

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9840
IB/80101

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988



UNICAMP

80101

a

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pela Sra. Rita Maria
Pereira Avancini e aprovada pela
Comissão Julgadora.

Rita Maria Pereira Avancini

29/07/88

**DESENVOLVIMENTO NUCLEAR
DE CÉLULAS TRÓFICAS
OVARIANAS DE
Chrysomya putoria
(DIPTERA, CALLIPHORIDAE).**

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

510

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

T/UNICAMP

988.

Av15_d

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CLASSIF.	T
AUTOR.	Rv15d
V.	X
TRMBO D.	9840
1B	810

1B/ 80101
24 9840



O presente trabalho foi realizado nos Departamentos de Parasitologia e Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

DEDICO

Ao Zezé,

*com quem aprendi enxergar cada fato em sua verdadeira dimensão.
Procurarei lembrar-me. Sempre.*

AGRADEÇO

A Dra. Maria Luiza Silveira Mello,

*orientadora dedicada,
exemplo de trabalhadora incansável,
alma solidária em todos os momentos difíceis,*

com carinho especial.

*Ao Dr. Benedicto de Campos Vidal, não só pelas relevantes
questões levantadas quando do exame prévio, mas principalmente
pelas horas preciosas que lhe subtraímos de seu trabalho junto ao
citofotômetro.*

*Aos Drs. Angelo Pires do Prado e Sérgio Furtado dos Reis, pelas
sugestões apresentadas durante a arguição prévia e,
especialmente, pela proveitosa convivência que me proporcionam no
cotidiano.*

*Ao Dr. José Mariano Amabis, pela grande contribuição às
interpretações dos dados e também, pela sua solicitude na
tentativa de elucidar alguns aspectos do trabalho, oferecendo,
para isso, espaço e material de seu laboratório.*

*As Dras. Christine Hackel e Marina Staurengo da Cunha, pelas
valiosas sugestões apresentadas na análise prévia desse trabalho.*

*Ao Dr. Octavio Henrique Oliveira Pavan, por sua atuação como
orientador de programa durante a realização do curso.*

*Aos caros colegas do Departamento de Parasitologia, pela
convivência amigável, condição importante no desenvolvimento de
um trabalho e, em especial à Dra. Marlene Tiduko Ueta, que,
prontamente, substituiu-me nas atribuições departamentais sempre
que, em função deste trabalho, não pude cumpri-las.*

*A Sra. Liliâne Zitti, pela grande dedicação na manutenção da
criação de moscas e do laboratório de Entomologia do Departamento
de Parasitologia.*

*A coordenadora do Centro de Microscopia Eletrônica, Dra. Maria
Alice Cruz-Höfling, pela facilitação no uso da câmara escura e
dos serviços da Srta. Maria Tereza de Paula.*

*As funcionárias da biblioteca do Instituto de Biologia, pela
presteza com que sempre me atenderam.*

*A cara colega, Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, grande
estimuladora desse trabalho, pela dedicação e interesse
constantes.*

*Ao Departamento de Imunologia e Microbiologia, pelo fornecimento
de Nitrogênio líquido em vários momentos críticos deste trabalho.*

*Aos funcionários dos Departamento de Parasitologia e Biologia
Celular, que, de uma forma ou de outra, prestaram sua colaboração.*

*Ao Zezé, pela participação ativa em todas as etapas deste
trabalho, e, em especial, pela inestimável ajuda na elaboração
da arte-final e confecção dos exemplares.*

*A Mariana e Maria Carolina, que, com sua alegria de crianças,
amenizavam a arduidade dos dias de trabalho, e, lembravam-me do
objetivo primeiro de todas as realizações: o futuro que deve ser
construído.*

*No momento em que esta lista começa tentar escapar dos limites da
Universidade, gostaria de não esquecer daqueles que, por
variados motivos, fizeram com que este trabalho se estendesse por
um período maior do que o necessário. A estes também agradeço,
pois contribuíram para a compreensão que hoje tenho da real
estrutura da instituição que abriga os geradores do conhecimento,
a Universidade. Deles me lembrarei, sempre que voltar a ler o
ensaio "Liberdade" de Albert Einstein:*

*"(...) O desenvolvimento da Ciência e das atividades criadoras do
espírito em geral requer ainda outro tipo de liberdade (...).
Essa liberdade interior é um raro dom da natureza e um objetivo
digno de ser conquistado pelo indivíduo. (...) Assim, as escolas
podem prejudicar o desenvolvimento da liberdade interior através
de influências autoritárias e através da imposição, aos jovens,
de cargas espirituais; por outro lado, as escolas podem favorecer
essa liberdade ao encorajar o pensamento independente. Só quando
a liberdade exterior e a interior forem constante e
conscientemente conquistadas, haverá a possibilidade de
desenvolvimento espiritual e de perfeição e, assim, de melhorar a
vida interior e exterior do homem."*

Albert Einstein, "Pensamento político e últimas conclusões",
São Paulo, Brasiliense, 1960, trad. de Maria Luiza Nogueira.



INDICE

1.	INTRODUÇÃO	
1.1	<u>Chrysomya putoria</u>	
1.1.1	Biologia	1
1.1.2	Distribuição	3
1.1.3	Taxonomia	5
1.1.4	Dados cariotípicos	5
1.2	As células tróficas ovarianas	7
1.2.1	Endociclos	10
1.2.2	Heterocromatina	12
1.2.3	O aumento de conteúdo de DNA e alterações em estrutura cromatínica nas células tróficas de dípteros	14
1.3	As células foliculares epiteliais	20
1.4	Dieta e ovogênese	21
2.	COLOCAÇÃO DO PROBLEMA E OBJETIVOS	24
3.	MATERIAIS	
3.1	Obtenção das moscas	27
3.2	Criação	
3.2.1	Larvas	27
3.2.2	Adultos	28
3.2.2.1	Dieta padrão	28
3.2.2.2	Dieta de açúcar	28
3.3	Remoção dos ovários	29
4.	MÉTODOS	
4.1	Classificação das fases da ovogênese	30
4.2	Obtenção dos preparados citológicos	
4.2.1	Preparo do material	32
4.2.2	Reação de Feulgen	32
4.2.3	Método de Banda C	33
4.3	Análise morfológica	34
4.4	Microespectrofotometria	34
4.5	Apresentação dos dados quantitativos	37
5.	RESULTADOS	
5.1	Células tróficas	
5.1.1	Fenótipos nucleares	
5.1.1.1	Alterações ao longo do desenvolvimento	40
5.1.1.2	O cromossomo X na fase II	42
5.1.1.3	Dieta de açúcar e cromossomos politênicos	44

5.1.2	Conteúdo Feulgen-DNA e áreas cobertas por cromatina	
5.1.2.1	Alterações ao longo do desenvolvimento	44
5.1.2.2	Alterações durante a fase II	50
5.1.2.3	Resultados relativos à dieta de açúcar	52
5.1.2.4	Conteúdo Feulgen-DNA e área do corpo heterocromático	53
5.2	Células foliculares epiteliais	55
6.	DISCUSSÃO	
6.1	Células tróficas	
6.1.1	Alterações ao longo do desenvolvimento	
6.1.1.1	Conteúdo Feulgen-DNA e áreas cobertas por cromatina	59
6.1.1.2	Fenótipos nucleares: politenia e poliploidia	61
6.1.1.3	O cromossomo X	65
6.1.1.4	Dieta de açúcar e politênicos	67
6.1.1.5	O corpo heterocromático	69
6.2	Células foliculares epiteliais	71
6.3	Perspectivas futuras	74
7.	CONCLUSÕES	77
8.	RESUMO	81
9.	SUMMARY	83
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85





FIGURA 1 — Fêmeas de *Chrysomya putoria* ovipondo sobre carne. Observar a presença de grandes massas de ovos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Chrysomya putoria

1.1.1 Biologia

Chrysomya putoria é uma mosca varejeira da família Calliphoridae, cuja biologia tem sido muito estudada em função da recente introdução deste gênero nas Américas (Laurence, 1986).

Muitas varejeiras, como Cochliomyia hominivorax nas Américas (Zumpt, 1965), sua equivalente no Velho Mundo, Chrysomya bezziana (Norris, 1965; Zumpt, 1965), Lucilia cuprina na Austrália e África (Zumpt, 1965) e Chrysomya albiceps na região Etiópica (Zumpt, 1965), são conhecidas por causarem miíase¹ primária.

Outras espécies de Calliphoridae podem ocasionar miíase a partir de um ferimento, ou mesmo expandir uma miíase iniciada por uma das espécies primárias. Neste caso a fêmea coloca os ovos no animal e as larvas podem aí se desenvolver até o momento da pupariação, quando caem no solo (Zumpt, 1965). Alternativamente, essas espécies não primárias podem colocar seus ovos em material

¹ Miíase: infestação de vertebrados por larvas de dípteros que, pelo menos por certo período de vida, alimentam-se de tecido morto ou vivo, de substâncias líquidas destes vertebrados ou, ainda, do alimento ingerido por eles (Zumpt, 1965).

orgânico em decomposição, onde se incluem cadáveres e fezes usados pelas larvas para seu desenvolvimento. *Chrysomya putoria* inclui-se nesse grupo de varejeiras, que ora são saprotróficas, ora são necrotróficas (Swift *et alii*, 1979). São referidas também como parasitas facultativas (Zumpt, 1965).

Essas varejeiras com biologia variável podem apresentar diversos graus de sinantropia², ou seja, desde uma espécie habitante típica de mata (grau de sinantropia = -100) até espécies cujo desenvolvimento ocorre de maneira inteiramente dependente do ambiente urbano (grau de sinantropia = +100).

O grau de sinantropia encontrado para *C. putoria* no Brasil foi de +31,7 para a região de Campinas (SP) (Linhares, 1981) e de +88,39 para região de Goiânia (GO) (Ferreira, 1980), o que demonstrou a preferência dessa espécie por áreas habitadas. Na África, *C. putoria* é referida como uma presença constante nas latrinas e em esterco, onde se cria (Lewis, 1955; Busvine *et alii*, 1963; Norris, 1965; Greenberg & Polvony, 1971; Curtis, 1984). Dados não publicados desta autora e de outros pesquisadores obtidos no Estado de São Paulo, mostram que, em determinadas épocas do ano, *C. putoria* é a espécie predominante no esterco que se acumula sob as gaiolas de galinhas poedeiras,

² Sinantropia: denota a dependência que certas espécies animais (roedores, moscas e outros artrópodes) têm, para sua existência, do ambiente modificado pelo homem e seus animais domésticos. O grau de sinantropia é dado por uma escala que varia de -100 (não-sinantrópicas) a +100 (altamente sinantrópicas) (Polvony, 1971).

suplantando em número todas as outras espécies normalmente apontadas como causadoras de problemas em aviários. No sul da África, pelo contrário, *C. putoria* é descrita como ocorrendo em densidade bastante baixa nestes criadouros (Hulley, 1986).

Assim, por ser saprotrófica/necrotrófica e estar presente na circunvizinhança do homem, *C. putoria* é considerada uma espécie potencialmente veiculadora de agentes patogênicos para o ser humano (Greenberg, 1971, 1973; Sulaiman *et alli*, 1988).

1.1.2 Distribuição

As espécies do gênero *Chrysomya* são descritas nos livros textos como encontradas somente no Velho Mundo, sendo aqui, no Novo Mundo, substituídas pelo gênero equivalente, *Cochliomyia* (Zumpt, 1965; Greenberg, 1973).

No entanto, em dezembro de 1975, adultos de *Chrysomya putoria* foram capturados em Curitiba (PR) (Imbiriba *et alli*, 1977). No ano seguinte, espécimes foram coletados na capital, litoral e interior do estado de São Paulo (Guimarães *et alli*, 1978) e um levantamento realizado de 1978 a 1979 revelou a presença de *C. putoria* em vários outros estados, incluindo Pará, Bahia e Rio Grande do Sul (Guimarães *et alli*, 1980). Em 1980,

várias localidades, que o trabalho anterior mostrava ainda não terem sido alcançadas, já abrigavam *C. putoria* na sua dipterofauna, entre elas Amazonas, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Prado e Guimarães, 1983). Em 1983, essa espécie foi registrada em todo o Brasil e levantamentos realizados em outros países sul-americanos, naquela virada de década, mostravam, assim como aqui, a presença em abundância não só de *C. putoria* como de outras duas espécies do gênero, *C. albiceps* e *C. megacephala* (Mariluis, 1980; Laurence, 1981; Prado & Guimarães, 1983; Baumgartner & Greenberg, 1984; Laurence, 1986).

Coincidentemente com o registro de grandes níveis populacionais de *C. putoria* no Brasil, houve um declínio significativo da presença de *Cochliomyia macellaria*, o que tem sido apontado como resultado de deslocamento por parte da primeira (Ferreira, 1980; Baumgartner & Greenberg, 1984).

A hipótese levantada para a entrada e estabelecimento de *C. putoria* no país relaciona-os à chegada de vários navios com refugiados africanos, provenientes de ex-colônias portuguesas emancipadas à época (Guimarães *et alii*, 1980). Trazendo animais domésticos e alimentos armazenados por longo tempo, em condições sanitárias bastante precárias, os refugiados devem ter promovido o desembarque de muitos exemplares jovens e adultos de *Chrysomya*. Aliado a isto, deve ser considerada a intensificação do tráfego

comercial entre as Américas e a África nestas duas últimas décadas.

1.1.3 Taxonomia

O "status" taxonômico de *Chrysomya putoria* é ainda questionável. Alguns autores como Zumpt (1956; 1965) e Pont (1980) consideram *C. putoria* apenas uma variação de *C. chloropyga*. Por outro lado, Boyes & Shewell (1975) e Baumgartner & Greenberg (1984) reconhecem que se tratam de duas espécies.

Considerando a identificação realizada por Dr. B.R. Laurence (com. pessoal) bem como a ausência na espécie em estudo de sinais torácicos característicos de *C. chloropyga* (Greenberg, 1971), optamos pela terminologia adotada por Baumgartner & Greenberg (1984): *C. putoria* = *C. chloropyga* forma *putoria*. Seria esta, então, a espécie que chegou às Américas.

1.1.4 Dados cariotípicos

A análise cariotípica de *C. putoria* foi realizada por Boyes & Shewell (1975) para a espécie coletada na África do Sul

(Joanesburgo) e no Quênia (Nairobi), por Ullerich (1976), de uma linhagem mantida em Londres, que por ter sido fornecida por Dr.J.R.Busvine, deveria ser proveniente de alguma região do Congo (com. pessoal Dr.B.R. Laurence), e por Azeredo-Espin & Pavan (1983), para exemplares mantidos no Departamento de Parasitologia (IB) da UNICAMP e coletados na região de Campinas (SP).

Como todo membro da família Calliphoridae, *C. putoria* apresenta número de cromossomos $2n=12$, com 5 pares de autossomos metacêntricos e 1 par de cromossomos sexuais homomórficos (XX) na fêmea e heteromórficos (XY) no macho. O par sexual é o menor de todos os do lote (Azeredo-Espin & Pavan, 1983). Ullerich (1976) descreveu, através de estudos de padrão de banda-C em cromossomos mitóticos e meióticos, a presença de heterocromatina constitutiva em todos os cromossomos dessa espécie. Nos 5 pares dos autossomos ela é restrita a pequenas regiões adjacentes aos centrômeros. Os cromossomos sexuais são quase totalmente heterocromáticos.

Avancini & Mello (1987) descreveram a natureza heterocromática de um corpo que aparece no núcleo das células tróficas a partir da fase III de desenvolvimento ovariano, o qual poderia ser resultante da associação da heterocromatina do X com a centromérica dos autossomos.

1.2 AS CÉLULAS TROFICAS OVARIANAS

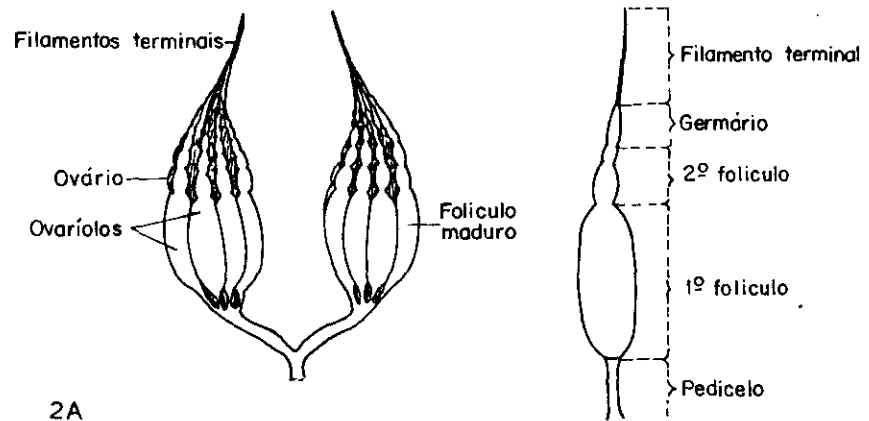
Os ovários dos insetos são constituídos por um conjunto de ovaríolos, os quais são classificados segundo explicação que se segue. Há os panoísticos, nos quais os folículos aí originados são formados pelo oócito envolvido por uma camada de epitélio folicular e, há os meroísticos, onde também concorrem para a formação do folículo uma ou mais células tróficas (Brandt, 1874). Baseando-se na localização das células tróficas em relação ao oócito, há uma subdivisão na classificação dos ovaríolos meroísticos (Gross, 1903). Se estas células estão junto ao oócito, formando um conjunto envolto pelo epitélio folicular, os ovaríolos são chamados meroísticos politróficos. As células tróficas podem, no entanto, estar distantes do oócito, próximas ao germário, mas ligadas ao oócito por cordões; os ovaríolos são então denominados meroísticos acrotróficos (revisões de: Engelmann, 1970; de Wilde & de Loof, 1973; Telfer, 1975; Berry, 1985).

Os dípteros apresentam ovário com ovaríolos do tipo meroístico politrófico (revisão: Martoja, 1977), representado na Figura 2, a qual mostra também um esquema de um folículo ovariano, com seus componentes: oócito, câmara trófica e epitélio folicular. Em Calliphoridae todos os ovaríolos apresentam desenvolvimento sincrônico e os ovos, formados a cada ciclo, são

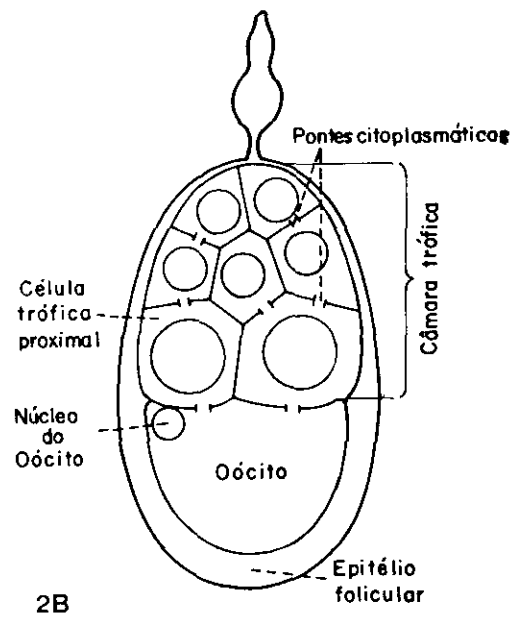
FIGURA 2:

2A) Esquema de ovário contendo vários ovaríolos do tipo meroístico politrófico. Ao lado um desses ovaríolos.

2B) Esquema de um folículo ovariano contendo : oócito em desenvolvimento, câmara trófica, com algumas células tróficas representadas, e epitélio folicular. Somente as 4 (duas no desenho) células tróficas proximais estão em contato direto com o oócito.



2A



2B

postos geralmente de uma só vez (Figura 1).

O folículo ovariano de *C. putoria* é composto de 16 cistócitos. Estes são derivados, como produto de 4 divisões mitóticas, de uma célula germinativa denominada cistoblasto (terminologia segundo Brown & King, 1964) que, por sua vez, originou-se no germário a partir de uma divisão mitótica da oogônia (Avancini & Prado, 1986). Somente um dos cistócitos transforma-se em oócito; as 15 células irmãs remanescentes desenvolvem-se em células tróficas, sendo que os citoplasmas das mesmas permanecem interconectados entre si e ao do oócito por pontes intercelulares (*ring canals*) (Brown & King, 1964; revisões: de Wilde & de Loof, 1973; Telfer, 1975).

Apesar de todas as 16 células serem de origem germinativa, as 15, que se transformam em células tróficas, têm como função a produção de RNA que será fornecido ao oócito. O RNA, do tipo ribossomal principalmente, a ser usado na embriogênese, é transportado ao oócito em desenvolvimento através das pontes intercelulares que o comunicam com as 4 células tróficas mais basalmente localizadas (revisão: de Wilde & de Loof, 1973; revisão: Telfer, 1975; Ribbert & Buddendick, 1984).

Existem casos excepcionais de ovários meroísticos politróficos onde foram descritas amplificação de rDNA nos

núcleos dos oócitos (Ribbert & Bier, 1967), amplificação nos núcleos das células tróficas (Cave, 1982) e alguns casos de sub-replicação destes mesmos genes (Renkawitz & Kunz, 1975). Apesar disto, aceita-se que a poliploidização da célula trófica, sem qualquer amplificação seletiva, possa ser responsável pela quantidade aumentada de rDNA disponível para transcrever esse RNA (Cave, 1982).

Há trabalhos que atribuem às células tróficas também o papel de sintetizadoras das proteínas que compõem o vitelo (Gutzeit, 1980). A maioria dos autores, no entanto, refuta esta teoria, considerando-a baseada em dados não muito conclusivos (Brennan *et alii*, 1982). Assim, para que o oócito complete seu desenvolvimento, ele deve, partindo de uma célula inicialmente semelhante às 15 células tróficas, aumentar seu volume cerca de 100.000 vezes e ser totalmente preenchido por vitelo, segundo cálculos de King *et alii* (1956) para Drosophila melanogaster. Este vitelo é composto dentre outros elementos, de proteínas, das quais as principais são as vitelinas (Engelmann, 1970, 1979; Bownes, 1986). As vitelinas, codificadas por genes presentes no cromossomo X, como foi verificado em Drosophila e Locusta (Postlethwait & Jowett, 1980; Bradfield & Wyatt, 1983), têm síntese exógena ao ovário, principalmente nos corpos gordurosos abdominais (revisões: Engelmann, 1979; Hagedorn & Kunkel, 1979). As vitelogeninas, como são chamadas as vitelinas quando presentes

na hemolinfa, são capturadas por pinocitose pela córtex do oócito. Para atingí-la, essas proteínas devem atravessar os espaços intercelulares modificados das células epiteliais que recobrem o oócito (Hagedorn & Kunkel, 1979; Telfer *et alii*, 1982; Berry, 1985).

1.2.1 Endociclos

Os termos endoreduplicação e endomitose, bem como outros relacionados a modificações do ciclo mitótico têm sido apresentados por diversos autores sem grande concordância quanto à nomenclatura empregada para os fenômenos (Pearson, 1974; Brodsky & Uryvaeva, 1977; Nagl, 1978; Lima de Faria, 1983; Therman, 1986, para citar alguns). Optamos por usá-los de acordo com Brodsky & Uryvaeva (1977) por uma simples questão de clareza quanto à apresentação de conceitos.

Nos chamados endociclos, ocorre duplicação do material cromatínico sem haver divisão celular subsequente nem dissociação do envólucro nuclear. Se ocorrida a replicação de DNA, as cromátides filhas não se separarem, permanecendo intimamente pareadas e, além disso, houver pareamento de homólogos, formam-se unidades cromossômicas conhecidas como cromossomos politênicos. O grande número de cromátides dispostas, assim

pareadas, torna a alternância de regiões cromoméricas e intercroméricas visível, originando os conhecidos padrões de bandas e interbandas dos cromossomos politênicos. É importante lembrar que, em dípteros, os cromossomos politênicos aparecem em número correspondente ao número n do genoma, dado o pareamento de homólogos.

Segundo Brodsky & Uryvaeva (1977) e também Nagl (1978) a endoreduplicação não necessariamente leva à politenia, ao que parece quando o número de replicações é menor.

Uma segunda possibilidade que ocorre nos endociclos é a replicação do material cromatínico, seguida por algumas das fases características da mitose porém sem formação de placa equatorial nem movimento de anáfase (Geitler, 1939) e, por fim, pela separação de cada par de cromossomos filhos. Como não houve rompimento da membrana nuclear neste processo, os autores o denominam endomitose. Neste caso o produto é um núcleo poliplóide, com um número de cromossomos maior do que $2n$. Deve-se lembrar que a poliploidia pode decorrer não só de endociclos, mas também de distúrbios de uma mitose normal e de fusão nuclear (Brodsky & Uryvaeva, 1977).

1.2.2 Heterocromatina

Assim como em relação aos conceitos apresentados no sub-item **Endociclos**, há ou houve, com relação à heterocromatina, divergências entre diversos autores quanto à sua conceituação (revisão: Mello, 1978).

Este termo foi definido por Heitz (1928) para designar a cromatina de partes específicas de certos cromossomos, que permanecem condensadas durante a intérfase, retendo as propriedades de colorabilidade intensa característica de cromossomos metafásicos. Em contraposição à heterocromatina, a cromatina que se apresentava difusa foi chamada eucromatina.

Brown (1966) propôs uma distinção das heterocromatinas em dois grandes grupos. A heterocromatina constitutiva estaria presente em ambos os homólogos, sendo um exemplo a que ocorre vizinha à região centromérica dos cromossomos. Por sua vez, a heterocromatina facultativa estaria presente em apenas um dos cromossomos do par, da qual um bom exemplo é o lote de cromossomos paternos dos pulgões coccídeos (Brown & Nur, 1964) ou o comportamento de um dos cromossomos X em fêmeas de mamíferos (Barr & Bertram, 1949; Lyon, 1961; 1962; 1974).

Uma das características bem conhecidas da heterocromatina

constitutiva é que se trata de um tipo cromatínico especial, que apresenta em sua composição um DNA altamente repetitivo (revisão: Mello, 1978). Como bem lembra essa autora, outros tipos de DNA, que não repetitivo, também constituem o DNA da heterocromatina e, por outro lado, nem todo DNA repetitivo está localizado na fração heterocromática, razões pelas quais os termos DNA repetitivo e heterocromatina constitutiva não devem ser considerados como equivalentes.

Um método para detectar-se citologicamente a heterocromatina constitutiva é o método da banda C (Pardue & Gall, 1970), onde acredita-se que haja uma remoção diferencial do DNA cromossômico e que as regiões heterocromáticas sejam mais resistentes a essa remoção (Comings, 1978).

Desde o início das pesquisas com cromossomos politênicos, Heitz (1934) já havia notado que a porção da cromatina total que é heterocromática é muito menor nos cromossomos politênicos do que nos mitóticos. Assim, no processo de politenização em Drosophila, a alfa-heterocromatina contendo DNA satélite não é politenizada (Rudkin, 1969; Gall *et alii*, 1971; revisão: Spear, 1977).

1.2.3 O aumento de conteúdo de DNA e alterações em estrutura cromatínica nas células tróficas de dípteros

Diversos autores já trataram da questão do aumento de DNA nas células tróficas de dípteros (Hertwig, 1935; Bauer, 1938; Painter & Reindorp, 1939; Hsu & Hansen, 1953; Schultz, 1956; Bier, 1957; Brun & Chevassu, 1958; Beattie & Cheney, 1979).

Após as primeiras constatações da ocorrência de alterações morfológicas nucleares nas células tróficas de dípteros (Hertwig, 1935; Bauer, 1938), os estudos que se seguiram tentavam explicar o fenômeno, baseando-se cada qual nas interpretações próprias de cada autor. Pelo fato de Geitler (1937) já ter descrito o que chamou de endomitose, esta tornou-se o objeto mais constante das suas explicações (Painter & Reindorp, 1939; Bier, 1957; Jacob & Sirlin, 1959). Há que se considerar, porém, a influência que novas descobertas têm sobre a interpretação dos relatos subsequentes. É assim que tentamos entender o contexto em que ocorreu o uso daquele termo.

Geitler (1937) havia então descrito a endomitose em células de testículos de Hemiptera, quase ao mesmo tempo em que as

descrito originalmente por Geitler (1937), parece não ser de ampla ocorrência em insetos, muito embora, no dizer de Brodsky & Uryvaeva (1975) seja, na maioria dos casos de poliploidia, erroneamente utilizado para explicá-las.

As figuras, representando os núcleos endomitóticos, encontradas em vários trabalhos de Geitler (White, 1973), são muito diferentes de qualquer fenótipo observado nas células tróficas.

Alguns autores como Hsu & Hansen (1953) não aceitavam as alterações cromatínicas como consequência de endomitoses ou de duplicações do número de cromátides. Consideravam que o aumento do volume nuclear era devido ao aumento no comprimento dos cromossomos. Outros como Brun & Chevassu (1958) não aceitavam nem rejeitavam qualquer uma das duas explicações, arriscando até uma terceira: uma expansão do material cromatínico às custas do nucleoplasma.

Quanto ao detalhamento dedicado à parte morfológica do processo, Bier (1957), baseando-se nas descrições de Painter & Reindorp (1939), parece ter realizado o trabalho mais completo do que chamou de endomitose nas células tróficas. Mostrou, através de estudos volumétricos, que os cromossomos apresentam morfologia de politênicos típicos quando seu conteúdo Feulgen-DNA

é 16 C, desintegrando-se nas várias cromátides no ciclo de replicação seguinte (32 C).

Dentro da ordem Diptera os principais estudos referentes ao aumento do conteúdo de DNA nas células tróficas acham-se sumarizados na tabela I.

TABELA I

ESPÉCIE	CONTEÚDO FEULGEN-DNA OU PLOIDIA	MÉTODO QUANTITATIVO	AUTORES
<i>Drosophila melanogaster</i>	512 C	volume em corte histológico	Hertwig (1935)
<i>Drosophila melanogaster</i>	512 C	volume em corte histológico	Painter & Reindorp (1939)
<i>Drosophila melanogaster</i>	1024 C	microespectrofotometria	Schultz (1956)
<i>Drosophila melanogaster</i>	512 C	auto radiografia	Jacob & Sirlin (1959)
<i>Calliphora erythrocephala</i>	4096 C	volume em corte histológico	Bier (1957)
<i>Rhynchosciara angelae</i>	64 n	contagem após esmagamento	Basile (1966)
<i>Lucilia cuprina</i>	1024 C	microespectrofotometria de corte histológico	Beattie & Cheney (1979)

Os dados apresentados na tabela I, obtidos através de diferentes processos metodológicos, servem mais como valores indicativos dos que poderão ser encontrados dentro da ordem

Diptera, pois, como podemos notar, há algumas discordâncias nos valores, mesmo dentro da mesma espécie.

A nosso ver, a maior fonte de discrepância entre eles não é só a metodologia empregada, mas sim, o valor referencial adotado como diplóide. Para exemplificar melhor, tomaremos o caso de Jacob & Sirlin (1959). O valor considerado por eles como $2n$, foi o resultante de medições nas células epiteliais de folículos em fase 7 (segundo classificação de King *et alii*, 1956) que corresponderia à fase V de Avancini & Prado (1986). Ora, mesmo que Jacob & Sirlin (1959) tenham considerado a distribuição bimodal dos valores, interpretando-os como pré e pós período S do ciclo mitótico, portando $2C$ e $4C$, não podemos concordar quando dizem que estes núcleos não sofreram, posteriormente, qualquer mudança ou crescimento que indiquem que atinjam nível mais alto de ploidia.

Mahowald *et alii* (1979) encontraram que na fase 7 em Drosophila, os núcleos epiteliais são poliplóides, $4C$ e $8C$. Desta forma, sem se analisar o trabalho de Jacob & Sirlin (1959) como um todo, podemos deduzir que o valor final atingido nas células tróficas daquela espécie deveria ser $1024 C$ e não $512 C$ como os autores concluíram.

No caso de Beattie & Cheney (1979), eles não usaram qualquer

valor medido como referência, mas sim, o estimaram, baseados em dados bibliográficos de *Drosophila*. Consideraram que o menor valor medido para o núcleo de célula trófica, quando o folículo apresenta os 16 cistócitos na porção basal do germário, é 4 C.

Apesar de ter feito uma apresentação de maneira extremamente resumida, Schultz (1956) foi, na nossa opinião, quem chegou ao valor final de valores Feulgen-DNA de maneira mais sistematizada, pois medindo anáfases de células epiteliais, estabeleceu, assim, valores referenciais 2 C.

Vale a pena ressaltar que no final da década de 50, quando muito se pesquisou sobre os métodos que visavam o controle de alguns insetos-pragas, o conhecimento dos processos endorreplicativos e seus momentos de ocorrência no desenvolvimento das células tróficas eram de grande valia (revisão: La Chance *et alii*, 1968). Isto pode ser depreendido de alguns destes trabalhos, pois a produção de ovos era mais facilmente inibida se o tratamento por esterilizantes, químicos ou físicos, coincidia com o que erroneamente consideravam o pico da chamada endomitose, ou seja, com a presença de politênicos nas células tróficas. Antes ou depois deste momento, o mesmo efeito só era conseguido com doses bem maiores dos esterilizantes (Morgan & La Brecque, 1962; La Chance & Bruns, 1963; La Chance & Leverich, 1968).

Nesta última década, os pesquisadores têm reconhecido a importância das células tróficas no estudo da fisiologia cromossômica, desde que o grupo de R.C. King (King *et alii*, 1981) identificou mutantes "otu" (*ovarian tumour*) nos quais as unidades politênicas mantinham-se como tal, mesmo após as primeiras endorreplicações. Nestas células, chamadas pseudo-tróficas (*pseudo nurse cells*), produzem-se cromossomos politênicos com elaborada organização banda-interbanda, o que permite que elas sejam as mais adequadas para análises citológicas no inseto adulto (Sinha *et alii*, 1987).

Os estudos mais recentes sobre o conteúdo de DNA nas células tróficas, de algumas das espécies anteriormente estudadas, mostram que as replicações não são do genoma como um todo, ocorrendo sub-replicações significativas de algumas sequências. O DNA satélite parece ser o mais unanimemente relatado como sub-replicado (Renkawitz & Kunz, 1975; Renkawitz-Pohl & Kunz, 1975; Redfern, 1981; Hammond & Laird, 1985). Menos frequentemente descritas como sub-replicadas são as sequências codificadoras de histona e, por fim, com resultados bastante divergentes, que ora favorecem a hipótese da sub-replicação ora não, são descritas as sequências de rDNA (Renkawitz & Kunz, 1975; Jacobs-Lorena, 1980; Beckingham & Thompson, 1982; Hammond & Laird, 1985).

1.3 AS CÉLULAS FOLICULARES EPITELIAIS

As células foliculares constituintes do epitélio funcionam como elementos que podem facilitar ou impedir a passagem de precursores do vitelo presentes na hemolinfa. Durante a vitelogênese, espaços intercelulares são gerados por algum dos diversos processos ativos que permitem a passagem de grandes moléculas até à cortex do oócito, onde serão incorporados por endocitose. Com o final da vitelogênese esta permeação é encerrada pelo surgimento de zonas de oclusão entre as células foliculares (revisão: Telfer *et alii*, 1982).

Descobriu-se também que complexos juncionais de alta permeabilidade entre células foliculares e oócito possibilitam a incorporação de pequenos solutos hidrofílicos diretamente no ooplasma (revisão: Telfer *et alii*, 1982).

As células foliculares epiteliais têm como principal função sintetizadora descrita a produção da membrana vitelínica e das proteínas do córion (King & Vanoucek, 1960; King & Koch, 1963; revisões: de Wilde & de Loof, 1973; Huebner, 1984). Os genes de pelo menos 3 destas proteínas foram descritos como amplificados até 10 vezes em *Drosophila melanogaster* (Spradling & Mahowald, 1980). Antes que a amplificação ocorra, no entanto, as células foliculares desta espécie passam por 2 ciclos de endorreplificação.

Quando os genes coriônicos entram em funcionamento nos núcleos das células foliculares de Drosophila, os valores Feulgen-DNA aumentam ainda mais, mas não ocorrem duplicações exatas do conteúdo de DNA, indicação da sub-replicação de algumas partes do genoma (Mahowald *et alii*, 1979). Hammond & Laird (1985) determinaram por hibridização *in situ* que as sequências codificadoras de DNA satélite, histonas e rDNA são as responsáveis por esta sub-replicação.

Além dessa função sintetizadora considerada geral para vários insetos, as células foliculares foram descritas como locais importantes de síntese de proteínas de vitelo, pelo menos em Drosophila (Brennan *et alii*, 1982).

1.4 DIETA E OVOGÊNESE

O desenvolvimento dos folículos ovarianos estudado detalhadamente sob seus aspectos bioquímicos, ultraestruturais e citoquímicos, pode ser simplifiadamente dividido em duas etapas bem nítidas nos ovários meroísticos politróficos: a etapa pré-vitelogênica, quando não foi ainda iniciada deposição de vitelo no oócito e a etapa vitelogênica que se caracteriza pela deposição crescente de vitelo no oócito, até que seja totalmente preenchido o espaço delimitado pelo folículo. Em C. putoria estas

etapas são representadas respectivamente pelas fases I a III e IV a X (Avancini & Prado, 1986) (Figura 3). Este processo está, na maioria das espécies, sob a regulação do hormônio juvenil secretado pelos *corpora allata* e também sob a regulação de outros fatores, p.ex. a dieta e outros hormônios, que parecem variar bastante dependendo da biologia da espécie em consideração (Hagedorn & Kunkel, 1979; Schwartz *et alii*, 1985; Raabe, 1986).

Sem se pretender detalhar esta ampla variação existente quanto ao tipo de fatores reguladores, é possível fazer-se uma separação dos insetos, em dois grandes grupos, baseada num desses fatores, ou seja, a dieta ingerida pela fêmea adulta. Se a fêmea, recebendo nada mais do que uma dieta de manutenção, produzir ovos através da mobilização de recursos internos, a espécie é dita autógena (Baxter *et alii*, 1973). Se, por outro lado, os ovos só forem produzidos quando a dieta do inseto adulto fornecer os nutrientes necessários para tal produção, a espécie é dita anautógena (Spielman, 1971). *C. putoria* faz parte deste último grupo, pois, se não lhe for fornecido alimento proteico (fígado, carcaça), ela atinge no máximo a fase III de desenvolvimento ovariano, ou seja, não inicia vitelogênese (Avancini, 1988).

Desta forma, as modificações nucleares observadas durante uma ovogênese completa podem ser diferentes das que ocorrem quando a ovogênese é interrompida.

2. COLOCAÇÃO DO PROBLEMA E OBJETIVOS

Estudos iniciados há algum tempo com ovogênese de *C. putoria* (Avancini & Prado, 1986) mostraram haver alguns aspectos pertinentes ao assunto que mereciam melhor aprofundamento.

Já haviam sido observados nas células tróficas, durante uma fase bastante inicial do desenvolvimento ovariano, cromossomos que, morfológicamente, assemelhavam-se a politênicos. Estes, porém, após um curto período não eram mais notados (Avancini & Prado, 1986). A partir de então, tornava-se presente, nos núcleos em constante crescimento, um corpo fortemente corado após reação de Feulgen, que demonstrou-se ser heterocromático (Avancini & Mello, 1987).

Verificou-se também, que essa espécie de díptero, quando sob dieta de açúcar, não inicia vitelogenese (Avancini, 1988) e, assim, os núcleos das células tróficas não atingem grandes proporções.

Por outro lado, como foi apresentado na INTRODUÇÃO, percebemos que não existem estudos em Diptera que aliem um detalhamento morfológico das alterações por que passam os núcleos das células tróficas a um estudo quantitativo do conteúdo cromatínico desses núcleos durante esta evolução.

Assim, estudos que permitissem esclarecer certos pontos levantados sobre a ovogênese de *C. putoria* poderiam contribuir na compreensão de algumas questões básicas da Biologia, como a ocorrência e significado de politenia e poliploidia, bem como seus respectivos mecanismos de controle.

Sob outro aspecto, consideramos que o conhecimento das alterações cromatínicas/cromossômicas que ocorrem durante o desenvolvimento das células relacionadas à produção de ovos poderá servir, inclusive, de subsídio a futuros programas de controle dessa espécie.

Tendo esses objetivos em mente, pretendemos abordar com este trabalho os seguintes tópicos:

1. Verificar as mudanças morfológicas por que passa o material cromatínico das células tróficas do ovário de *Chrysomya putoria*, durante o seu desenvolvimento.

2. Confirmar, através da determinação de conteúdo de DNA, a presença de cromossomos politênicos em células tróficas de *C. putoria* em determinada fase da ovogênese.

3. Determinar, ao longo do desenvolvimento ovariano, como evoluem os valores Feulgen-DNA nos núcleos das células tróficas.

4. Sabendo-se que a partir da fase III há nas células tróficas a presença de um corpo heterocromático (Avancini & Mello, 1987), pretende-se também conhecer seu comportamento em termos de nível de replicação nas fases seguintes, em comparação com a respectiva eucromatina.

5. Busca-se conhecer o efeito de uma dieta aprroteica sobre as alterações nucleares das células tróficas.

6. Tendo em vista a estreita relação topográfica que existe entre células tróficas e células epiteliais, decidiu-se verificar o conteúdo Feulgen-DNA das células do epitélio folicular durante a ovogênese.

3 e 4

3. MATERIAIS

3.1 OBTENÇÃO DAS MOSCAS

As moscas utilizadas no trabalho foram de geração F1 a F3, obtidas de exemplares coletados no campus da UNICAMP em Campinas (SP). Foi realizada captura com puçá dos exemplares que sobrevoavam uma isca, que consistia de carcaças de ratos ou camundongos mortos há algum tempo, e que, portanto, apresentavam forte odor.

No laboratório a geração parental (P) era mantida em gaiolas com água, açúcar, além de fígado ou carne moída onde realizavam a postura de ovos.

3.2 CRIAÇÃO

3.2.1 Larvas

As larvas eram criadas em meio de cultura (Leal *et alii*, 1982) ou em carcaça. Os vidros com as larvas eram mantidos em estufa à temperatura de 27°C. Após cerca de 8 dias as larvas de terceiro estágio (L3) deixavam de se alimentar e iniciavam migração à procura de substrato, que podia ser serragem fina ou

areia , para empupar.

3.2.2 Adultos

As moscas utilizadas no trabalho eram mantidas em gaiolas de 30 x 30 x 40 cm confeccionadas com armação de ferro e cobertas por telas de *nylon*, permanecendo na sala de criação à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12/12 horas. A população nas gaiolas era formada por um número que variava de 200 a 400 moscas cuja emergência estava compreendida num período de 6 horas.

3.2.2.1 Dieta padrão

Os adultos eram alimentados com açúcar de cana refinado e água *ad libitum* e fígado bovino cru por cerca de 3 horas/dia.

3.2.2.2 Dieta de açúcar

Foram mantidas populações em gaiolas cuja alimentação consistia de açúcar refinado e água somente.

3.3 REMOÇÃO DOS OVARIOS

A intervalos que variaram de 4 a 12 horas, os dois ovários eram retirados das fêmeas anestesiadas previamente com éter sulfúrico e dissecadas em solução de NaCl 0,85% . Esses órgãos eram, então, submetidos aos diferentes procedimentos descritos em MÉTODOS.

4. MÉTODOS

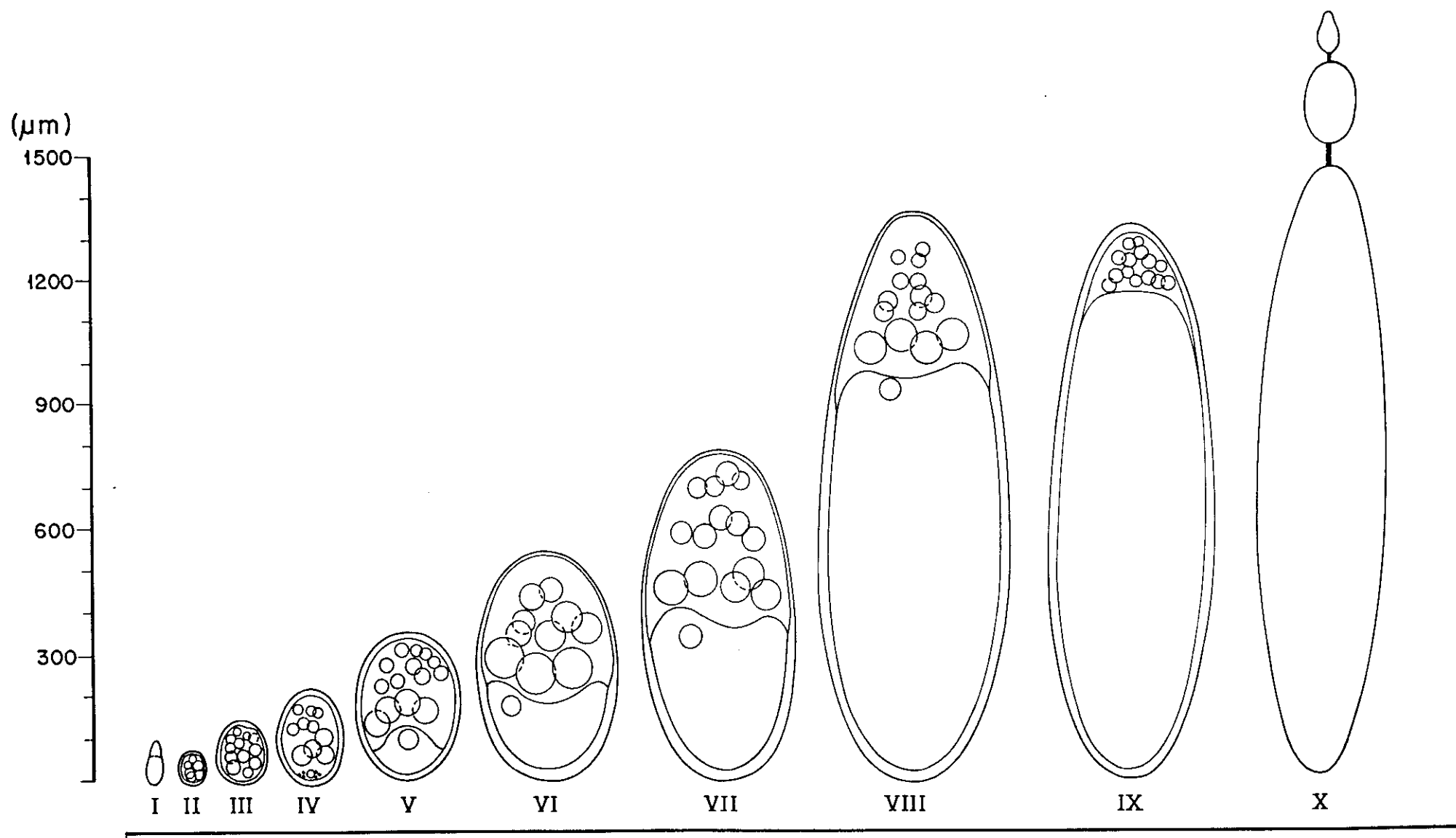
4.1 CLASSIFICAÇÃO DAS FASES DA OVOGENESE

Os folículos ovarianos submetidos às técnicas de preparação citológica foram previamente classificados de acordo com a descrição de Avancini & Prado (1986). Esta classificação, que consiste de 10 fases, foi baseada em várias alterações morfológicas que o folículo sofre ao longo do desenvolvimento ovariano. As 10 fases, ilustradas esquematicamente na Figura 3, estão resumidamente descritas abaixo:

- **Fase I:** os 16 cistócitos originados da oogônia estão localizados na porção inferior do germário piriforme, formando um cisto esférico, que, após ser envolvido pelo epitélio formado de uma única camada de células, separa-se do germário, dando origem a um folículo ovariano.

- **Fase II:** o folículo, completamente separado do germário pelo pedicelo interfolicular, é aproximadamente esférico, contendo o oócito na região basal e as 15 células tróficas, com tamanhos similares, distribuídas pelo restante do espaço folicular. Nessa fase são vistos cromossomos politênicos nas células tróficas.

FIGURA 3 — Esquema das 10 fases da ovogênese de Chrysomya putoria (Avancini & Prado, 1986) (não estão representadas todas as células tróficas).



FASES DA OVOGÊNESE

■ **Fase III:** o folículo aumenta bastante de tamanho, os núcleos das 15 células tróficas tornam-se mais separados entre si e observa-se nitidamente a distribuição polarizada deles: os maiores, mais próximos ao oócito e os menores, mais distantes, na região apical. As células do epitélio deixam de ter a forma cúbica para tornarem-se mais achatadas.

■ **Fase IV:** o folículo em crescimento torna-se ligeiramente elipsóide e grânulos de vitelo são vistos ao redor do oócito. O segundo folículo começa a se formar no germário.

■ **Fase V:** o folículo além de maior, torna-se mais elipsóide. A deposição do vitelo ocupa toda a porção basal do folículo.

■ **Fase VI:** o oócito, preenchido por vitelo, ocupa cerca de 1/3 do folículo. O epitélio ao redor do oócito torna-se colunar e ao redor da câmara trófica, mais achatado ainda do que estava em V.

■ **Fase VII:** o oócito ocupa cerca de 1/2 do folículo já bastante aumentado; ocorre uma migração posterior de células epiteliais, estabelecendo uma alta densidade ao redor do oócito e uma densidade bastante baixa ao redor da câmara trófica.

■ **Fase VIII:** o folículo, maior em comprimento, torna-se mais estreito, e o oócito ocupa cerca de 2/3 do folículo.

■ Fase IX: as células tróficas, em degeneração, ocupam somente um pequeno cone apical do folículo.

■ Fase X: o oócito atinge seu tamanho final e as células tróficas desaparecem. É um folículo maduro.

4.2 OBTENÇÃO DOS PREPARADOS CITOLÓGICOS

4.2.1. Preparo do material

Os ovários submetidos aos diferentes procedimentos metodológicos foram manipulados *in toto* ou preparados por esmagamento entre lâmina e lamínula, após fixação por 1 minuto em ácido acético a 45%. Nesse último caso, as lamínulas eram retiradas após congelamento e as lâminas, após secagem, eram guardadas ao abrigo de pó e luz.

4.2.1.1 Reação de Feulgen

Os ovários *in toto* foram fixados em solução de etanol absoluto e ácido acético glacial 3:1 por 1 minuto e lavados rapidamente em etanol a 70 % (2 minutos). Procedeu-se então à reação de Feulgen, em que a hidrólise se realizou em HCl 4N por

45 minutos a 25°C, baseando-se em testes preliminares onde se variou o tempo de hidrólise e se estudou a resposta à reação. A seguir o material foi tratado com reativo de Schiff, à temperatura ambiente por 40 minutos no escuro. Procedeu-se à lavagem do material em 3 banhos de água sulfurosa, 2 minutos cada banho. Em seguida, os ovários foram lavados em água destilada por 2 minutos, colocados sobre lâmina limpa, separando-se os ovariólos com ajuda de estiletes. Os ovariólos foram levemente esmagados entre lâmina e lamínula numa gota de ácido acético a 30%. As lamínulas foram retiradas após congelamento do material. Os esmagamentos foram então desidratados em série alcoólica (70%, 95%, 100%) por 1 minuto em cada banho, clarificados em xilol/álcool e xilol por 1 minuto em cada um e montadas em bálsamo natural. Após etiquetagem, as lâminas foram guardadas em caixas de madeira fechadas ao abrigo de luz e poeira.

4.2.2.2 Método de banda C (Sumner, 1972)

Inicialmente as lâminas contendo o material foram tratadas com uma solução de Ba(OH)_2 a 5% por 60 segundos e, a seguir, lavadas em água destilada. As lâminas foram, então, incubadas em banho maria em solução de 2SSC (NaCl 0,3M + citrato de sódio 0,03M) a 60°C por 3 horas ou, numa modificação do método, por 1

hora e 30 minutos. Após lavagem em água destilada, foram 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.

4.3 ANALISE MORFOLOGICA

As lâminas foram examinadas ao fotomicroscópio Zeiss e os fenótipos nucleares mais típicos foram fotografados com filme Kodak Plus-X Pan.

4.4 MICROESPECTROFOTOMETRIA

Os valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias foram determinados para no mínimo 2 fêmeas por fase de desenvolvimento ovariano.

Os núcleos medidos foram os de maior diâmetro dentro de cada folículo, isto é, os mais próximos ao oócito. Quando se quis verificar a relação entre o maior e o menor valor de algumas fases foram feitas também medições do núcleo mais apical e, portanto de menor diâmetro. O número de núcleos medidos variou

conforme sua disponibilidade em atender condições básicas para medida.

As células epiteliais foram escolhidas ao acaso e após a fase VI os valores foram separados entre os daquelas que envolviam a câmara trófica e os das células que envolviam o oócito.

A análise microespectrofométrica foi toda realizada com equipamento Zeiss. Para o caso das células epiteliais e para as células tróficas até fase II fez-se uso de um microespectrofotômetro de varredura automática acoplado a microcomputador tipo PC e impressora Grafix 100. A interface foi construída pela Imo-Informática e o programa utilizado foi desenvolvido por Linus Vidal. Nessa situação, as condições operacionais foram as seguintes: objetiva Planapo 100/1.25, optovar 2, diâmetro do diafragma de medida = 0.1 mm, diâmetro do diafragma de campo = 0.2 mm, condensador LD-Epiplan 16/0.30, passo de varredura = 0.5 μ m x 0.5 μ m. As medidas foram realizadas em $\lambda = 580$ nm, obtido com uma régua monocromadora Schott, e escolhido após teste preliminar que mostrou ser este o λ que permitia obter valores mais elevados de absorbância. Isto era desejável no caso do material em estudo, visto que tal escolha não induzia aparecimento de absorbâncias ao redor de 1.5, não havendo, portando, afastamento da lei de Beer (erro

sistemático) (Ewing, 1969).

O movimento de varredura foi predominantemente monodirecional. Os pontos que apresentavam absorbâncias menores que 0.020 foram considerados *background* e automaticamente removidos da imagem nuclear. Os valores Feulgen-DNA nucleares consistiam da absorbância total integrada, computada ponto por ponto.

Dado o tamanho dos núcleos, os valores Feulgen-DNA, para as células tróficas de fase III a IX, não puderam ser determinados com o microespectrofotômetro de varredura automática, uma vez que o programa do seu computador não era compatível com tal execução. Assim esses valores foram obtidos através de outro equipamento, medindo-se as absorbâncias com o método de múltiplos *plugs* (varredura manual) e multiplicando-se a sua média pelo valor da área nuclear. As absorbâncias foram, portanto, obtidas em microespectrofotômetro Zeiss equipado com fotômetro 01, fotomultiplicador EMI 6256, objetiva 40/0.65, optovar 2, diâmetro do diafragma de medida = 0.16 mm, diâmetro do diafragma de campo = 0.1 mm, condensador LD- Epiplan 16/0.30 e $\lambda = 580$ nm, obtido com régua monocromadora Schott. As áreas foram determinadas com o uso de ocular milimetrada, considerando-se A e B os dois eixos nucleares principais,

perpendiculares entre si e aplicando-se a fórmula: $S = \pi \left(\frac{A+B}{4} \right)^2$ (Mello & Vidal, 1980).

Para que o estabelecimento de classes de duplicação dos valores Feulgen-DNA além da fase II fosse comparável ao das classes das fases I a II, determinaram-se valores Feulgen-DNA para uma subfase final da própria fase II também com o método de múltiplos *plugs*, comparando-os com os obtidos com o microspectrofotômetro de varredura automática.

4.5 APRESENTAÇÃO DOS DADOS QUANTITATIVOS

Os valores Feulgen-DNA e de área nuclear foram plotados como histogramas de frequência (Mosteller *et alii*, 1983) distribuídos numa escala de valores em progressão geométrica, como preconizado por diversos autores, inclusive Bucher & Horisberger (1950), Valeri (1960), Ferreira e colaboradores (1967), Palkóvits & Fischer (1968), Mello (1971), Mello & Takahashi (1971) e Mello & Vidal (1980). As células epiteliais de menor tamanho na fase I foram consideradas o controle 2 C.

Os dados foram analisados graficamente através do uso de diagrama de blocos de Tukey (Tukey, 1977; Chambers *et alii*, 1983). Nesses diagramas, o primeiro traço horizontal inferior de

cada um dos blocos representa o *quartil inferior*, ou seja, que 25% dos valores medidos, estão abaixo daquele valor e 75%, acima dele. O segundo traço horizontal é a *mediana* e o terceiro traço representa o *quartil superior*, indicando que 25% dos valores medidos estão acima daquele valor e 75%, abaixo dele. Assim, 50% dos valores estão compreendidos dentro dos limites do bloco. As linhas verticais estendem-se dos finais dos blocos aos *valores adjacentes* que são definidos como se segue. Primeiramente, explica-se o que é a *diferença interquartílica*. Ela é calculada subtraindo-se o valor do quartil inferior do valor do quartil superior. O *valor adjacente superior* é definido como a maior observação que seja menor ou igual ao quartil superior mais uma diferença interquartílica e meia. O *valor adjacente inferior* é definido como sendo a menor observação que é maior ou igual ao quartil inferior mais uma diferença interquartílica e meia. Os comprimentos das linhas verticais que saem dos blocos mostram quão estendidas são as caudas das distribuições. Se algum valor cai fora do intervalo entre os 2 valores adjacentes é chamado *ponto desgarrado* e foi representado nos diagramas por um quadradinho escuro (Chambers *et alii*, 1983; Mosteller *et alii*, 1983).

Evidentemente, que quanto mais curto o bloco e as linhas verticais, menor dispersão ocorreu dos valores referentes àquela fase. Esses diagramas permitem, ainda que parcialmente,

uma avaliação da simetria nas distribuições. Se a distribuição é simétrica então o bloco é simétrico em relação à mediana (Chambers *et alii*, 1983).

Tais análises bem como a confecção de gráficos tridimensionais foram feitos em microcomputador compatível com IBM PC/XT através do programa STATGRAPHICS, da STCS, Inc., 1985 (Maryland, USA) e impressos em impressora EPSON LX-800.

Na apresentação dos resultados referentes à heterocromatina foram utilizadas dois parâmetros: Ah% (Vidal, 1984), que expressa a relação percentual entre a área ocupada pela heterocromatina e a área ocupada pela cromatina corada total:

$$\text{Ah\%} = \frac{\text{área coberta por heterocromatina} \times 100}{\text{área coberta por cromatina total}}$$

e Abh%, que expressa a relação percentual entre os valores Feulgen-DNA da heterocromatina e os valores Feulgen-DNA da cromatina corada total:

$$\text{Abh\%} = \frac{\text{valores Feulgen-DNA da heterocromatina} \times 100}{\text{valores Feulgen-DNA da cromatina total}}$$

5

5. RESULTADOS

5.1 CÉLULAS TROFICAS

5.1.1 Fenótipos nucleares

5.1.1.1 Alterações ao longo do desenvolvimento

Estes resultados foram obtidos através da observação de ovários submetidos à reação de Feulgen.

Na fase I (Figura 4), quando as células tróficas tornam-se reconhecíveis como tal, o material cromatínico encontra-se bastante espalhado, com aparência interfásica. Assim que o folículo separa-se do germário (Figura 5), na fase II portanto, a cromatina inicia um processo de organização em cromossomos identificáveis como unidades distintas.

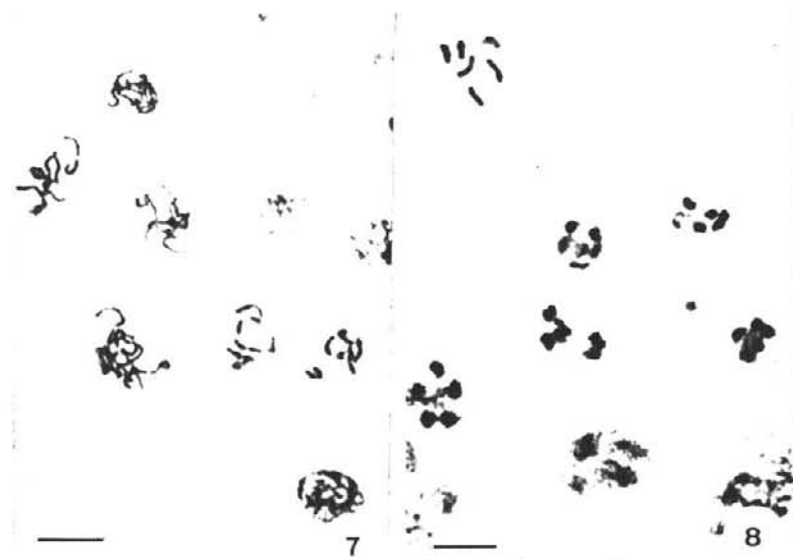
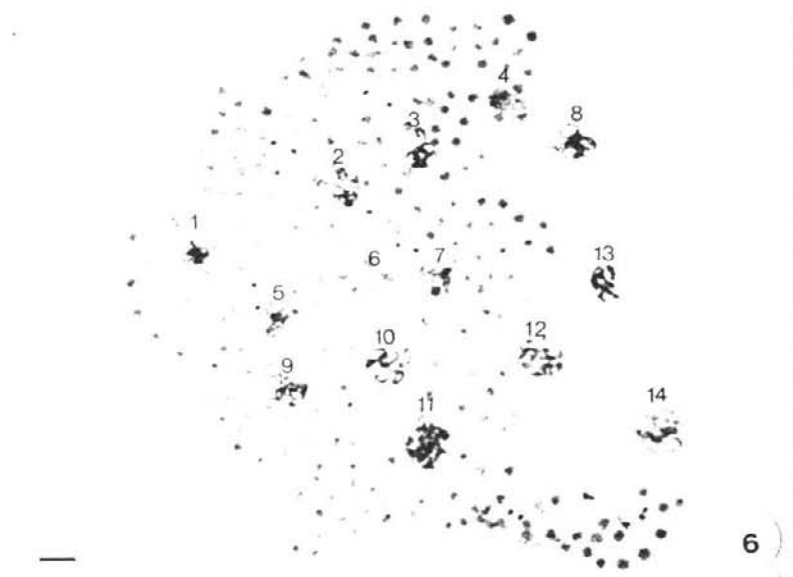
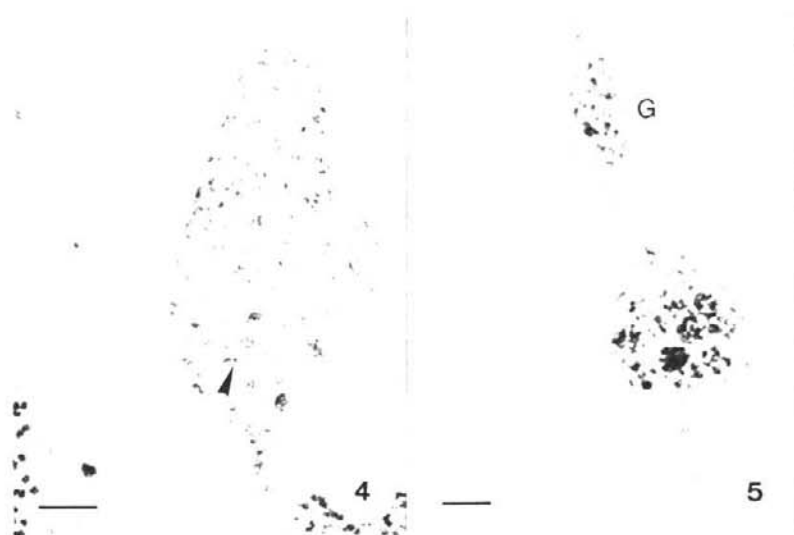
Durante a fase II foram observadas grandes modificações quanto à organização do material cromatínico (Figuras 6,7 e 8). Para melhor descrever estas modificações, elas foram referidas, nesse trabalho, como sub-fases da fase II, numeradas de 1 a 8 (Figuras 9 a 16).

Na sub-fase 1 a cromatina começa a se reorganizar, levando o

FIGURAS 4 a 8

Folículos ovarianos submetidos à reação de Feulgen. Barra = 20 μ m.

- 4. Fase I, sem esmagamento. Seta: núcleo de célula trófica.*
- 5. Fase II, sem esmagamento. Núcleos das células tróficas com cromossomos politênicos.
G = germário.*
- 6. Fase II, após esmagamento. São vistos 14 dos 15 núcleos das células tróficas, em 3 sub-fases diferentes.*
- 7. Fase II. Detalhe de folículo com núcleos de células tróficas em sub-fases mais iniciais (1 a 3).*
- 8. Fase II. Detalhe de folículo com núcleos de células tróficas em sub-fases mais avançadas (4 a 7).*



FIGURAS 9 a 16 — Núcleos de células tróficas de folículos em fase II, submetidos à reação de Feulgen. Sub-fases 1 a 8. O cromossomo X está indicado pela seta (10 a 14) e o corpo heterocromático indicado por seta maior (15 e 16). Barra = 10 μ m.

- 9. Sub-fase 1
- 10. Sub-fase 2
- 11. Sub-fase 3
- 12. Sub-fase 4
- 13. Sub-fase 5
- 14. Sub-fase 6
- 15. Sub-fase 7
- 16. Sub-fase 8



9



10



11



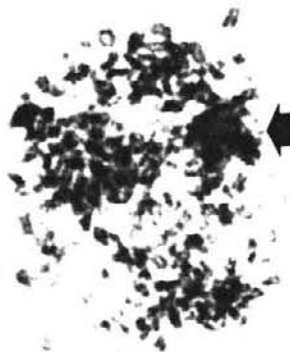
12



13



14



15



16

material cromatínico a se apresentar sob a forma de filamentos longos, emaranhados uns sobre os outros, de maneira que as unidades cromossômicas ainda não podem ser claramente percebidas (Figura 9). Na sub-fase 2, é nítida a alternância de regiões mais coradas com outras menos coradas ao longo de toda a extensão dos cromossomos, os quais nessa fase já se tornaram bem individualizados. Pelo fato de se observar somente 6 unidades cromossômicas, quando se sabe que nessa espécie $2n=12$, deduz-se que os homólogos estejam pareados (Figura 10). Na sub-fase 3, pode-se verificar a presença das unidades cromossômicas mais encurtadas, mostrando ainda regiões mais claras alternadas com regiões mais escuras (Figura 11). Em alguns casos, são observadas regiões de desapareamento de homólogos (Figura 29). Na sub-fase 4, os cromossomos encontram-se bastante encurtados, praticamente não se visualizando mais a alternância de regiões mencionada para as sub-fases 2 e 3 (Figura 12). Na sub-fase 5, quando visualmente parecem ter atingido o seu máximo de encurtamento, os cromossomos estão todos praticamente do mesmo tamanho (Figura 13). Na sub-fase 6, alguns filamentos começam a se protrair do agrupamento, do que resulta a aparência de áster do conjunto (Figura 14). Na sub-fase 7, um grande número de unidades bastante pequenas, resultantes da dissociação do conjunto cromossômico visto na sub-fase anterior, são vistas dispersas por todo o núcleo (Figura 15). Na sub-fase 8, todo o espaço nuclear é preenchido pelo material cromatínico, que retorna a uma aparência

semelhante à interfásica. Apenas um ponto fortemente corado, que trabalho anterior mostrou ser formado por heterocromatina constitutiva (Avancini & Mello, 1987), destaca-se nessa estrutura reticular do núcleo (Figura 16).

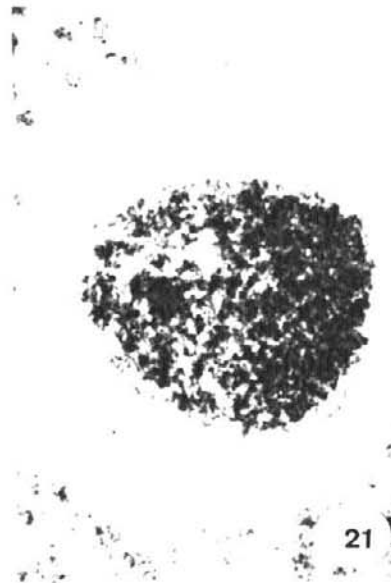
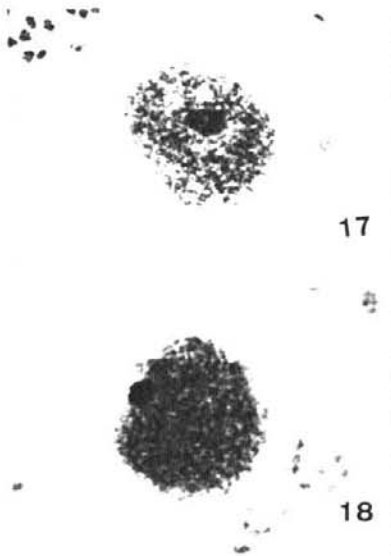
A partir daí (fase III), até fase VIII, a aparência dos núcleos será semelhante à da sub-fase 8, apresentando, porém, variações principalmente quanto ao tamanho dos núcleos (Figuras 17 a 22). Nas fases IV e V o material cromatínico está mais homogeneamente distribuído pelo núcleo, enquanto de VI em diante há o aparecimento nesse material de regiões mais condensadas e outras menos (Figuras 24 e 25). Talvez possam representar, embora de maneira incipiente, a organização do que Bier (1957) chamou de *politênicos secundários*, mas que, dado o seu diâmetro, sejam, no presente caso, mais apropriadamente chamadas de fibrilas oligotênicas. Na fase IX, aparentemente, a cromatina se compacta e o próprio contorno nuclear torna-se irregular (Figura 23).

5.1.1.2. O cromossomo X na fase II

O cromossomo X é descrito como o menor dentre os 6 cromossomos de fêmeas de *C. putoria* (Azeredo-Espin & Pavan, 1983). Devido à ocorrência de grande encurtamento dos cromossomos descrita no sub-item 5.1.1.1, torna-se difícil distinguí-los

**FIGURAS 17 a 23 — Núcleos de células tróficas
proximais de folículos em fase de desenvolvimento
de III a IX. O ponto mais fortemente corado em cada
um deles é o corpo heterocromático (reação de
Feulgen). Barra = 10 μ m.**

- 17. Fase III
- 18. Fase IV
- 19. Fase V
- 20. Fase VI
- 21. Fase VII
- 22. Fase VIII
- 23. Fase IX



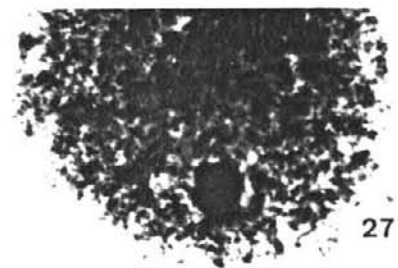
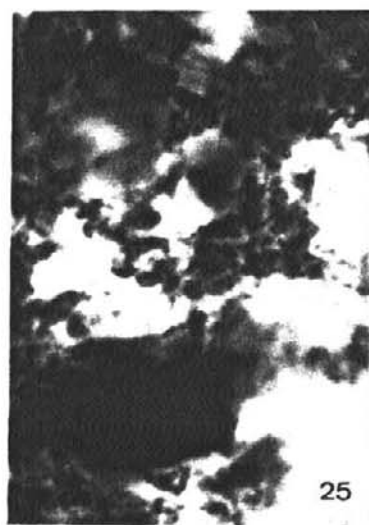
FIGURAS 24 e 25 — Detalhes de núcleos de células tróficas de folículo em fase VII e VIII. Observar regiões onde estariam presentes fibrilas oligotênicas (reação de Feulgen).
Barra = 10 μ m.

- 24. Fase VII
- 25. Fase VIII

FIGURAS 26 a 28 — Núcleos de células proximais de folículo em fase VIII (Reação de Feulgen)

- 26. Dois núcleos apresentando coloração com intensidades diferentes (reação de Feulgen).
Barra = 25 μ m.

- 27 e 28. Os mesmos núcleos em maior aumento.
Barra = 10 μ m.



através de seus comprimentos relativos, motivo pelo qual valemo-nos de uma outra característica do cromossomo X para identificá-lo. Para tal, utilizamo-nos da técnica da banda C, pois sabe-se que o cromossomo X é parcialmente heterocromático (Ullerich, 1976).

Assim, pudemos observar nas sub-fases 4 e 5 (Figuras 12 e 13) que, embora os cromossomos estejam bastante compactados, é o cromossomo X que apresenta-se com aparência frouxa em parte de sua extensão. A técnica de Banda C, permitiu-nos evidenciar que a porção descondensada do cromossomo X não é a heterocromática (Figuras 31, 32 e 33). A parte heterocromática, por sua vez, permanece bastante compactada durante as sub-fases 4 e 5 e, mesmo na sub-fase 6, quando os demais cromossomos estão sendo dissociados em pequenas e numerosas unidades. Desta forma, o ponto mais fortemente corado nos núcleos da sub-fase 7 seria a região heterocromática do cromossomo X (Figura 15). A partir daí, como já foi descrito, um corpo heterocromático, que pode às vezes apresentar-se subdivido, permanecerá visível no núcleo até à fase VIII.

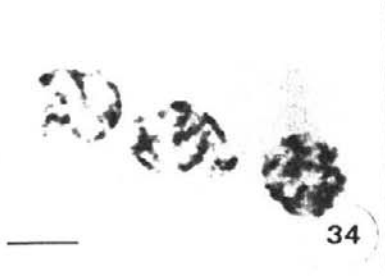
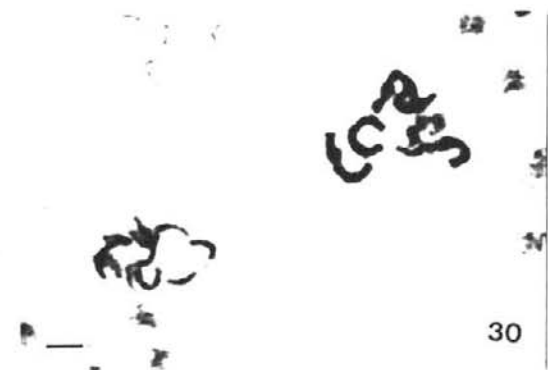
Não se pôde determinar, se para a formação desse corpo, após sub-fases 7 e 8, concorre somente a heterocromatina dos cromossomos X ou se concorrem também as heterocromatinas centroméricas dos autossomos, as quais respondem positivamente ao

FIGURAS 29 e 30 — Núcleos de células tróficas de folículos em fase II submetidos à reação de Feulgen. Barra = 10 μ m.

- 29. Cromossomos politênicos com regiões de desapareamento (setas).
- 30. Cromossomos politênicos com espessuras diferentes, pertencentes a dois núcleos do mesmo folículo.

FIGURAS 31 a 33 — Núcleos de células tróficas de folículo em fase II submetidos ao método de Banda C. O cromossomo X apresenta descompactação precoce, mas a porção heterocromática permanece compactada (seta). A região heterocromática centromérica de alguns autossomos aparece também marcada pelo método de banda C. Barra = 10 μ m.

FIGURAS 34 e 35 — Cromossomos politênicos observados em células tróficas de fêmeas submetidas a dieta de açúcar (reação de Feulgen). Barra = 10 μ m.



método de banda C. No entanto, até àquele momento as figuras deixam bastante clara a gênese do ponto heterocromático.

A descompactação parcial do X poderá futuramente ser melhor estudada tendo em vista a fisiologia daquela região cromossômica.

5.1.1.3 Dieta de açúcar e cromossomos politênicos

Na população submetida à dieta de açúcar foram encontradas fêmeas que, permanecendo na fase II do desenvolvimento ovariano, apresentavam cromossomos individualizados, semelhantes aos da sub-fase 3, nas células tróficas. Estes, de duração bastante curta (das 40 às 70 horas de vida imaginal) na população submetida à dieta padrão, foram encontrados em fêmeas com até cerca de 30 dias sob dieta de açúcar.

A aparência dos cromossomos é visivelmente diferente, com filamentos saindo do eixo principal do cromossomo (Figuras 34 e 35).

5.1.2 Conteúdo Feulgen-DNA e áreas cobertas por cromatina

5.1.2.1 Alterações ao longo do desenvolvimento

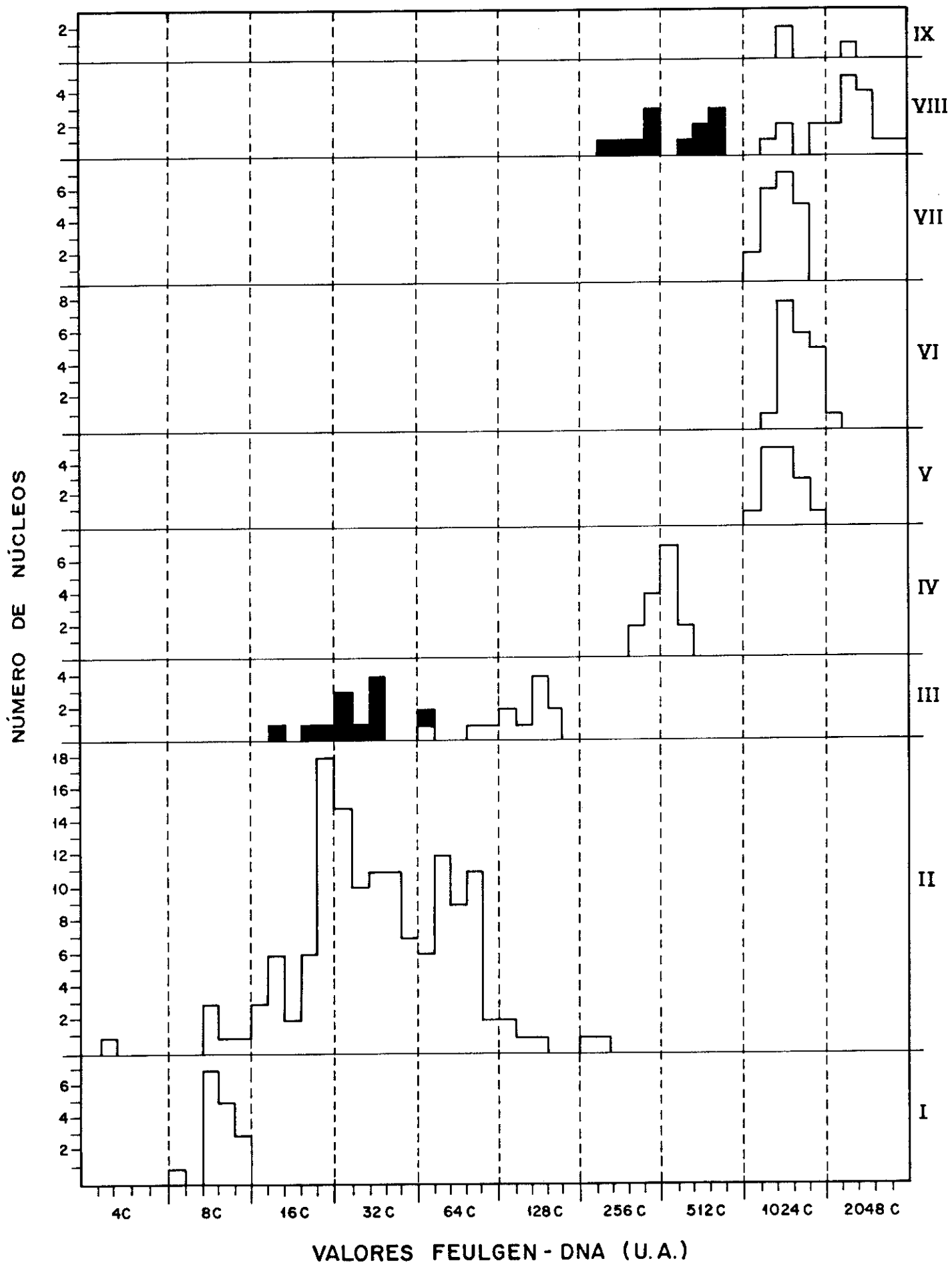
Os valores Feulgen-DNA obtidos para as células tróficas nas 9 fases da ovogênese onde tais células estão presentes acham-se plotados na Figura 36.

Como já referido em MÉTODOS, foram medidos, no mínimo 12 núcleos de cada fase, pertencentes a folículos diferentes de pelo menos 2 indivíduos. Na fase II a amostra é maior do que a das demais fases, pois foram, dentro da mesma, discriminadas morfologicamente as suas 8 sub-fases. Os valores Feulgen-DNA referentes a cada uma das sub-fases serão objeto de consideração mais adiante, em item subsequente (5.1.2.2)

Na fase IX aparecem representados somente 3 valores, pois os demais atingiram níveis de absorbância que excediam o limite de viabilidade de sua consideração.

Nas fases III e VIII aparece um segundo grupo de valores, representado por quadrados preenchidos, que correspondem às medidas realizadas nos menores núcleos de cada folículo, ou seja, nos mais distais. Este procedimento teve como objetivo mostrar a ocorrência de endorreplificações não sincronizadas em todos os núcleos do folículo. Com isto pode-se evidenciar que, tanto no que se pensava ser o início da polarização dos núcleos (fase III), como na fase final da atividade das células tróficas (fase VIII), os valores Feulgen-DNA dos menores núcleos mantêm-se

FIGURA 36 — Histogramas de frequências dos valores Feulgen-DNA, em unidades arbitrárias, dos núcleos das células tróficas proximais de folículos em 9 fases (I a IX) do desenvolvimento ovariano. Nas fases III e VIII estão também representados os valores dos núcleos distais do folículo (área preenchida). Os intervalos de duplicação foram calculados com base nos menores valores das células epiteliais, considerados 2 C (Figura 46).



sempre abaixo daqueles dos núcleos maiores.

Com exceção de um único valor de fase II que ocorre na classe 4 C, nota-se que as células tróficas quando começam a ser identificadas como tal, isto é, quando já ocupam a posição basal do germário, são células com conteúdo de DNA superior ao valor diplóide, ou seja, pelo menos 8 C.

Durante a fase II ocorre o maior número de duplicações deste conteúdo. Ao final desta fase, isto é, nas sub-fases 7 e 8 (Figura 41) os valores atingem os mesmos níveis dos da fase III.

No início da vitelogênese (Fase IV) os núcleos já passaram por 7 ou 8 duplicações de conteúdo Feulgen-DNA, já que seus valores ocupam as classes 256 C e 512 C (Figura 36).

Após os valores terem atingido a classe 1024 C, na fase V, não mais ocorrem replicações de DNA, até que seja atingida a fase VIII. Nessa fase são alcançados os valores Feulgen-DNA máximos, que ocupam a classe 2048 C (Figura 36). Na fase seguinte, IX, quando ocorre a degeneração das células tróficas (Figura 23) é visível a compactação do material cromatínico corado, tornando-se, inclusive, difícil perceber a região ocupada pela heterocromatina.

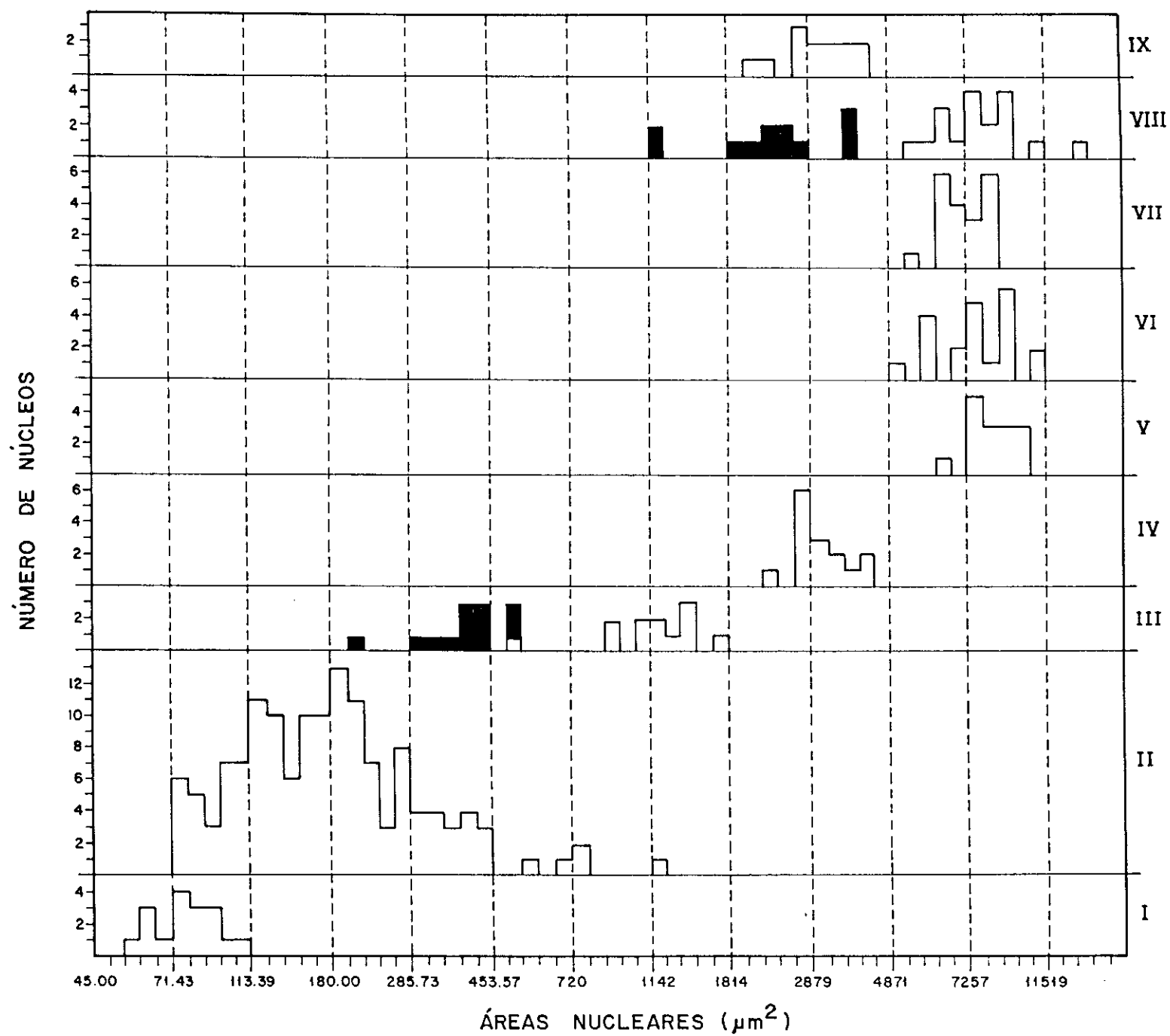
Desta forma, as células tróficas de *C. putoria*, partindo de valores 8 C na fase I, atingem valores equivalentes ao nível 2048 C de ploidia na fase VIII de desenvolvimento ovariano. Sabendo-se de sua origem como célula irmã do oócito, portanto, com conteúdo 2 C, e mais ainda, pela comparação feita com os valores Feulgen-DNA das células epiteliais, considera-se que, durante todo o seu desenvolvimento, ocorreram 10 duplicações do conteúdo Feulgen-DNA.

As áreas nucleares das células tróficas, desde fase I até fase IX da ovogênese, correspondentes aos valores Feulgen-DNA foram plotadas segundo histogramas de frequência na Figura 37.

De modo geral, para as 10 duplicações do conteúdo Feulgen-DNA nas células tróficas de *C. putoria* ocorreram, correspondentemente, pelo menos 12 duplicações de volume nuclear, ou 15, se for levado em consideração o intervalo de menores valores de área (volume) das células epiteliais (Figura 47).

Na fase V (Figura 37), os valores máximos de área nuclear já foram alcançados, permanecendo neste patamar até fase VIII, quando, então, declinam por retração nuclear. Assim, embora os núcleos atinjam seus valores máximos de área logo após o início da vitelogênese, o seu crescimento mais expressivo ocorre na

FIGURA 37 — Histogramas de frequências dos valores de área nuclear, em μm^2 , dos núcleos das células tróficas proximais de folículos em 9 fases (I a IX)do desenvolvimento ovariano. Nas fases III e VIII estão também representados os valores dos núcleos das células tróficas distais do folículo (área preenchida). As linhas verticais representam as duplicações sucessivas que ocorrem correspondentemente nos volumes dos núcleos (Palkovits & Fisher, 1968)



etapa pré-vitelogênica (até fase III).

Os diagramas de blocos apresentados a seguir (Figuras 38 e 39) auxiliam, através da análise gráfica, a compreensão da distribuição dos valores de área nuclear e Feulgen-DNA representados nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

A maior parte dos blocos apresenta distribuição assimétrica, indicando haver maior dispersão nos valores acima ou abaixo da mediana, dependendo do caso.

Em ambos os diagramas, a escala utilizada no eixo das ordenadas foi escolhida de forma a comportar os valores medidos em todas as fases. No entanto, devido à compressão sofrida pelos valores das fases I a IV, que poderia levar a interpretações incorretas de suas distribuições, ampliou-se este trecho (representado por área sombreada) ao lado de cada diagrama.

No gráfico referente aos valores Feulgen-DNA (Figura 38), percebe-se claramente os valores crescentes até fase V, com estabilização até VII e posterior aumento em VIII. A pequena amostra de valores na fase IX não permite descrever, na realidade, uma diminuição, pois a dispersão deles é ampla, impossibilitando perceber uma tendência de aumento, diminuição ou estabilização.

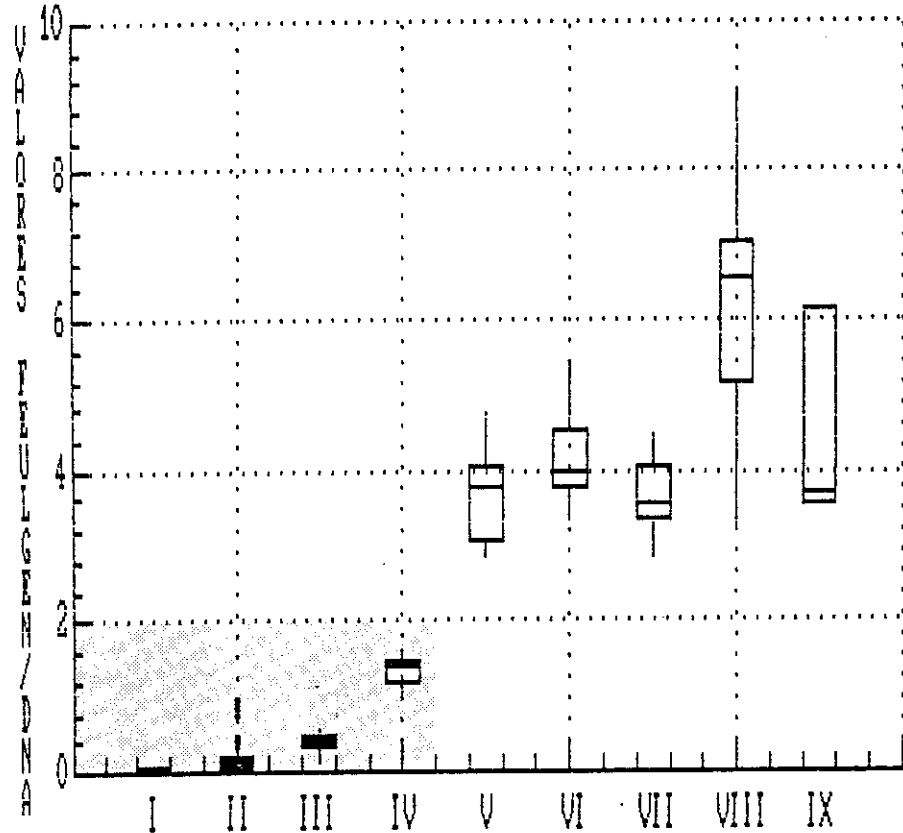
FIGURA 38 — Diagrama de blocos representando a distribuição dos valores Feulgen-DNA, em unidades arbitrárias, para os núcleos das células tróficas proximais, dentro de cada fase da ovogênese (I a IX).

FIGURA 39 — Diagrama de blocos representando a distribuição dos valores de área nuclear, em μm^2 , para os núcleos das células tróficas proximais, dentro de cada fase da ovogênese (I a IX).

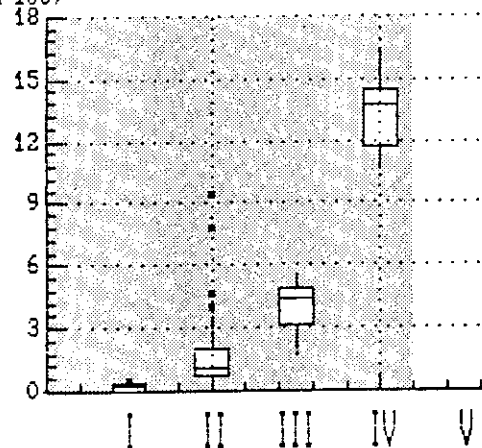
O primeiro traço horizontal inferior de cada bloco representa o quartil inferior, ou seja, que 25% dos valores medidos dentro daquela fase estão abaixo dele e 75%, acima dele. O segundo traço é a mediana, e o terceiro traço horizontal, representa o quartil superior, indicando que 25% dos valores medidos estão acima daquele valor e 75%, abaixo dele.

Ao lado de cada um dos diagramas representativo das fases de I a IX, foi feita uma ampliação da região correspondente às fases de I a IV (área escurecida), para uma melhor discriminação dos seus valores.

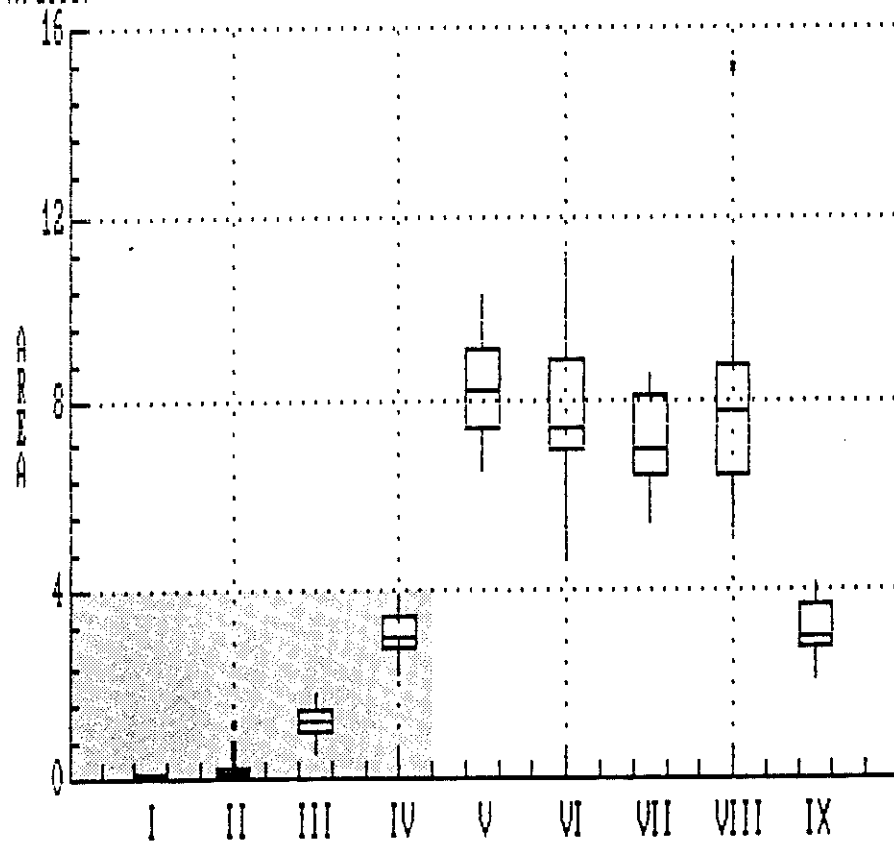
(X 1000)



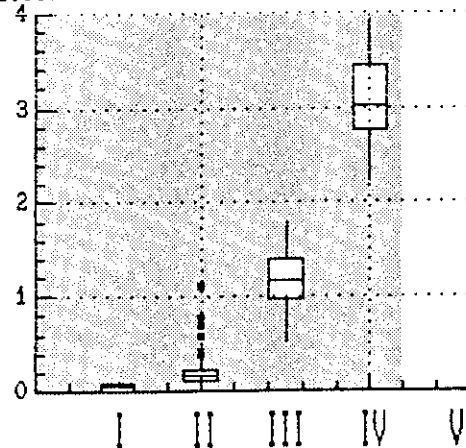
(X 100)



(X 1000)



(X 1000)



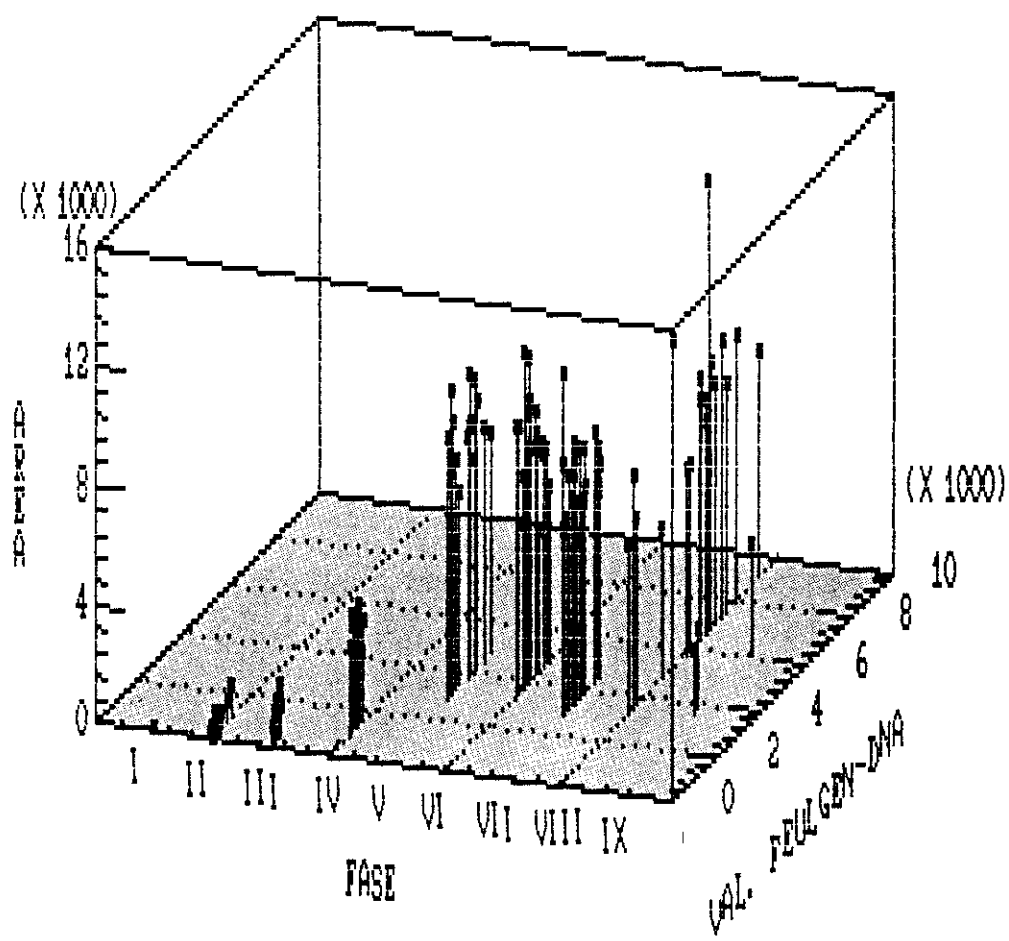
Fase

A amplitude dos valores da fase VIII é grande, sem porém apresentar pontos desgarrados. Esta ampla variação dos valores encontrados para algumas fases, pode, no caso da fase VIII, ser melhor explicada pelas Figuras 26, 27 e 28. Nelas é possível observar dois núcleos proximais ao oócito, de um mesmo folículo, com diferente intensidade de coloração, que, quando medidos, resultaram valores Feulgen-DNA bastante distintos.

No diagrama de blocos relativo à distribuição dos valores de área pelas diferentes fases (Figura 39) é nítido o crescimento dos mesmos até fase V, quando se estabilizam até fase VIII com posterior declínio em IX. Para a fase IX, neste caso, como a amostra é maior, é possível perceber-se que há um declínio real, chegando a níveis de valores de áreas comparáveis aos existentes na fase IV (comparar Figuras 17 e 23).

Um gráfico tridimensional (Figura 40) ilustra de maneira mais abrangente a relação entre as 3 variáveis: 1) Fase (X), 2) Valores Feulgen-DNA (Y) e 3) Área nuclear (Z). Com a progressão das fases, aumentam os valores de área e DNA. Como no caso da fase IX, somente 3 núcleos apresentam as 3 variáveis, somente eles foram plotados nesse gráfico.

FIGURA 40 — Diagrama tridimensional : 1) no eixo X, fases da ovogênese (I a IX); 2) no eixo Y, valores Feulgen-DNA, em unidades arbitrárias; 3) no eixo Z, áreas nucleares, em μm^2 .



5.1.2.2 Alterações durante a fase II

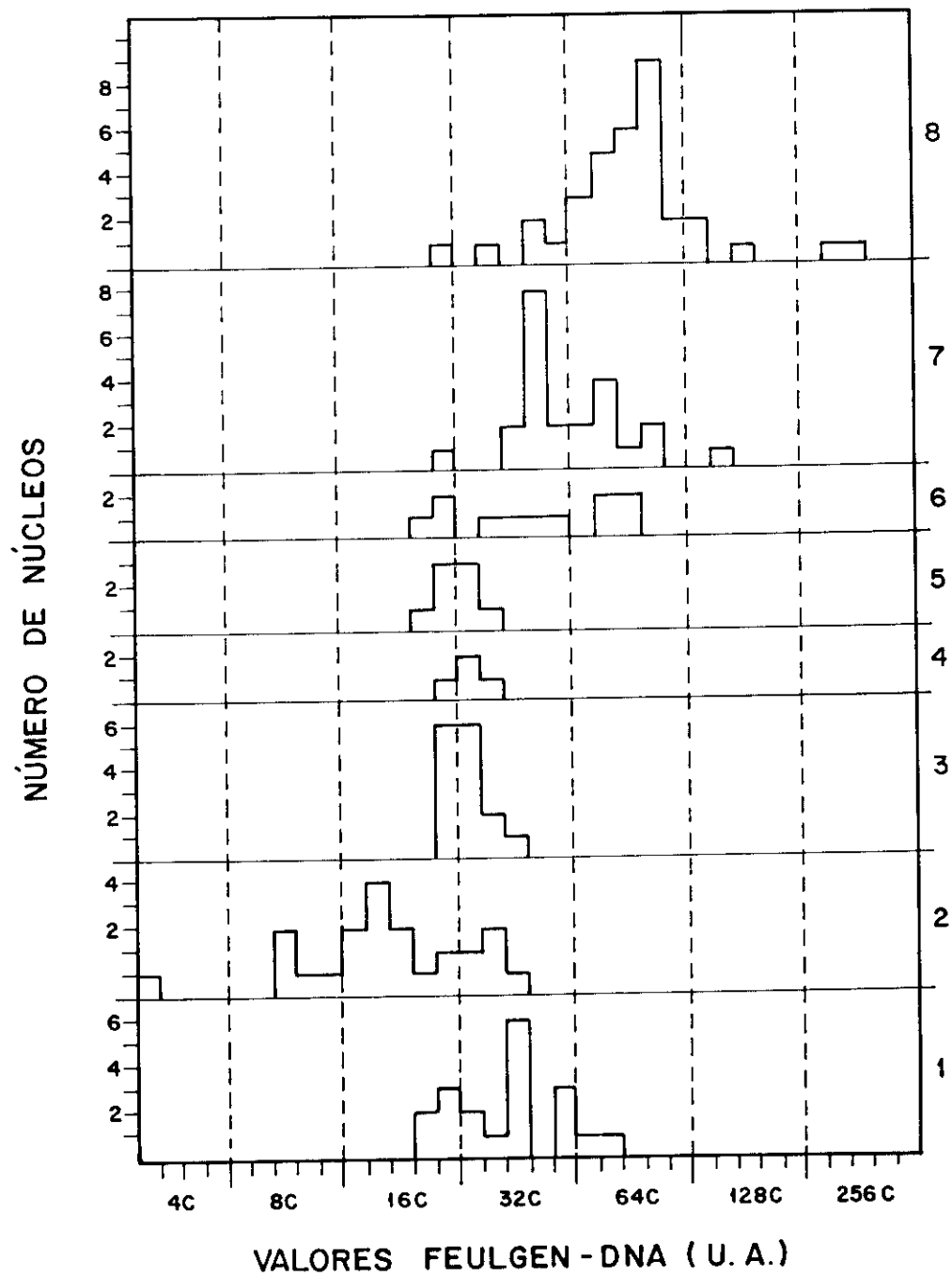
Na Figura 41 foram plotados os histogramas de frequência referentes aos valores Feulgen-DNA para as diferentes sub-fases da fase II, discriminadas conforme descrições das Figuras 9 a 16, item 5.1.1.1 .

As classes 16 C e 32 C ocorreram simultaneamente em todas as sub-fases, sendo que, somente a partir da sub-fase 6 é que a classe seguinte , 64 C, tornou-se mais representativa.

Na sub-fase 2 ocorreram ainda valores da classe 8 C e um em 4 C, que não será objeto de considerações pois poderá representar um erro do experimentador.

Durante as sub-fases em que a cromatina se apresentava sob a forma de cromossomos individualizados (2 a 5), foram medidos núcleos que haviam atingido 3 ou 4 intervalos de duplicação acima do valor referência. Mesmo ocupando mais de uma classe de valores, os dados não indicam que haja duplicação do material cromatínico, pois as classes representadas são as mesmas durante toda a permanência neste estado. As duplicações são reiniciadas após a dissociação dos cromossomos (sub-fase 6). O fato de terem sido encontrados valores em duas classes, durante as sub-fases em que são observadas unidades cromossômicas, pode ser indicativo

FIGURA 41 — Histograma de frequências dos valores Feulgen-DNA, em unidades arbitrárias, para os núcleos das células tróficas nas 8 sub-fases (1 a 8) da fase II da ovogênese, representada na Figura 39. Os intervalos de duplicação foram calculados com base nos menores valores das células epiteliais, considerados 2 C (Figura 46).

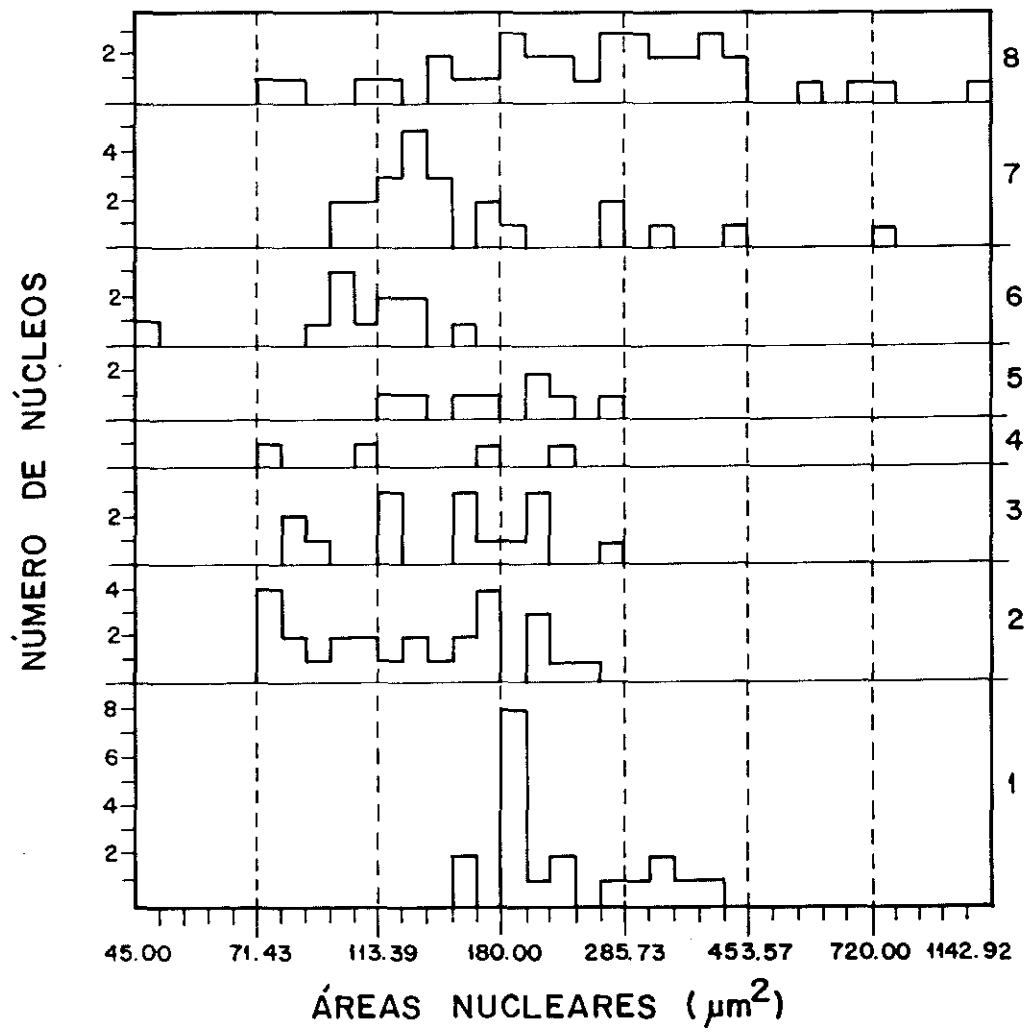


de um outro fenômeno. É importante lembrar que no item MÉTODOS foi explicado o critério para as medições dos núcleos: os pertencentes ao grupo de 4 mais próximo do oócito, e, portanto, os maiores núcleos. Esta metodologia é difícil de ser aplicada à fase II, principalmente quando o material cromatínico encontra-se sob a forma de cromossomos, pois não há como estimar o tamanho dos núcleos, a menos que estes tenham mantido, durante a preparação, a relação espacial existente no folículo. Assim, a presença de duas classes de valores indicaria terem sido medidos não só núcleos do grupo mais próximo ao oócito, como também do grupo imediatamente vizinho a ele e, portanto, com menor quantidade de DNA. A coexistência de lotes cromossômicos com diferentes níveis de DNA dentro do mesmo folículo é ilustrada na Figura 30.

Este fato demonstra que, já no início da fase II, ocorre a chamada polarização das células tróficas. Isto era visualmente percebido somente na fase III, quando o material cromatínico ocupa todo o espaço nuclear e a diferença entre os tamanhos dos núcleos é possível ser detectada.

Na Figura 42, que mostra os valores de área nuclear e/ou cromossômicos obtidos para as sub-fases da fase II, nota-se que o material cromatínico sofre uma compactação à medida em que se organizam os cromossomos, ocupando, portanto, uma área menor

FIGURA 42 — Histograma de frequências dos valores de área nuclear/cromossômica, em μm^2 , para núcleos das células tróficas nas 8 sub-fases (1 a 8) da fase II da ovogênese, representada na Figura 40. As linhas verticais representam as duplicações sucessivas que ocorrem correspondentemente nos volumes dos núcleos.



após a sub-fase 1. Nas sub-fases 7 e 8, valores mais altos voltam a ser encontrados, embora tenha aumentado a dispersão de valores no gráfico.

5.1.2.3 Resultados relativos à dieta de açúcar

Quando os valores Feulgen-DNA, dos cromossomos observados em fêmeas alimentadas somente com açúcar, foram comparados aos obtidos para os cromossomos anteriormente representados (Figura 41), não se observou diferença (dados não apresentados). Desta forma, o número de endorreplicações alcançado quando são identificadas unidades cromossômicas é o mesmo, independentemente da dieta a que a mosca estava submetida. Já a permanência neste estado, parece ser influenciada pela dieta, que seria, neste caso, um dos fatores que regulariam o desenvolvimento até à fase seguinte.

Outra parcela de fêmeas é encontrada com ovários em fase III. Não foram feitas medições nesta fase, primeiramente por termos a indicação dos dados acima, de que não havia variação do nível de ploidia atingido, em função da dieta. Além disso, as preparações realizadas com fêmeas na fase III, sob dieta de açúcar, não permitiram obter núcleos de células tróficas sem superposição por células epiteliais.

5.1.2.4. Conteúdo Feulgen-DNA e área do corpo heterocromático

Os diagramas de blocos representados nas Figuras 43 e 44 mostram que tanto a área quanto os valores Feulgen-DNA do corpo heterocromático observado nas fases III até VIII crescem, de uma maneira geral, durante o desenvolvimento ovariano.

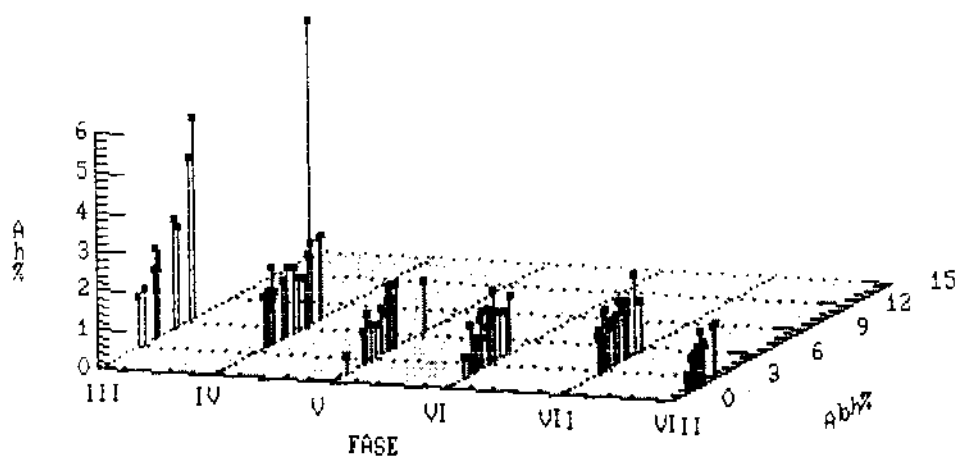
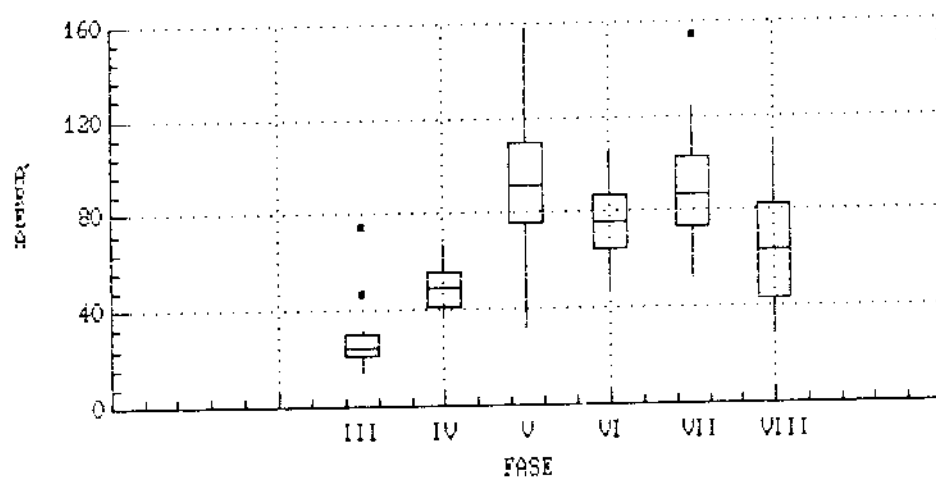
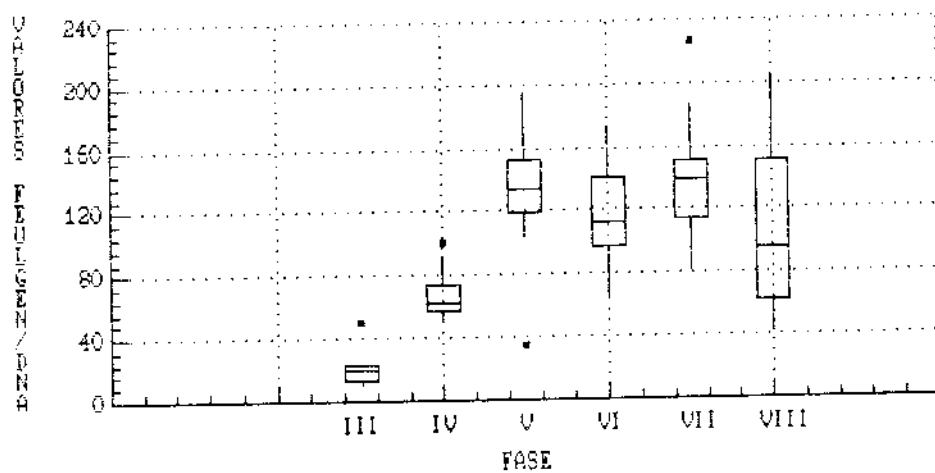
Uma observação mais detalhada dos diagramas permite notar que, embora seja difícil descrever as variações ocorridas como um todo nas distribuições das fases V, VI e VII, é evidente o declínio dos valores da fase VIII. Desta forma, haveria uma ligeira diminuição dos valores identificáveis como pertencentes à heterocromatina em alguns núcleos da fase VIII, o que explicaria a menor área ocupada. Além disto, cerca de 50% dos núcleos da fase VIII apresentaram valores Feulgen-DNA menores do que os das fases anteriores.

Quando se quis verificar se o crescimento da área ocupada pela região heterocromática acompanhava proporcionalmente o crescimento da área nuclear, lançou-se mão do parâmetro Ah%. Para fazer-se o mesmo tipo de verificação em relação aos valores Feulgen-DNA das duas regiões, usou-se o parâmetro Abh%. Os valores encontrados para esses dois parâmetros foram plotados num gráfico tridimensional (Figura 45) que os relaciona às fases de desenvolvimento.

FIGURA 43 — Diagrama de blocos representando a distribuição dos valores Feulgen-DNA, em unidades arbitrárias, da região heterocromática dos núcleos das células proximais pelas fases de desenvolvimento ovariano (III a VIII).

FIGURA 44 — Diagrama de blocos representando a distribuição das áreas ocupadas pela região heterocromática, em μm^2 , dos núcleos das células proximais pelas fases de desenvolvimento ovariano (III a VIII).

FIGURA 45 — Diagrama tridimensional : no eixo X : fases de desenvolvimento ovariano (III a VIII); no eixo Y: valores Feulgen-DNA, percentuais, da região heterocromática (Abh%); no eixo Z: área percentual ocupada pela heterocromatina (Ab%).



Quanto ao parâmetro que relaciona ambas as áreas (Ah%), percebemos que a fase III é a que apresenta os maiores valores. Estes diminuem nas fases posteriores, sendo que em VIII, ocorrem os menores valores. Desta forma, à medida que as fases se sucedem, a área ocupada pela heterocromatina torna-se proporcionalmente menor em relação à área ocupada pela cromatina total, não acompanhando o crescimento dessa. Isto é relativamente fácil de ser percebido pelo exame das Figuras 17 a 22, e com maior destaque, para a 17 e a 22. A área ocupada pelo ponto mais corado na fase VIII (Figura 22), em relação à área total, é nitidamente menor do que a ocupada por esse ponto na fase III (Figura 17).

A comparação, entre os conjuntos de medidas de cada fase, da variável que relaciona os valores Feulgen-DNA da heterocromatina e da cromatina total, representada no eixo Y da Figura 45, mostra que após a fase III há também diminuição desses valores. Os menores valores, como um todo, são novamente os da fase VIII. Assim, os valores Feulgen-DNA da heterocromatina não acompanham o crescimento dos valores da eucromatina.

5.2 CÉLULAS FOLICULARES EPITELIAIS

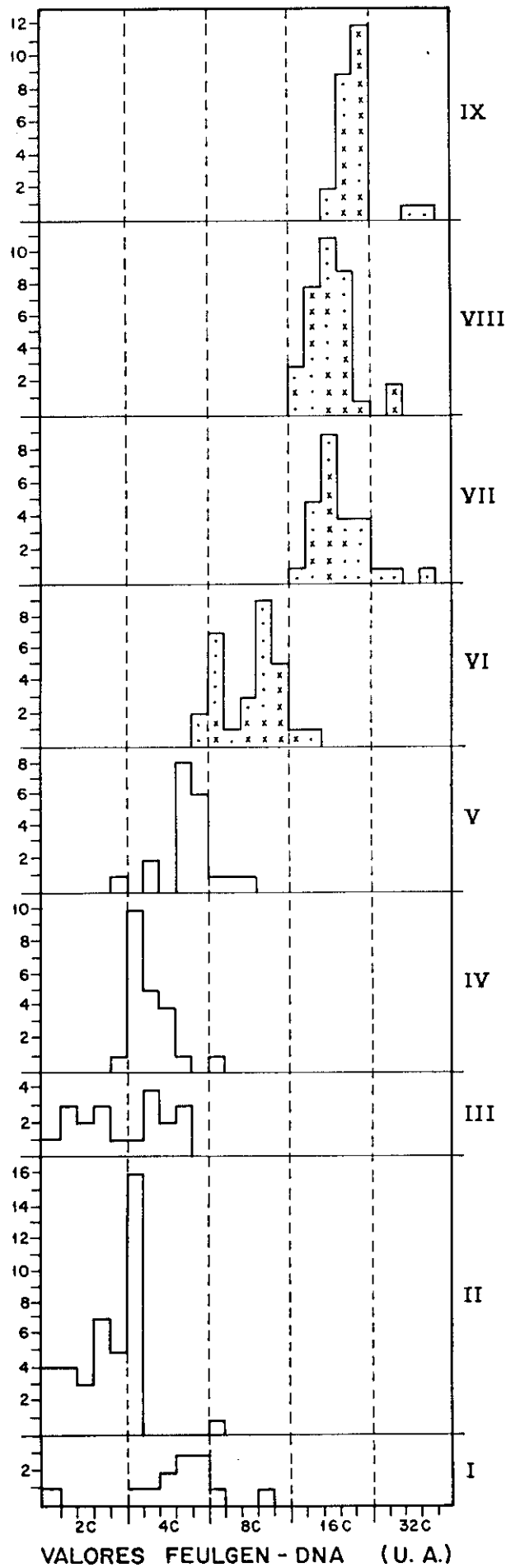
A Figura 46 mostra a distribuição dos valores Feulgen-DNA para as células epiteliais que recobrem o folículo ovariano nas diferentes fases de desenvolvimento da oogênese.

Os valores pertencentes ao primeiro intervalo de valores Feulgen-DNA dos histogramas foram considerados $2C$ e, portanto, referencial para todos os demais cálculos de valores Feulgen-DNA.

A análise dos histogramas desta figura mostra que na fase considerada início do desenvolvimento, fase I, os valores Feulgen-DNA acham-se distribuídos principalmente no intervalo correspondente à classe $4C$ e também alguns poucos valores da classe $8C$ se acham presentes. Uma vez que nas fases II e III, subsequentes, do desenvolvimento há alta frequência de valores $2C$, e que nas fases IV e V a maior frequência de valores se distribui no intervalo $4C$, é de se supor que os valores $4C$ observados nos preparados da fase I corresponderem a células em fase G2 do ciclo celular. Aparentemente o número de células epiteliais não aumenta até que o folículo definitivamente se separe do germário. Esta separação caracteriza a fase II da oogênese, onde o grande número de figuras mitóticas observadas (Figura 48) nas células epiteliais corrobora a distribuição dos valores Feulgen-DNA no histograma, representando células em G2 e

FIGURA 46 — Histograma de frequências dos valores Feulgen-DNA, em unidades arbitrárias, para os núcleos das células epiteliais de folículos nas 9 fases (I a IX) da ovogênese. Nas fases de VI a IX, os núcleos representados por x, são os que recobrem o oócito e os representados por um ponto, recobrem a câmara trófica.

NÚMERO DE NÚCLEOS



G1 do ciclo mitótico.

Na fase III repete-se a situação encontrada em II. Nessa fase as figuras mitóticas são ainda constantes (Figura 49).

Na fase IV há uma presença quase que exclusiva de núcleos 4 C e, pelo fato de não serem mais observadas figuras mitóticas nas células epiteliais, deduz-se que se tratem de núcleos poliplóides. O deslocamento na distribuição dos valores dentro da classe 4 C e o aparecimento de alguns valores na classe seguinte, 8 C, na fase V, mostram que a poliploidização é crescente.

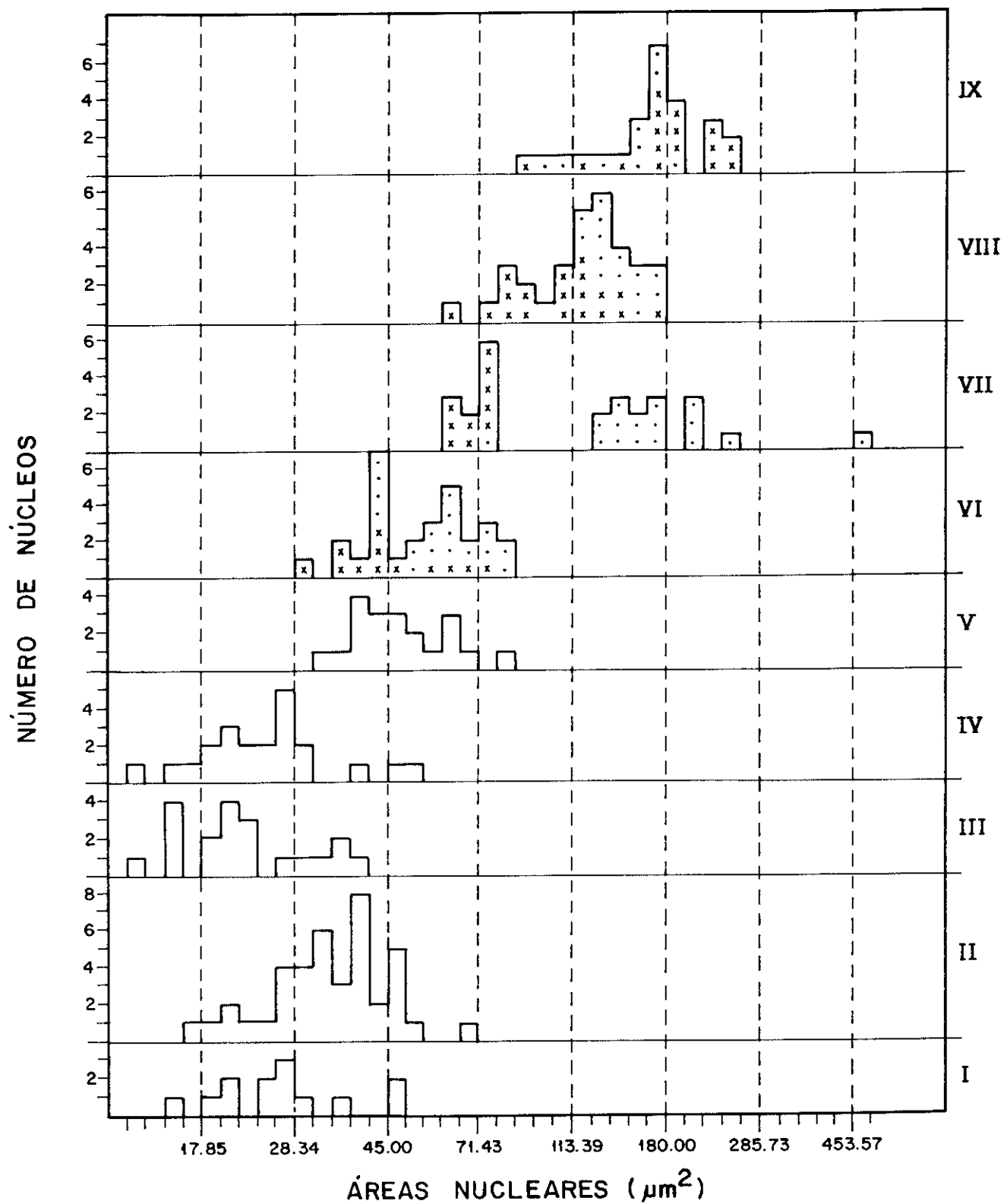
Na fase VI a maioria dos núcleos já faz parte da classe 8 C, alguns poucos núcleos se distinguindo na classe 16 C. Ocorreu, portanto, uma segunda duplicação dos valores Feulgen-DNA com relação ao início do desenvolvimento. Em função das modificações morfológicas ocorridas no folículo ovariano a partir desta fase, as medições foram feitas em duas regiões distintas: em células que recobriam o oócito (assinaladas nas Figuras 46 e 47 com x) e em células que recobriam a câmara trófica (assinaladas nas Figuras 46 e 47 com um ponto). As células das duas regiões mostraram fazer parte de um conjunto único situado predominantemente na classe de valores 8 C.

Na fase VII as células já passaram por outro ciclo de endorrepliação, pois os valores Feulgen-DNA estão, predominantemente, contidos na classe 16 C, embora se detectem núcleos 32 C. A situação é a mesma nas fases posteriores, VIII e IX.

Na Figura 47 foram plotados os valores de área em μm^2 ocupada pelo material cromatínico corado das células epiteliais. A observar, da fase I até IV, os valores de área aparecem ocupando 4 intervalos de classes que corresponderiam a três duplicações do volume nuclear (Palkóvits & Fisher, 1968). Um aparente aumento de área ocorre na fase II com ligeira compactação nuclear posterior, mais notadamente em fase IV. Deve-se lembrar que os núcleos na fase IV são em sua quase totalidade, poliplóides, mas que, no entanto, a classe predominante de seus valores de área é inferior à classe predominante dos valores de área dos núcleos da fase II.

Na fase V ocorre um grande aumento na área desses núcleos, com uma estabilização dos valores na fase VI. As medições diferenciadas por região do folículo resultaram em valores que se distribuíram igualmente pelas 3 classes assinaladas. É possível perceber, na fase VI, indícios da situação que se define com clareza na fase VII: as áreas dos núcleos envolvendo o oócito são nitidamente menores que as das células que recobrem a câmara

FIGURA 47— Histograma de frequências dos valores de área nuclear, em μm^2 , para os núcleos de células epiteliais de folículos nas 9 fases (I a IX) da ovogênese. Nas fases de VI a IX, os núcleos representados por x, são os que recobrem o oócito e os representados por um ponto, recobrem a câmara trófica.

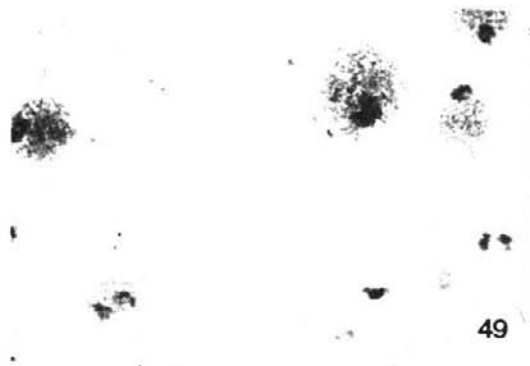


FIGURAS 48 a 52 — Células foliculares epiteliais
(Reação de Feulgen):

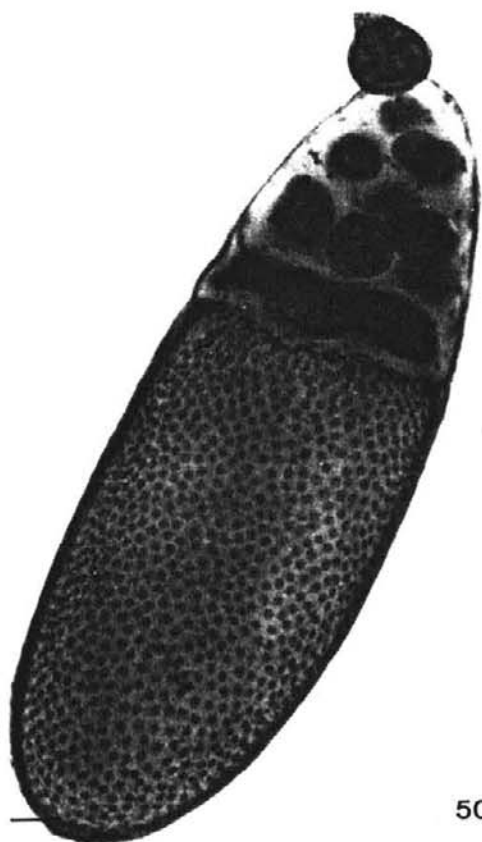
48. de folículo em fase II (estão presentes 6 cromossomos politênicos em sub-fase 5). Observar algumas figuras mitóticas.
49. de folículo em fase III. Observar várias figuras mitóticas (algumas ampliadas embaixo, à direita).
50. Folículo em fase VIII. Observar a diferença na densidade de células epiteliais sobre o oócito e sobre a câmara trófica. Barra = 50 μm
- 51 e 52. Células epiteliais de folículo em fase VII. 51. da região que recobre a câmara trófica e 52. da região que recobre o oócito. Comparar as dimensões. Barra = 10 μm . (Figuras 48, 49-ampliada, 51 e 52 apresentam o mesmo aumento).



48



49



50



51



52

trófica (Figura 51 e 52). Isto pode ser ilustrado, mesmo visualmente, pela observação da Figura 50, onde vê-se que o número de células envolvendo o oócito é muito maior que o de células que envolvem a câmara trófica. Nesta última, inclusive, a densidade de células é pequena. Assim, para conteúdos de DNA muito semelhantes para as células das duas regiões, as áreas nucleares das que envolvem a câmara trófica na fase VII são 2 a 4 vezes maiores, o que visualmente é traduzido por núcleos bem mais claros que os que envolvem o oócito.

Na fase VIII, os núcleos sobre o oócito continuam aumentando em área, alcançando os valores já ocupados pelos núcleos de células envolventes da câmara trófica na fase VII.

Finalmente, na fase IX, alguns núcleos de células que recobrem o oócito são os que predominantemente atingem uma classe de valores acima daqueles de células da outra região, que vinham ocupando tal posição desde a fase VII.

6

6. DISCUSSÃO

6.1 CÉLULAS TROFICAS

6.1.1 Alterações ao longo do desenvolvimento

6.1.1.1 Conteúdo Feulgen-DNA e áreas cobertas por cromatina

Os dados obtidos no presente trabalho, através de microespectrofotometria, demonstram aumento do conteúdo de DNA nas células tróficas de Chrysomya putoria durante as fases da ovogênese, atingindo nível de ploidia final bastante alto. O máximo valor Feulgen-DNA encontrado, 2048 C, indicativo de um total de 10 ciclos endorreplicativos, não é muito diferente dos descritos para outras espécies de Diptera, em trabalhos onde a metodologia foi semelhante. Schultz (1956) encontrou o valor 1024 C para Drosophila e Beattie & Cheney (1979), também 1024 C para Lucilia cuprina.

O maior número de ciclos replicativos ocorreu durante a etapa pré-vitelogênica, ou seja, antes do início da fase IV.

Os dados microespectrofotométricos também vieram a comprovar a suspeita, baseada em aspectos basicamente morfológicos, que as 8 unidades cromossômicas, observadas nas células tróficas durante

algumas sub-fases da ovogênese, são realmente cromossomos politênicos. Esses apresentam valores Feulgen-DNA 3 a 4 vezes maiores do que os de um conjunto cromossômico considerado 2 C.

O volume nuclear das células tróficas de *C. putoria* também sofreu grandes aumentos durante a ovogênese. Sabendo-se que, num corpo esférico, ao duplicar-se a área, o volume é multiplicado por $\sqrt[3]{4}$ (Palkovitz & Fischer, 1968), observamos pela comparação dos valores Feulgen-DNA máximos, que, se estes valores fossem estimados a partir do volume, estaríamos superestimando o número de endorreplificações ocorridos. Em vez das 10 encontradas, teríamos suposto 12, ou mesmo, 15. O volume nuclear serve, no entanto, como valor indicativo de que estão ocorrendo replicações do material cromatínico das células tróficas. Desta forma, os valores Feulgen-DNA dos núcleos das células distais só vieram confirmar o que a observação da menor área e, portanto, menor volume dessas células já indicava: um conteúdo de DNA menor do que o das células proximais da mesma fase de desenvolvimento.

Podemos perceber, então, que embora os 15 núcleos tenham origem comum e concomitante temporalmente, e estejam em comunicação uns com os outros, seus níveis de endorreplificação estão sujeitos à regulação diferenciada. Este traço contrasta com muitos sincícios, nos quais como regra geral, o núcleo se divide e se diferencia em sincronia com cada outro (Telfer, 1975). Sem

dúvida, este é um modelo incomum e intrigante para estudos fisiológicos de regulação da diferenciação celular.

Os dados, obtidos em *C. putoria* para as sub-fases da fase II, mostram que, quando da presença dos cromossomos politênicos, a assincronia entre os núcleos das células tróficas já existia. Isto corrige a informação de Avancini & Prado (1986) que descreviam a polarização dos núcleos como algo que ocorria na fase III. O que se passa, então, nesta fase, é o início da visualização do fenômeno da polarização.

A medida que houve aumento no conteúdo de DNA, foram ocorrendo alterações no fenótipo nuclear das células tróficas.

6.1.1.2 Fenótipos nucleares : politenia e poliploidia

A identificação quantitativa dos 6 cromossomos como sendo politênicos, nos leva à conclusão de que, a alternância de regiões mais coradas com outras menos coradas ao longo dos cromossomos, constitui, na verdade, o típico padrão de bandas e interbandas observado nos politênicos. Aliada a essa característica há o pareamento dos homólogos, que é de ocorrência generalizada nos politênicos de dípteros. Portanto, nas células

tróficas de *C. putoria* há a presença de cromossomos politênicos típicos durante parte do desenvolvimento ovariano.

A transformação dos núcleos de células tróficas de *C. putoria* contendo cromossomos politênicos em núcleos com aparência reticular, assemelha-se à descrita por Bier (1957) para *Calliphora erythrocephala* onde, no decurso da mencionada transformação, ocorreria a separação dos diferentes filamentos constituintes dos politênicos .

Em glândulas salivares de alguns cecidomídeos, White (1948) havia descrito a mesma transformação, interpretando-a da forma descrita acima. Beerman (1962), porém, considerava que o que ocorria era o afrouxamento na estrutura dos politênicos e não separação, o que impedia que os núcleos reticulares fossem chamados poliplóides.

Matuszewski (1965), estudando também glândula salivar de cecidomídeos, interpretou seus resultados mais à maneira de White (1948), esclarecendo, porém, que não ocorria separação em cromátides individuais, mas sim, em fibrilas com menor grau de politenia, as chamadas oligotênicas. Também não ocorria a compactação descrita por Bier (1957) como semelhante à dos cromossomos mitóticos.

Estas observações foram estendidas por Henderson (1967) que declarava que, possivelmente, a separação dos politênicos seria associada a um grande aumento de síntese de RNA, e seria uma alternativa para o fenômeno da pufação.

Brito da Cunha et alii (1968) descreveram, em ceco de Trichosia, a dissociação de cromossomos politênicos em núcleos poliplóides, como decorrente do parasitismo do inseto por protozoários intracelulares.

Parece que nenhum dos autores acima lembrou-se do que Heitz (1934) e outros (revisão: Spear, 1977) que estudaram politênicos já descreviam: a sub-replicação de certas regiões dos cromossomos, principalmente as heterocromáticas.

Como bem representa o modelo encontrado em Hammond & Laird (1985) teríamos, então, ao longo dos cromossomos politênicos muitas regiões onde o número de cromátides pareadas seria representativo do número de ciclos replicativos. Haveria outras regiões, desses mesmos cromossomos, com número de cromátides menor que o número de ciclos, e outras, onde haveria presença somente da cromátide matriz inicial.

Como deveria ocorrer a dissociação dos politênicos, dada a estrutura sabidamente sub-replicada de algumas regiões? Sem

dúvida que algumas cromátides teriam interrupções nessas regiões, do que resultariam unidades cromossômicas menores do que outras que fossem formadas por filamentos cromatínicos mais iniciais, dentro do histórico replicativo da célula.

Mostramos que em células tróficas de *C. putoria* há uma transformação de núcleos politênicos em núcleos poliplóides. Sabendo que os autossomos de *C. putoria* têm tamanhos próximos entre si (Azeredo-Espin & Pavan, 1983), constataríamos, numa observação mais detalhada de núcleos como os da Figura 15, a surpreendente presença de razoável variação de tamanho entre as diversas unidades. Seríamos levados a considerar que, muito provavelmente, os cromossomos politênicos dessas células também apresentam regiões sub-replicadas, o que no processo de separação dos filamentos resultaria em "quebras" nessas regiões. Dessa forma seriam produzidas sub-unidades menores que outras. as quais seriam originárias de filamentos onde tivesse ocorrido replicação de maior extensão do cromossomo. Em células tróficas de dípteros, descrevem-se atualmente sub-replicações não só de regiões heterocromáticas dos politênicos (Redfern, 1981; Hammond & Laird, 1985) mas também de várias outras regiões desses cromossomos (Hammond & Laird, 1985).

Baseando-se no padrão de bandas, que estava presente somente em algumas das unidades resultantes da dissociação dos

politênicos, Kraczkiewicz & Matuszewski (1958) propuseram que ocorriam fragmentações transversais nos cromossomos de glândula salivar de alguns Cecidomídeos. Isto não excluía a possibilidade, assim como no nosso caso, de que ocorressem, simultaneamente, separações longitudinais dos filamentos dos politênicos.

Alguns autores, como Brito da Cunha *et alii* (1968) bem como Ahsburner (1970), admitem que a dissociação dos politênicos aumenta a superfície disponível de DNA. Quanto à presença dos próprios politênicos Bradsky & Uryvaeva (1977) argumentam que a principal vantagem da politenia sobre a poliploidia não é só a não interrupção da transcrição, mas sim o encurtamento do ciclo mitótico e sua frequente repetição, resultando num crescimento mais rápido das células. Considerando que, o que se vê como cromossomo politênico é o resultado do que ocorreu nos ciclos replicativos precedentes, observaríamos que, até o final do que se considerou como fase de permanência de politênicos ocorreu mais da metade dos ciclos replicativos.

6.1.1.2.1 O cromossomo X

O cromossomo X de células tróficas de mutantes "fes" de Drosophila parece ser muito ativo, já que, em contraste com os autossomos, ele é difuso e é o principal sítio de incorporação de

uridina marcada (revisão: Ashburner, 1970).

Bier (1960) localizou a região organizadora nucleolar de Calliphora no cromossomo X e Ribbert & Bier (1969) mostraram que a proporção de RNA nuclear sintetizado nos nucléolos de células tróficas é de 72% e em células tricógenas é de 13%.

Pelos dados de literatura acima citados, seríamos compelidos a supor que, a região precocemente descondensada do cromossomo X de *C. putoria* seria a que contém as sequências de rDNA e que a sua descompactação, mesmo em situação de compactação total dos demais cromossomos, indicaria a alta síntese de RNA que se demonstrou existir em células tróficas de ovários meroísticos politróficos (Telfer, 1975). Trata-se, no entanto, apenas de uma especulação, pois nossas tentativas de identificar a região nucleolar através de técnicas de marcação com prata não trouxeram resultados positivos. Para resolver tal problemática, teríamos, na verdade, que realizar experimentos de incorporação de uridina marcada.

A descompactação precoce do cromossomo X não parece, no entanto, ser exclusiva de tecido ovariano, pois Brito da Cunha *et alii* (1968) também a descreveram em células de ceco de Trichosia infectados por protozoários.

6.1.1.2.2 Dieta de açúcar e politênicos

A permanência de cromossomos identificados como politênicos, em células tróficas de fêmeas alimentadas com uma dieta padrão, ocorre num período relativamente curto, de cerca de 30 horas. O prolongamento desse período, por mais 4 semanas, traria enormes vantagens para estudos de fisiologia cromossômica, não só por permitir que uma mesma população seja manuseada por mais tempo, evitando assim a frequente obtenção de novas populações, como também por proporcionar uma oportunidade ímpar para se estudar o processo que, em regra, transforma os politênicos em núcleos poliplóides.

Não encontramos na literatura qualquer menção à permanência de cromossomos politênicos por um tempo maior que o usual em função da dieta que o díptero esteja recebendo.

Barigozzi & Semenza (1952) relatam o surgimento de politênicos típicos em glândula salivar de uma espécie de Phoridae (Diptera) quando a dieta da larva tem determinados nutrientes. Do contrário a cromatina permanece difusa.

Conhecem-se casos de mutante "otu" de Drosophila melanogaster, que sendo portadores de certas combinações alélicas, promovem a manutenção dos cromossomos politênicos como

tal, mesmo em fases mais adiantadas do desenvolvimento ovariano (King *et alii*, 1981; Storto & King, 1987).

Anteriormente, a estas descobertas em Drosophila, já eram conhecidas linhagens de Calliphora erythrocephala (Bier, 1957; Ribbert & Bier, 1969) obtidas por seguidos endocruzamentos, nas quais, sob baixa temperatura, era possível obter-se grandes cromossomos politênicos durante todo o desenvolvimento do folículo.

Basile (1979) descreveu ovários anormais de Rhynchosciara onde há persistência de cromossomos politênicos com grau mais alto de ploidia do que os de ovários normais.

Ribbert (1979) já mencionava, em referência a Calliphora erythrocephala, que condições internas e ambientais poderiam levar a uma supressão mais ou menos efetiva da extrema contração dos cromossomos que se segue à fase de politênicos.

Não podemos indicar se a permanência de politênicos em C. putoria seria resultante de fatores ambientais, no caso a dieta, ou de fatores internos, indivíduos genotipicamente diferentes, associados aos fatores ambientais, a dieta.

6.1.1.2.3 O corpo heterocromático

Hammond & Laird (1985) encontraram, através de microespectrofotometria, precedida por marcação com timidina em células tróficas de Drosophila, valores que falam a favor da sub-replicação do DNA. Esses valores seriam explicados pela sub-replicação da sequência satélite e da codificadora de histona. A hibridização *in situ* com sequências específicas permitiu a localização dos satélites nas regiões do cromocentro dos politênicos de glândula salivar, usados como controle para fins de localização. Os autores sugerem que a replicação da sequência satélite seria bloqueada bem precocemente no desenvolvimento das células tróficas, provavelmente quando são observados cromossomos politênicos. Desta forma, a conhecida sub-replicação da heterocromatina, que ocorre nos politênicos de outros tecidos, estaria ocorrendo aqui também.

Redfern (1981) também descreveu sub-replicação de regiões heterocromáticas em Anopheles stephensi, tanto nos politênicos de tecidos somáticos, isto é, de glândula salivar e túbulos de Malpighi, como nos politênicos de tecidos de linhagem germinativa como são os das células tróficas.

Com exceção dos dados acima, os outros estudos que relatam sub-replicação do DNA satélite em células tróficas empregam

métodos bioquímicos, motivo pelo qual só podemos mesmo fazer suposições a respeito da heterocromatina que estaria contida nessa fração de DNA (Renkawitz & Kunz, 1975; Renkawitz-Pohl & Kunz, 1975)

Em C. putoria não se estudou quantitativamente se, durante a fase com cromossomos politênicos, houve sub-replicação da heterocromatina, mas, após essa fase, nossos dados puderam mostrar que o crescimento dos valores Feulgen-DNA da heterocromatina não acompanhou, proporcionalmente, o crescimento desses valores no restante da cromatina. Esses resultados poderiam ser uma indicação da sub-replicação da região heterocromática, mesmo quando a cromatina não está organizada em cromossomos.

Não se pode esquecer que além desta diminuição relativa nos valores da heterocromatina há também uma diminuição absoluta, em, pelo menos, 50% dos nucleos medidos. Isto poderia ser atribuído a uma ligeira descompactação da heterocromatina, o que tornaria parte de sua área não totalmente identificável como tal, por apresentar absorbância abaixo do limiar que a discriminaria.

6.2 CÉLULAS FOLICULARES EPITELIAIS

O número definitivo das células epiteliais de cada folículo ovariano é atingido na fase III. A partir daí, com o início da vitelogênese, as alterações ocorridas nas populações destas células não serão mais de ordem numérica. Ocorrerão alterações na forma (Avancini & Prado, 1986) e consequentemente na área ocupada por elas em função da localização que tiverem no folículo. Considerando que as áreas nucleares podem proporcionalmente acompanhar as alterações das áreas celulares, os dados da Figura 47, notadamente os referentes à fase VII, são explicados pelas diferenças na densidade celular e consequentes alterações morfológicas do epitélio que recobre o oócito e o da câmara trófica. Os dados mostraram que as células epiteliais das duas regiões não diferem quanto ao grau de ploidia atingidos, perfazendo um total de 3 ou 4 endorreplicações (16 e 32 C).

Considerando-se a função coriogênica destas células, mas só das que envolvem o oócito, vemos que o início da poliploidização coincide com o início da vitelogênese (fase IV), o que nos parece bastante coerente. Assim, as fêmeas que não iniciam deposição de vitelo, não realizam coriogênese e, desta forma, seus núcleos estacionam nos níveis diplóides de DNA. Os dois fenômenos, início da vitelogênese e poliploidização das células epiteliais devem estar sob o mesmo mecanismo de regulação,

provavelmente do hormônio juvenil, a exemplo do que vem sendo descrito para outras espécies.

La Pointe *et alii* (1985) conseguiram elevar os índices de ploidia nas células epiteliais de Leucophaea maderae com injeções de HJ III e os índices atingidos mostraram ser dose dependentes. Por análise microespectrofotométrica, esses autores mostraram que as células em condições normais de vitelogênese aumentam seu conteúdo de 2 C para 32 C, com pequena porcentagem de núcleos 64 C.

Mahowald *et alii* (1979), utilizando a mesma metodologia, encontraram para Drosophila melanogaster níveis semelhantes ao de L. maderae: 4 replicações endomitóticas, segundo palavras dos autores, mas que uma análise do gráfico mostra serem 5, para se atingir a pequena porcentagem de valores 64 C. A existência de sub-replicações, a partir de 16 C, é sugerida pelos autores, baseando-se no gráfico mencionado.

Para Drosophila melanogaster há ainda uma breve referência prévia (Schultz, 1958), como sendo 16 C a ploidia final atingida nestas células.

Margaritis *et alii* (1980) foram talvez os únicos autores que sugeriram, para Drosophila melanogaster, a possível

existência de 10 populações de células epiteliais, em função da análise morfológica ultraestrutural que realizaram nos envoltórios do ovo .

Não foram encontrados outros trabalhos que fizessem distinção, morfológica ou fisiológica, entre as células que recobrem as duas regiões do folículo. Considerando, no entanto, que as células epiteliais que envolvem a câmara trófica não sintetizam córion, mas que os nossos dados indicam terem grau de ploidia igual ao das que o fazem, pode-se pensar que a poliploidia não esteja relacionada só à produção deste envelope. Ou então, por outro lado, que as células, por serem originárias de uma mesma população inicial, não se diferenciaram no que se refere aos seus mecanismos de regulação, permanecendo as duas populações sujeitas aos mesmos reguladores, quando, de fato, a poliploidização seria necessária apenas nas que envolvem o oócito.

No caso das células epiteliais ,elas também não são um bom exemplo de onde a ploidia final poderia ser estimada baseada nos volumes nucleares, já que estaria sendo superestimada.

Embora descrevam-se casos de sub-replicação de certas regiões do material cromatínico destas células, a metodologia

utilizada neste trabalho não pôde detectar se isto ocorre em *C. putoria*.

6.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem a existência de problemas que necessitariam ser abordados por metodologia complementar, que, no entanto, não foi possível ser empregada no momento.

Dessa forma, uma proposta futura de trabalho deveria enfocar, através de técnicas de incorporação, possíveis diferenças nas taxas de transcrição nas diversas fases da ovogênese, mas principalmente compará-las quando da fase de politênicos com a da transformação para núcleos poliplóides. Com isso, a localização do rDNA, bem como seu comportamento replicativo poderiam ser esclarecidos. O papel do cromossomo X também poderia ficar melhor definido, notadamente a sua descompactação parcial que persiste por todo o processo de encurtamento dos autossomos. As técnicas de incorporação possibilitariam também determinar a existência de regiões sub-replicadas, que o uso de sondas específicas para determinadas sequências ajudaria a identificar. A aplicação de sondas na fase de núcleos reticulados, poderia esclarecer, por exemplo, a

formação heteróloga ou não do corpo heterocromático.

Outro aspecto do futuro desses estudos seria também quanto a um direcionamento prático, pois sabe-se as moscas são, sem dúvida, um dos subprodutos mais abundantes e incômodos dos ecossistemas secundários conhecidos como confinamento de animais. Como parte da bionomia que vem sendo definida por *C. putoria* no seu estabelecimento no novo continente, esta espécie parece estar se tornando uma das mais frequentes nos aviários de galinhas poedeiras.

Sabe-se que, muito raramente, existem situações que permitem a erradicação de uma espécie-praga. Para mantê-la abaixo do nível econômico de prejuízo, utilizam-se várias categorias de métodos de controle, no que se chama de controle integrado de pragas. Esterilização de insetos machos e/ou fêmeas é frequentemente apontada como um dos métodos a ser utilizado (Axtell, 1986).

Trabalhos que tratam da quimioesterilização de dípteros pelas aziridinas, tendo como efeito a infecundidade das fêmeas, fazem considerações sobre o fenômeno envolvido na inibição da formação do ovo.

Alguns associam-na à interferência nos processos endorreplicativos de algumas das fases de desenvolvimento das

células tróficas (Crystal & LaChance, 1963; LaChance & Leverich, 1968). Beattie (1979) rejeita esta explicação e atribui a parada do desenvolvimento a alterações nas mitoses das células epiteliais, tornando os folículos de fêmeas tratadas portadores de um número menor de células epiteliais.

O importante é que este e outros grupos de quimioesterilizantes podem tornar-se instrumentos muito úteis em programas de controle e para isto é desejável que se conheçam os mecanismos de ação destas drogas. Esta torna-se uma tarefa mais fácil se as células envolvidas na formação do ovo são de alguma forma conhecidas. Acreditamos assim, que os dados obtidos no presente trabalho poderão ser de grande valia em estudos posteriores de biologia e controle de Chrysomya putoria.

7. CONCLUSOES

■ 1. Durante o desenvolvimento das células tróficas de Chrysomya putoria ocorre alto grau de endopoliploidia em seus núcleos. O máximo valor Feulgen-DNA atingido, nos núcleos das células proximais ao oócito, é 2048 C, resultado, portanto, de 10 ciclos endorreplicativos.

■ 2. O valor máximo atingido nas células tróficas distais é menor do que o das células proximais. Não há, portanto, sincronicidade nas endorreplicações das células desse sincício, o que indicaria diferença nos fatores de regulação agindo numas e noutras células. A diferença nos valores Feulgen-DNA já é detectada desde a fase II de desenvolvimento ovariano.

■ 3. Antes que os núcleos atinjam seus valores máximos de ploidia, o material cromatínico passa por várias configurações, sendo que a mais marcante é a presença de cromossomos politênicos típicos. Isto ocorre quando o valor Feulgen-DNA está ocupando as classes de 8 C a 32 C, com predominância das classes 16 C e 32 C.

■ 4. Após um dado período, os cromossomos politênicos sofrem um grande encurtamento, e os seus filamentos constituintes separaram-se uns dos outros, originando, em função da existência

de prováveis regiões sub-replicadas, numerosas unidades de tamanhos variáveis, que dispersam-se por todo o espaço nuclear. A partir daí não é mais possível individualizar-se unidades cromossômicas.

■ 5. Com a formação desse estado reticular do núcleo, no final da fase II da ovogênese, aparece um ponto fortemente corado em preparações submetidas à reação de Feulgen. Trata-se de um corpo heterocromático que persistirá até à fase VIII. A coexistência, no mesmo folículo, de núcleos em diferentes sub-fases reforça a conclusão sobre a existência da assincronia desde a fase II.

■ 6. A área ocupada pelo corpo heterocromático aumenta bastante durante as fases de desenvolvimento do folículo ovariano, bem como seus valores Feulgen-DNA. Esses aumentos, porém, não acompanham proporcionalmente os referidos valores do restante da cromatina, o que poderia ser uma indicação da sub-replicação da região heterocromática.

■ 7. O volume ocupado pelo material cromatínico corado das células tróficas proximais aumenta cerca de 12 ou 15 vezes durante a ovogênese, ficando bem acima, portanto, dos 10 ciclos de replicação da cromatina. O volume nuclear não permite, desta

forma, fazer-se inferência exata do nível de ploidia atingido nesses núcleos.

■ 8. Os cromossomos politênicos podem permanecer como tal por um período bastante longo quando as fêmeas adultas estão submetidas a uma dieta composta somente de açúcar e água. Os valores Feulgen-DNA para estes politênicos não diferem dos encontrados para fêmeas sob dieta padrão. A presença de filamentos, que se protraem do eixo principal dos cromossomos, dá-lhes, no entanto, uma aparência característica.

■ 9. O cromossomo X apresenta comportamento distinto dos autossomos durante a fase em que os cromossomos são vistos como politênicos típicos. A parte do X não corada pelo método da banda C, apresenta-se descompactada, quando os demais cromossomos, bem como a porção heterocromática do X estão compactados.

■ 10. As células epiteliais não são células permanentemente diplóides. A poliploidia começa a ocorrer após o início da vitelogênese (fase IV), atingindo níveis de valores Feulgen-DNA até 32 C no final da ovogênese.

■ 11. Durante as fases onde ocorre maior deposição de vitelo no oócito, as células epiteliais apresentam morfologia e área



diferentes, caso estejam recobrando o oócito ou a câmara trófica. Quando recobrem a câmara trófica são mais achatadas e maiores ao passo que, quando recobrem o oócito, são cilíndricas e menores. O nível de ploidia das duas populações celulares não difere, no entanto.

8 e 9

8. RESUMO

Os núcleos das células tróficas proximais de ovário de Chrysomya putoria, nas diferentes fases do desenvolvimento ovariano, foram examinados em preparações submetidas à reação de Feulgen. Tinha-se como objetivo conhecer as alterações cromatínicas/cromossômicas durante o desenvolvimento das células relacionadas ao processo de formação dos ovos. A alteração mais marcante encontrada foi a organização do material cromatínico sob a forma de cromossomos politênicos típicos. Nessa fase são vistas 6 unidades cromossômicas, nas quais, em determinado momento do seu processo de compactação, pode ser visualizado o padrão de bandas e interbandas característico de politênicos de dípteros. Após essa fase, os cromossomos tornam-se mais e mais encurtados, até que, quando todos apresentam praticamente o mesmo comprimento, os filamentos começam a se separar, originando numerosas unidades, de tamanhos diferentes entre elas que, espalham-se por todo o espaço nuclear. A partir daí, até o final do desenvolvimento, o núcleo tem aparência interfásica, apresentando um ponto heterocromático fortemente corado. A porção eucromática do cromossomo X sofre descompactação precoce, em relação aos autossomos e à sua própria porção heterocromática. Se a fêmea adulta estiver sob uma dieta de açúcar e água, os cromossomos politênicos podem permanecer como tal por um período muito mais longo do que quando sob dieta padrão.

Através de microespectrofotometria mostrou-se que os núcleos tornam-se altamente endopoliplóides durante a ovogênese, atingindo o valor máximo de 2048 C, resultado de 10 ciclos de duplicação do DNA. Valores menores, a cada fase, foram obtidos nos núcleos distais, mostrando que há assincronia nos ciclos endorreplicativos das diferentes células tróficas do folículo. O volume ocupado pela cromatina corada aumenta cerca de 12 a 15 vezes durante o desenvolvimento. Os valores Feulgen-DNA bem como a área ocupada pelo corpo heterocromático não acompanham, proporcionalmente, o crescimento do restante da cromatina .

As células epiteliais do folículo mostraram tornarem-se também endopoliplóides, passando por até 4 ciclos de replicação, após o início da vitelogênese.

9. SUMMARY

The nuclei of proximal nurse cells of the ovary of Chrysomya putoria in the different stages of ovarian development were examined in preparations submitted to the Feulgen reaction. The objective was to follow the chromatin/chromosomal alterations occurring during the development of those cells involved in the process of egg formation. The most marked alteration encountered was the organization of the chromatin in the form of typical polytene chromosomes. In this stage 6 chromosomes could be seen, in which, at a specific point in their process of compactation, the pattern of bands and interbands characteristic of dipteran polytene chromosomes, could be seen. After this stage the chromosomes became increasingly shorter until, when all were practically the same length, their constituent filaments began to separate and scatter throughout the nuclear space. From this point on, up to the end of development, the nucleus exhibited an interphasic appearance, presenting one strongly staining heterochromatic body. The euchromatic region of the X chromosome underwent premature decompactation as compared to the autosomes and to its own heterochromatic segment. If the adult female were maintained on a sugar and water diet, the polytene chromosomes would remain as such for a much longer period than when maintained on a standard diet.

Microspectrophotometry showed that the nuclei became highly endopolyploidy during oogenesis, attaining a maximum value of 2048 C, resulting from 10 cycles of DNA duplication. At each stage, lower values were found in the distal nuclei, showing the existence of asynchrony in the endoreplicative cycles of the different nurse cells of the follicle. The volume occupied by the stained chromatin increased 12 or 15 times during development. Neither the Feulgen-DNA values nor the area occupied by the heterochromatic body proportionally followed the growth of the rest of the chromatin.

The epithelial cells of the follicle also showed endopolyploidization, passing through up to 4 cycles of replication after the start of vitellogenesis.

10

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASHBURNER, M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. Adv. Insect Physiol., 7: 1-95, 1970.

AVANCINI, R.M.P. The influence of non-protein diet on ovarian development in Chrysomya putoria (Diptera, Calliphoridae). Revta. bras. Entomol., 32 (2): 103-107, 1988.

AVANCINI, R.M.P. & MELLO, M.L.S. Nuclear bodies in nurse cells of the ovaries of Chrysomya putoria (Diptera: Calliphoridae). Zool. Jb. Anat., 115: 147-50, 1987.

AVANCINI, R.M.P. & PRADO, A.P. Oogenesis in Chrysomya putoria (Wiedemann) (Diptera :Calliphoridae). Int. J. Insect Morphol. & Embryol., 15 (5/6): 375-84, 1986.

AXTELL, R.C. Status and potential of biological control agents in livestock and poultry pest management systems. In: PATTERSON, R.S. & RUTZ, D.A. (eds) "Biological control of muscoid flies", College Park, ESA, 1986. p. 1-15.

AZEREDO-ESPIN, A.M.L. & PAVAN, C. Karyotypes and possible region of origin of three species of Calliphoridae (Diptera)

recently introduced in Brazil. Revta bras. Genet., 6: 619-38, 1983.

BARIGOZZI, C. & SEMENZA, L. A preliminary note on the biology and chromosome cycle of Aphiochaeta xanthina Sp. Am. Nat., 86: 123-4, 1952.

BARR, M. L. & BERTRAM, L.F. A morphological distinction between neurons of the male and female and the behavior of nucleolar satellite during accelerate nucleoprotein synthesis. Nature, 163: 676-7. Apud WHITE, M.J.D. "Animal cytology and evolution". Cambridge, Cambridge University Press, 1973, 961 p.

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.

BASILE, R. Aspects of ovary development in Rhynchosciara. Revta brasil. Genet., 2 (2): 145-60, 1979.

BAUER, H. Die polyploide Natur der Riesenchromosomen. Naturwiss. 26: 77-8, 1938. Apud PAINTER, T.S. & REINDORP, E.C. Endomitosis in the nurse cells of the ovary of

Drosophila melanogaster. Chromosoma 1: 276-83, 1939.

BAUMGARTNER, D.L. & GREENBERG, B. The genus Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) in the New World. J. Med. Entomol., 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. Oogenesis in Lucilia cuprina (Wied.) (Diptera: Calliphoridae). II- The effect of aziridinyI chemosterilants on oogenesis. Aust. J. Zool., 27: 349-62, 1979.

BEATTIE, G.A.C. & CHENEY, J. Oogenesis in Lucilia cuprina (Wied.) (Diptera: Calliphoridae). I. Development of the nurse cell nuclei, the oocyte nucleus and the follicle cells. Aust. J. Zool., 27: 331-48, 1979.

BECKINGHAM, K. & THOMPSON, N. Under-replication of introns + rDNA cistrons in polyploid nurse cell nuclei of Calliphora erythrocephala. Chromosoma, 87: 177-96, 1982.

BEERMAN, W. Riesenchromosomen. Protoplasmatologia 6: 1-161, 1962

- Apud WHITE, M.J.D. "Animal cytology and evolution"
Cambridge, Cambridge University Press, 1973, 961p.
- BERRY, S.J. Reproductive systems. In: BLUM, M. S.(ed)
"Fundamentals of insect physiology". NY, John Wiley & Sons,
1985. cap. 11, p. 437-466.
- BIER, K. Endomitose und Polytänie in den Nährzellkernen von
Meigen. Chromosoma, 8: 493-522, 1957.
- BIER, K. Der Karyotyp von Calliphora erythrocephala Meigen unter
besonderer Berücksichtigung der Nährzellkernchromosomen im
Gebündelten und Gepaarten Zustand. Chrosoma 11: 335-64,
1960.
- BOWNES, M. Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk
protein). Ann. Rev. Entomol., 31: 507-31, 1986.
- BOYES, J.W. & SHEWELL, G.E. Cytotaxonomy of Calliphoridae
(Diptera). Genetica, 45: 435-88, 1975.
- BRADFIELD, J. Y. & WYATT, G. R. X-linkage of a vitellogenin gene
in Locusta migratoria. Chromosoma, 88: 190-3, 1983.
- BRANDT, A. "Über die Eiröhren der Blatta orientalis. Meim.

Acad. Sci. St. Petersbourg, 7, 1874. Apud TELFER, W.A.
Development and physiology of the oocyte-nurse cell
syncytium. Adv. Insect Physiol., 11: 223-319, 1975.

BRENNAN, M.D., WEINER, A.J., GORALDKI, T.J. & MAHOWALD, A.P. The
follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in
Drosophila melanogaster. Devel. Biol., 89: 225-38, 1982.

BRITO DA CUNHA, A., MORGANTE, J.S., PAVAN, C. & GARRIDO, M.C.
Studies on cytology and differentiation in Sciaridae.
I. Chromosome changes induced by a gregarine in Trichosia sp.
(Diptera, Sciaridae). Caryologia, 21: 271-82, 1968.

BRODSKY, J.W. & URYVAEVA, I.V. Cell polyploidy: its relation to
tissue growth and function. Int. Rev. Cyt., 50: 275-332,
1977.

BROWN, E.H. & KING, R.C. Studies on the events resulting in the
formation of an egg chamber in Drosophila melanogaster.
Growth, 28: 41-81, 1964.

BROWN, S.W. Heterochromatin. Science, 151: 417-25, 1966.

BROWN, S.W. & NUR, U. Heterochromatic chromosomes in the
coccids. Science, 145: 130-36, 1964.

- BRUN, J. & CHEVASSU, D. L'évolution des structures chromatinienues des les cellules nourricières des ovocytes chez Drosophila melanogaster Meigen. Chromosoma, 9: 537-58, 1958.
- BUCHER, O. & HORISBERGER, B. Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen. Acta anat., 9: 258-78, 1950.
- BUSVINE, J.R., BELL, J.D. & GUNEIDY, A.M. Toxicology and genetics of two types of insecticide resistance in Chrysomya putoria (Wied.). Bull. ent. Res., 54: 589-99, 1963.
- CAVE, M.D. Morphological manifestations of ribosomal DNA amplification during insect oogenesis. In: KING, R.C. & AKAI, H. (eds) "Insect ultrastructure", vol.I, NY, Plenum Press, 1982. cap. 4, p. 86-117.
- CHAMBERS, J.M., CLEVELAND, W.S., KLEINER, B. & TUKEY, P.A. "Graphical methods for data analysis". Belmont, Wadsworth Inc., 1983, 395 p..
- COMINGS, D.E. Mechanisms of chromosomes banding and implications for chromosome structure. Ann. Rev. Genet., 12: 25-46, 1978.

- CRYSTAL, M.M. & LACHANCE, L.E. The modification of reproduction in insects treated with alkylating agents. I-Inhibition of ovarian growth and egg production and hatchability. Biol. Bull., 125: 270-9, 1963.
- CURTIS, C. F. Low cost sanitation systems and the control of flies and mosquitoes. Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg., 78: 298, 1984.
- de WILDE, J.& de LOOF, A. Reproduction. In: ROCKSTEIN, M. (ed.) "The physiology of insecta", NY, Academic Press, 1973. cap. 2, p. 11-95.
- ENGELMANN, F. "The physiology of insect reproduction". Oxford, Pergamon Press, 1970.
- ENGELMANN, F. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. Adv. Insect Physiol., 14: 49-108, 1979.
- EWING, G.W. "Instrumental methods of chemical analysis". N.Y., McGraw Hill, 1969.
- FERREIRA, A.L., LISON, L. & VALERI, V. Caryometric study of spermatogenesis in the rat. Z. Zellforsch., 76: 31-55, 1967.

FERREIRA, M.J.M. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em
Goiânia, Goiás. Tese de doutoramento, USP-ESALQ, 1980.

GALL, J.G., COHEN, E.H. & POLAN, M. L. Repetitive DNA sequences
in Drosophila. Chromosoma, 33: 319-44, 1971.

GEITLER, L. Die Analyse des Kernbaus und der Kernteilung der
Wasserläufer Gerris lateralis und Gerris lucustris und
die Somadifferenzierung. Z. Zellforsch. 26: 132, 1937. Apud
WHITE, M.J.D. "Animal cytology and evolution". Cambridge,
Cambridge University Press, 1973, 961 p.

GREENBERG, B. "Flies and disease. Ecology, classification and
biotic associations". vol. I, Princeton, Princeton
University Press, 1971, 856 p.

GREENBERG, B. "Flies and disease. Biology and disease
transmission ". vol. II, Princeton, Princeton University
Press, 1973, 447 p.

GREENBERG, B. & POVOLNY, D. Bionomics of flies. In: GREENBERG,
B. "Flies and disease", vol.I. Princeton, Princeton
University Press, 1971. cap. 3, p. 57-83.

- GROSS, J. Untersuchungen über die Histologie des Insectenovariums. Zool. Jb., Abt. Anat. Ontog. 18, 71-186, 1903. Apud TELFER, W.A. Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. Adv. Insect Physiol., 11: 223-319, 1975.
- GUIMARAES, J.H., PRADO, A.P. & BURALLI, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of Chrysomya in Brazil (Diptera, Calliphoridae). Revta bras. Ent., 23: 245-55, 1980.
- GUIMARAES, J.H., PRADO, A.P. & LINHARES, A.X. Three newly introduced species of Chrysomya Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). Revta Bras. Ent., 22 (1): 53-60, 1978.
- GUTZEIT, H.O. Yolk synthesis in ovarian follicles of Drosophila. Wilh. Roux. Arch., 189: 221-4, 1980.
- HAGEDORN, H.H. & KUNKEL, J.G. Vitellogenin and vitellin in insects. Ann. Rev. Entomol., 24: 473-505, 1979.
- HAMMOND, M.P. & LAIRD, D. Chromosome structure and DNA replication in nurse and follicle cells of Drosophila melanogaster. Chromosoma, 91: 267-78, 1985.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose. Jahrb. wiss. Bot.,
69: 762-818, 1928. Apud MELLO, M.L.S. Heterocromatina.
Ciência e Cultura, 30: 290-303, 1978.

HEITZ, E. Über α - und β - heterochromatin sowie Konstanz und bau
der Chromosomen bei Drosophila. Biol.Zbl., 54: 588-699,
1934. Apud SPEAR, B.B. Differential replication of DNA
sequences in Drosophila chromosomes. Amer. Zool., 17: 695-
706, 1977.

HENDERSON, S.A. The salivary gland chromosomes of Dasyneura
crataegi (Diptera, Cecidomyiidae). Chromosoma, 23: 38-58,
1967.

HERTWIG, E. Die Vielwertigkeit der Speicheldrüsenkerne und
Chromosomen bei Drosophila melanogaster. Z. indukt.
Abstamm. -u. Vererb. -Lehre, 70: 496-501, 1935. Apud
PAINTER, T.S. & REINDORP, E.C. Endomitosis in the nurse
cells of the ovarian of Drosophila melanogaster.
Chromosoma, 1: 276-83, 1939.

HSU, W.S. & HANSEN, R.W. The chromosomes in the nurse-cells of
Drosophila melanogaster. Cytologia, 18: 330-342, 1953.

HUEBNER, E. The ultrastructure and development of the telotrophic ovary. In: KING, R.C. & AKAI, H. (eds) "Insect ultrastructure" vol.2, NY, Plenum Press, 1984. cap. 1, p. 3-48.

HULLEY, P.E. Factors affecting numbers of Musca domestica Linnaeus (Diptera: Muscidae) and some other flies breeding in poultry manure. J. ent. Soc. sth. Afr., 49 (1): 19-27, 1986.

IMBIRIBA, A.S., IZUTANI, D.T., MILHORETTO, I.T. & LUZ, E. Introdução de Chrysomya chloropyga (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). Archos Biol. Tecnol. Curitiba, 20: 35-9, 1977.

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.

JACOBS-LORENA, M. Dosage of 5S and ribosomal genes during oogenesis of Drosophila melanogaster. Dev. Biol., 80: 134-145, 1980.

KING, R.C. & KOCH, E. A. Studies on the ovarian follicle cells of Drosophila. Quart. J. Micr. Sci., 104: 297-320, 1963.

KING, R.C. & VANOUCEK, E.G. Oogenesis in adult Drosophila melanogaster. X. Studies on the behavior of the follicle cells. Growth, 20: 121-57, 1956.

KING, R.C., RUBINSON, A.C. & SMITH, R.F. Oogenesis in adult Drosophila melanogaster. Growth, 20: 121-157, 1956.

KING, R.C., RILEY, S.F., CASSIDY, J.D., WHITE, P.E. & PAIK, Y.K. Giant polytene chromosomes from the ovaries of Drosophila mutant. Science, 212: 441-3, 1981.

KRACZKIEWICZ, Z. & MATUSZEWSKI, B. Observations sur une structure atypique des chromosomes salivaires de certaines cécidomyides. Chromosoma, 9: 484-92, 1958.

LA CHANCE, D. & BRUNS, S.B. Oogenesis and radiosensitivity in Cochliomyia hominivorax. Biol. Bull., 124(1): 65-83, 1963.

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., NORTH, D.T. & KLASSEN, W. Cytogenetic and cellular basis of chemically induced sterility in insects.

In: LA BRECQUE, G.C. & SMITH, C.N.(eds) "Principles of insect chemoesterilization" NY, Appleton Century-Crofts, 1968. cap. 4, p. 99-157.

LA POINTE, M.C., KOEPPE, J.K. & NAIR, K.K. Follicle cell polyploidy in Leucophaea madeirae: regulation by juvenile hormone. J. Insect Phsyol., 31 (3): 187-93, 1985.

LAURENCE, B.R. Geographical expansion of the range of Chrysomya blow flies. Trans. r. Soc. Trop. Med. Hyg., 75: 130-1, 1981.

LAURENCE, B. R. Old World blow flies in the New World. Parasit. Today, 2(3): 77-9, 1986.

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.

LEWIS, D.J. Calliphoridae of medical interest in the Sudan. Bull. Soc. Entom. Egypte, 39: 275-96, 1955.

LINHARES, A.X. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. Revta

bras. Ent., 25: 189-215, 1981.

LIMA DE FARIA, A. "Molecular evolution and organization of the chromosome". Amsterdam, Elsevier, 1983, 1186 p.

LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature, 190: 372-3, 1961.

LYON, M.F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Amer. J. Human Genet., 14: 135-48, 1962.

LYON, M.F. Gene and chromosome inactivation. Genetics, 78: 305-9, 1974.

MAHOWALD, A.P. & STRASSHEIM, J.M. Intercellular migration of centrioles in the germarium of Drosophila melanogaster. An electron microscopic study. J. Cell Biol., 45: 306-20, 1970.

MAHOWALD, A.P., CAULTON, J.H. & EDWARD, M.K. Loss of centrioles and polyploidization in follicle cells of Drosophila melanogaster. Exp. Cell Res., 118 (2): 404-10, 1979.

MARGARITIS, L.H., KAFATOS, F.C. & PETRI, W.H. The eggshell of Drosophila melanogaster. I- Fine structure of the layers and

regions of the wild-type eggshell. J. Cell Sci., 43: 1-35, 1980.

MARILUIS, J.C. Presencia del género Chrysomya Robineau-Desvoidy, 1830 en la region Neotropical (Calliphoridae, Chysomyiinae, Chrysomyiini). Res. Soc. Ent. Argentina, 39: 126, 1980.

MARTOJA, R. Les organes génitaux femelles. In: GRASSÉ, P.P. (ed.) "Traité de Zoologie" vol. 8 (5a), Paris, Masson, 1977. cap. 1, p. 2-123.

MATUSZEWSKI, B. Transition from polyteny to polyploidy in salivary glands of Cecidomyiidae. Chromosoma, 16: 22-31, 1965.

MELLO, M.L.S. Nuclear behaviour in the Malpighiam tubes of Triatoma infestans (Reduv., Hemiptera). Cytologia, 36: 42-9, 1971.

MELLO, M.L.S. Heterocromatina. Ciência e Cultura, 30: 290-303, 1978.

MELLO, M.L.S. & TAKAHASHI, C.S. DNA content and nuclear volume in larval organs of Apis mellifera. J. Apic. Res., 10: 125-32, 1971.

- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. "Práticas de biologia celular". São Paulo, Edgard Blücher / Funcamp, 1980.
- MORGAN, P.B. & LA BRECQUE, G.C. The effect of apholate on the ovarian development of house flies. J. Econ. Entomol., 55: 526-8, 1962.
- MOSTELLER, F., FIENBERG, S.E. & ROURKE, R.E.K. "Beginning statistics with data analysis". Reading, Addison-Wesley, 1983, 585 p. .
- NAGL, W. "Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution". Amsterdam, North-Holland Publ. Co., 1978.
- NORRIS, K.R. The bionomics of blow-flies. Ann. Rev. Ent., 10: 47-68, 1965.
- PAINTER, T.S. & REINDORP, E.C. Endomitosis in the nurse cells of the ovary of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma, 1: 276-83, 1939.
- PALKOVITS, M. & FISCHER, J. Karyometric investigations. Budapest, Akademiai Kiadó, 1968.

- PARDUE, M.L. & GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168: 1356-8, 1970.
- PEARSON, M.J. Polyteny and the functional significance of the polytene cell cycle. J. Cell. Sci., 15: 457-79, 1974.
- POLVONY, D. Synantropy. In: GREENBERG, B. "Flies and disease" . vol. I. Princeton, Princeton University Press, 1971. cap. 2, p. 17-54.
- 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.
- POSTLETHWAIT, J.H. & JOWETT, T. Genetic analysis of the hormonally regulated yolk polypeptide genes in Drosophila melanogaster. Cell, 20: 671-78, 1980.
- PRADO, A.P. & GUIMARAES, J.H. Estado atual da distribuição e dispersão das espécies do gênero Chrysomya R.-D. na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). Revta bras. Ent., 26: 225-31, 1983.
- RAABE, M. Insect reproduction: regulation of successive steps. Adv. Insect Physiol., 19: 29-154, 1986.

REDFERN, C.P.F. Satellite DNA of Anopheles stephensi Liston
(Diptera : Culicidae). Chromosomal location and
underreplication in polytene nuclei. Chromosoma, 82: 561-
81, 1981.

RENKAWITZ, R. & KUNZ, W. Independent replication of the
ribosomal RNA genes in the polytrophic-merostic ovaries of
Calliphora erythrocephala, Drosophila hydei and Sarcophaga
barbata. Chromosoma, 53: 131-40, 1975.

RENKAWITZ-POHL, R. & KUNZ, W. Underreplication of stellite DNA
in polyploid ovarian tissue of Drosophila virilis.
Chromosoma, 49: 375-82, 1975.

RIBBERT, D. Chromomeres and puffing in experimentally induced
polytene chromosomes of Calliphora erythrocephala.
Chromosoma, 74: 269-98, 1979.

RIBBERT, D. & BIER, K. Multiple nucleoli and enhanced nucleolar
activity in the nurse cells of the insect ovary. Chromosoma,
27: 178-97, 1969.

RIBBERT, D. & BUDDENDICK, M. Synthesis and processing of
ribosomal RNA in the growing oocytes of Calliphora

- erythrocephala. Insect Bioch., 14: 569-86, 1984.
- RUDKIN, G. Non-replicating DNA in Drosophila. Genetics suppl., 61 :227-38, 1969.
- SCHWARTZ, M.B., KELLY, T.J., IMBERSKI, R.B. & RUBENSTEIN, E.C.
The effects of nutrition and methoprene treatment on ovarian ecdysteroid synthesis in Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol., 31: 947-57, 1985.
- SCHULTZ, J. The relation of the heterochromatic chromosome regions to the nucleic acids of the cell. Cold Spring Harbor Symp. Q. Biol., 21: 307-28, 1956.
- SINHA, P., MISHRA, A. & LAKHOTIA, S.C. Chromosomal organization of Drosophila tumours. I. Polytene chromosome organization and DNA synthesis in ovarian pseudonurse cells in "otu" mutants of D. melanogaster. Chromosoma, 95: 108-16, 1987.
- SPEAR, B.B. Differential replication of DNA sequences in Drosophila chromosomes. Amer. Zool., 17: 695-706, 1977.
- SPIELMAN, A. Bionomics of autogenous mosquitoes. Ann. Rev. Ent., 16: 231-48, 1971.

- SPRADLING, A.C. & MAHOWALD, A.P. Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (2): 1096-1100, 1980.
- STORTO, P.D. & KING, R.C. Fertili heteroallelic combinations of mutant alleles of the "otu" locus of Drosophila melanogaster. Roux s Arch. Dev. Bio., 196: 210-21, 1987.
- SULAIMAN, S. SOHADI, A. R., YUNUS, H. & IBERAHIM, R. The role of some cyclorrhaphous flies as carriers of human helminths in Malaysia. Med. & Vet. Entomol., 2: 1-6, 1988.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exptl. Cell Res., 75: 304-6, 1972.
- SWIFT, M.J., HEAL, O. W. & ANDERSON, J.M. "Decomposition in terrestrial ecosystems". Oxford, Blackwell, 1979, 372 p.
- TELFER, W. H. The mechanism and control of yolk formation. Ann. Rev. Entomol., 10: 161-84, 1965.
- TELFER, W.H. Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. Adv. Insect Physiol., 11: 223-319, 1975.

TELFER, W.H., HUEBNER, E. & SMITH, D.S. The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius*. In: KING, R.E. & AKAI, H. (eds) "Insect Ultrastructure" vol.I NY, Plenum Press, 1982. cap. 5, p. 118-49, 1982.

THERMAN, E. "Human chromosomes". NY, Springer Verlag, 1986, 313 p.

TUKEY, J.W. "Exploratory data analysis". Reading, Addison-Wesley, 1977, 688 p. .

ULLERICH, F-H. Chromosomenverhältnisse, konstitutives Heterochromatin und Geschlechtsbestimmung bei einigen Arten der Gattung *Chrysomya* (Calliphoridae, Diptera). Chromosoma, 58: 113-38, 1976.

VALERI, V. Estudo da relação volume nuclear / ácido desoxirribonucleico em células normais e patológicas (carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e cervite) do colo uterino. Tese de Livre Docência, USP Faculdade de Medicina , Ribeirão Preto, 1960.

VIDAL, B.C. Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. Biol. Cell, 50: 137-46, 1984.

WHITE, M.J.D. The cytology of the Cecidomyidae (Diptera). IV -
The salivary gland chromosomes of several species. J.Morph.,
82: 53-80, 1948.

WHITE, M.J.D. "Animal cytology and evolution". Cambridge,
Cambridge University Press, 1973, 961p.

ZUMPT, F. Calliphoridae (Diptera Cyclorrapha). Part 1 :
Calliphorini and Chrysomyiini. Explor. Parc. nat. Albert,
Miss. de Witte 87, 1956, 200p. 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.