY, J.P. & SCHWEIZER, G. Oosorption during ovarian development in the screw-worm fly, Chrysomya bezziana. Ent. exp. & appl., 30:209-14, 1981.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exptl. Cell Res., 75:304-306, 1972.

- TELFER, W.H. Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. Adv. Insect Physiol., 11:223-319, 1975.
- TREPTE, H.-H. Rate of follicle growth, change in follicle volume and stages of macromolecular synthesis during ovarian development in Musca domestica. J.Insect.Physiol. 25:199-203, 1979.
- TREPTE, H.-H. Rate of follicle growth, duration of oogenesis stages and interindividual synchrony of egg development in the 1st., 2nd. and 3rd. egg cycles of the house fly, Musca domestica. Zool. Jb. Anat., 105:362-70, 1981.
- TREPTE, H.-H. & TREPTE-FEUEBORN, C. Development and physiology of follicular atresia during ovarian growth in the house fly, Musca domestica. J. Insect. Physiol., 26:329 - 38, 1980.
- TUKEY, J.W. Exploratory data analysis. Reading, Addison-Wesley, 1977., 688p.
- TYNDALE-BISCOE, M. & HUGHES, R.D. Changes in the female reproductive system as age indicators in the busfly, Musca vetustissima Wlk. Bull. ent. Res., 59:129-41, 1969.
- TYNDALE-BISCOE, M. & KITCHING, R.L. Cuticular bands as age criteria in the sheep blowfly Lucilia cuprina (Wied.) (Diptera: Calliphoridae). Bull. ent. Res., 64:161-74, 1974.

- ULLERICH, F-H. Chromosomenverhältnisse, konstitutives Heterochromatin und Geschlechtsbestimmung bei einigen Arten der Gattung Chrysomya (Calliphoridae, Diptera). Chromosoma 58, 113-36, 1976.
- VOGT, W.G., WOODBURN, T.L. & TYNDALE-BISCOE, M. A method of age determination in Lucilia cuprina (Wied.) (Diptera: Calliphoridae) using cyclic changes in the female reproductive system. Bull. ent. Res., 64:365-70, 1974.
- YOUNG, E.C. Teneral development in British Corixidae. Proc. R. ent. Soc. Lond. A, 40:159-68, 1965.
- WEBSTER, R.P. & STOFFOLANO, J.G. Jr. The influence of diet on the maturation of the reproductive system of the apple maggot, Rhagoletis pomonella. Ann. ent. Soc. Am., 71:844-9, 1978.
- WILLIAMS, K.L., BARTON BROWNE, L. & VAN GERWEN, A.C.M. - Quantitative relationships between the ingestion of protein rich material and ovarian development in the Australian sheep blow fly, Lucilia cuprina. Int. J. Invert. Reprod. 1(2):75-88, 1979.
- ZUMPT, F. Calliphoridae (Diptera Cyclorhapha) Part I: Calliphorini and Chrysomyiini. Explor. Parc. nat. Albert, Miss. de Witte 87, 200p., 1956a. Apud ZUMPT, F. Myiasis in man and animals in the Old World. London, Butterworths, 1965. 267p. .
- ZUMPT, F. Myiasis in man and animals in the Old World. - London, Butterworths, 1965, 267p.