

GUIDO TIRONE



**Estudo Morfológico e Histoquímico das Glândulas Sexuais
Acessórias de *Chrysomya putoria* durante a Ovogênese
(Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae).**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) <i>Guido Tirone</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

25/09/95 Rita Maria

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na
área de Biologia Celular.

Orientadora

Profa. Dra. Rita Maria Pereira Avancini

Campinas, 1995

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T517e
V.	Ex.
TERMO B.	26398
PROC.	667/96
C	☐
O	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	13/04/96
N.º CPD	

CM 000 82560-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Tirone, Guido
T517e Estudo morfológico e histoquímico das glândulas sexuais
acessórias de **Chrysomya putoria** durante a ovogênese
(Wiedemann) (Diptera : Calliphoridae) / Guido Tirone.
-- Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador: Rita Maria Pereira Avancini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
de Campinas. Instituto de Biologia.

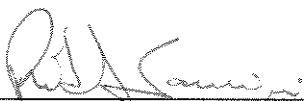
1. Díptero. 2. Reprodução. 3. Inseto. 4. ***Chrysomya**
putoria. 5. Glândulas. 6. Miisase. I. Avancini, Rita Maria
Pereira II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 25 de Setembro de 1995

BANCA EXAMINADORA:

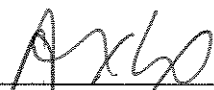
TITULARES:

Profa. Dra. Rita Maria Pereira Avancini
(ORIENTADORA)



ASSINATURA

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares



ASSINATURA

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel



ASSINATURA

SUPLENTE:

Profa. Dra. Iara Maria Silva de Luca

ASSINATURA

APROVADO

GUIDO TIRONE

**Estudo Morfológico e Histoquímico das Glândulas Sexuais
Acessórias de *Chrysomya putoria* durante a Ovogênese
(Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)**

DEDICATÓRIA

À minha família, à Lucianne e à Fernanda

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rita Maria Pereira Avancini, pela orientação, amizade e dedicação na abertura de um novo caminho em minha vida.

À Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela dedicação, amizade e compreensão em momentos difíceis que surgem da ausência.

Ao Dr. Arício Xavier Linhares pelo auxílio na realização dos testes estatísticos ao computador e pela leitura do manuscrito em pré-banca.

À Dra. Iara Maria Silva de Luca pela leitura do manuscrito em pré-banca e pela orientação na monitoria em Histologia ao curso de Medicina.

Ao Dr. Ângelo Luís Cortellazo pelos ensinamentos em citoquímica e pela sua amizade.

Ao Dr. Ângelo Pires do Prado pelas informações prestadas sobre a identificação da mosca em estudo e outras espécies.

À senhora Liliane Ziti pelo fornecimento de moscas nas etapas iniciais e importantes do trabalho, bem como os ensinamentos sobre identificação e manutenção, e amizade.

Aos amigos Wesley Godoy e Cláudio Von Zuben pela ajuda na identificação e criação das moscas e amizade.

Ao amigo Luís do departamento de Parasitologia pelas informações trocadas sobre as moscas com as quais trabalhamos e ao Rubens pela ajuda imprescindível ao computador.

Ao Dr. Norair S. Reis, chefe do Depto. de Histologia (à época) e à Dra. Iara Maria Silva de Luca por permitirem o uso da ocular kpl 8X com retículo de integração.

Ao Prof. Maurício José Lopes Vaz Amaral pelas orientações nos testes citoquímicos e Profa. Cristiana Begnami que orientou a feitura dos cortes e contribuíram muito na realização deste trabalho.

À Klélia pelos ensinamentos em questões químicas, fotográficas e muita alegria.

À Dra. Maria do Carmo Alberto Rincon, chefe do Depto. de Histologia por permitir realizar monitoria neste departamento sob orientação da Dra. Iara M. S. de Luca.

Ao Dr. Edson Rosa Pimentel pela sua enorme amizade, dedicação, caráter, e abraço amigo.

Às Dras. Laurecir Gomes, pela sua amizade, Maria Lúcia Furlan Wada e Mary Anne Heidi Dolder do Departamento de Biologia Celular.

Ao senhor José Collucci pela feitura das Figuras 1 e 2, que ilustram muito este trabalho.

À dona Irma, Sandra, dona Maria, Chico, Sidney, Cidinha, Lilian, e Mário pela amizade, momentos alegres e solicitude.

Aos colegas de curso e laboratório Fernando, Arnaldo, Selma, Márcio, Sílvia, Luciana, Marco, Odair, Maria, José Ricardo, Jeannie, Cristiane, Flávia, Daniela, Paula, Marcelo, Raquel, Tatiana, Luís, Lino, Rogério, Terezinha, Cristiane Pienna, Fátima, Marta, e Jairo.

À Patrícia pela enorme amizade, informações que trocamos e trabalho que realizamos juntos.

Às secretárias do Departamento de Parasitologia, Ana, Vânia e Andréa, ao Ivo, João, e Nilson pela amizade.

Aos colegas Odair e Patrícia do departamento de Parasitologia pela amizade.

Aos meus professores Dr. Reynaldo C. Toledo e Dr. Francisco Das Chagas Valle ao Dr. Nelson Villa, à Prof. Tereza C. G. Marinho, ao Paulo Marinho, Eliana O. Serapicos e Angélica pelo incentivo.

Ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro durante todo o período de trabalho.

Àqueles que olham das alturas e/ou por detrás de um papel, bem como seus prepostos, o que dizer? São feitos de pedra.

ÍNDICE

Resumo	iv
Abstract	vi
Introdução	1
1.1. <i>Chrysomya putoria</i> : Biologia e Origem	1
1.2. O Aparelho Reprodutor de Fêmeas de Dípteros	6
1.3. Glândulas Sexuais Acessórias de Fêmeas	9
1.3.1. Morfologia	9
1.3.1.1. Ultraestrutura da Glândula Sexual Acessória de alguns Insetos	11
1.3.2. Funções	12
1.3.3. Composição Química da Secreção da Glândula Sexual Acessória Feminina de alguns Insetos	14
1.4. Ovogênese em Insetos	15
1.5. Ovogênese em <i>C. putoria</i>	19
1.6. Regiões Organizadoras Nucleolares	19
2. Objetivos	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Obtenção e manutenção das moscas	21
3.2. Dissecção das Moscas	22

3.3. Medição das Glândulas Sexuais Acessórias	26
3.3.1. Medição das Glândulas Sexuais Acessórias Após a Oviposição	29
3.3.2. Medição das Glândulas Sexuais Acessórias Sob Dieta Aproveitosa	29
3.4. Contagem de Células	29
3.5. Análise Estatística	30
3.5.1. Análise Estatística das Medidas das Glândulas Sexuais Acessórias	30
3.5.2. Análise Estatística das Medidas Após a Oviposição	31
3.5.3. Análise Estatística da Contagem do Número de Células das Glândulas Sexuais Acessórias	31
3.6. Estudo Histoquímico	31
3.6.1. Fixação e Desidratação	32
3.6.2. Inclusão	32
3.6.3. Ultramicrotomia	33
3.6.4. Colorações	33
3.6.5. Determinação Citoquímica de RNA	34
3.7. Observação de Regiões Organizadoras Nucleolares	34
3.7.1. Impregnação por Prata	34
4. Resultados	36
4.1. Medidas das Glândulas Acessórias	36
4.1.1. Testes Estatísticos das Medidas das Glândulas Sexuais Acessórias	41
4.2. Medidas Após a Oviposição	44
4.2.1. Teste Estatístico para Medidas Pós-Oviposição	44
4.3. Crescimento das Glândulas Sexuais Acessórias sob Dieta Aproveitosa	46
4.4. Número de Células das Glândulas Sexuais Acessórias	55
4.4.1. Testes Estatísticos para o Número de Células	55

4.5. Histologia e Histoquímica das Glândulas Sexuais Acessórias	57
4.5.1. Morfologia das Glândulas Sexuais Acessórias	57
4.5.2. Histoquímica das Glândulas Sexuais Acessórias	58
5. Discussão	68
5.1. Medições das Glândulas Sexuais Acessórias	68
5.2. Medidas Após a Oviposição	71
5.3. Crescimento das Glândulas Sexuais Acessórias sob Dieta Aproveica	72
5.4. Número de Células	73
5.5. Morfologia e Histoquímica	73
6. Conclusões	81
7. Referências Bibliográficas	82

RESUMO

Chrysomya putoria é uma mosca varejeira normalmente associada a locais com precárias condições de higiene. Na natureza ela cria-se em carcaças e no esterco que acumula-se sob as gaiolas de galinhas poedeiras. Esta mosca está no Brasil a cerca de duas décadas mas na África, seu local de origem, ela é descrita como díptero causador facultativo de miíase. As glândulas sexuais acessórias de fêmeas tem um importante papel em diferentes etapas da fertilização do ovo e sua ausência experimental diminui a taxa de fertilização quase a zero.

Neste estudo o desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* foi avaliado medindo seu tamanho, contando o número de células e examinando suas alterações histológicas durante o primeiro ciclo gonotrófico.

Em fêmeas sob dieta proteica as glândulas aumentaram suas dimensões de 1,8 a 3,5 vezes, de acordo com a porção medida, até o fim da ovogênese. Após a oviposição não houve redução significativa de tamanho das glândulas. Fêmeas sob dieta aprotéica não desenvolveram ovos nem aumentaram o tamanho de suas glândulas.

O número médio de células em cada glândula é $561,2 \pm 77,54$ e não se altera durante a ovogênese.

Dois regiões podem ser observadas nas glândulas acessórias, uma secretora e uma ductal, esta última muito estreita e muito próxima à vagina. Células grandes com citoplasma basófilo, núcleo grande e basal, e uma vesícula na região apical constituem a região secretora. O conteúdo desta vesícula é liberado ao lúmen da glândula através de um aparelho terminal. O lúmen é revestido com um material semelhante a cutícula e entre esta camada e as células grandes estão células descritas como quitinogênicas.

A região ductal, também internamente revestida com material semelhante a cutícula, apresenta células muito menores do que aquelas da região secretora, cilíndricas e dispostas em uma monocamada.

O citoplasma das células secretoras cora-se fortemente pelo método de "fast green" e fracamente pelo método de PAS. A coloração com azul de toluidina pH 4.0 precedida por RNase mostrou que o citoplasma é rico em RNA. O conteúdo da vesícula mostrou uma forte reação ao método de PAS apenas no estágio VI. O conteúdo do lúmen das glândulas tem uma aparência granulada e resultou positivo para a coloração com "fast green".

As células grandes tem três ou quatro nucléolos identificados através do método de impregnação por prata.

Os dados, para os quais encontrou-se dados relacionados, foram discutidos comparativamente. Para alguns dos resultados, entretanto, como número de células e nucléolos, nenhum dado disponível foi encontrado na literatura sobre Dípteros.

ABSTRACT

Chrysomya putoria is a blowfly usually associated to filthy places. In nature it breeds on carcasses and on manure such as in that accumulated under the cages of egg-layer hens. This fly has been in Brazil for only about two decades but in Africa, its place of origin, it is described as facultative myiases-producing diptera. Sexual accessory glands of female flies have a very important role in different steps of egg fertilization and its experimental absence decreases the fertilization rate to almost zero.

In this study the development of the sexual accessory glands of *C. putoria* females was assessed by measuring their size, counting their cell number and examining their histological changes throughout the first gonotrophic cycle.

In females under proteic diet the glands increased their dimensions by 1,8 to 3,5 times, according to the portion measured, up to the end of oogenesis. After oviposition there was no significant size reduction of the glands. Females under non-proteic diet neither develop eggs nor increased the size of their glands.

The average number of cells in each gland is $561,2 \pm 77,54$ and does not change along the oogenesis.

Two regions can be observed in the accessory glands, a secretory and a ductal, this latter narrower and closer to the vagina. Large cells with basophil cytoplasm, a large basal nucleus, and a vesicle in the apical region constitute the secretory region. The content of this vesicle is released to the lumen of the gland through an end apparatus. The lumen is lined with a cuticle-like material and between this layer and the large cells there are small cells described as chitinogenic.

The ductal region, also internally lined with the cuticle-like material, presents cells much smaller than those of secretory region, cylindric in shape and arranged in a monolayer.

The cytoplasm of the large secretory cells stains strongly by the fast green method and weakly by PAS. Treatment with toluidine blue pH 4.0 preceded by RNase showed the

cytoplasm richness in RNA. The vesicle content showed a strong reaction to PAS method only in stage VI. Lumen content of the glands has a granulated appearance and resulted positive for fast-green treatment.

The large cells have three or four nucleoli identified through silver impregnation method.

The data for which correlated data could be found were discussed comparatively. For some of the results, however, like number of cells and nucleoli, no available data was found in the Diptera literature.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Chrysomya putoria*: Biologia e origem

Chrysomya putoria pertence à ordem Diptera, subordem Cyclorhapha, família Calliphoridae (Imms, 1964). A família Calliphoridae possui espécies de moscas de tamanho médio a grande. Duas subfamílias, Calliphorinae e Chrysomyinae, têm importância médico-veterinária e a última inclui o gênero *Chrysomya*. As moscas varejeiras deste gênero têm cor metálica verde a preto-azulado (Kettle, 1984). No Brasil, três espécies do gênero *Chrysomya* estão presentes: *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya albiceps*. Os adultos de *C. putoria* medem de 6-10 mm de comprimento e podem ser distinguidos das outras duas espécies observando-os ventralmente e reconhecendo a gena em cor preta em ambos os sexos e o espiráculo anterior branco (Fig. 1) (Zumpt, 1965; Guimarães et alii, 1978).

A mosca *C. putoria* e outras varejeiras podem agir transportando microorganismos, como *E. coli*, de ambientes com precárias condições de higiene, como lixões e onde não há rede de esgotos (Lima & Luz, 1991), para alimentação exposta (Laurence, 1986). *C. putoria* é potencial veiculadora de poliovírus, *Salmonella* e outros agentes enteropatogênicos (Greenberg & Povolný, 1971).

O ovo de *C. putoria* tem aproximadamente 1 mm de comprimento e após a eclosão o desenvolvimento da larva assemelha-se ao da larva de *C. chloropyga* (Diptera: Calliphoridae) (Zumpt, 1965). As larvas se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição (Greenberg & Povolný, 1971) e enterram-se no solo onde ocorre a pupariação (James, 1947). O pupário tem cor avermelhada no início e torna-se quase preto um dia antes da emergência (Zumpt, 1965).

As larvas de algumas moscas varejeiras podem ocasionar miíase cutânea. Miíase é a invasão de tecido vivo ou morto de humanos e outros vertebrados por larvas de dípteros, que por algum período se alimentam dele, bem como de seus líquidos corporais (Zumpt, 1965). Miíases também podem ser do tipo gastrointestinal como as provocadas por ingestão acidental de ovos ou larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) ou *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae), moscas não varejeiras, consumidos com alimento e que sobrevivem no aparelho digestivo (Kettle, 1984). *C. putoria* é causadora facultativa de miíase cutânea (Zumpt, 1965).

Na África e na Ásia, moscas do gênero *Chrysomya* são freqüentes em mercados (Laurence, 1986; Okaeme, 1986). *C. putoria* foi introduzida na América do Sul a partir da África, possivelmente no período de migração de angolanos que viajaram de navio com seus animais domésticos em meados da década de 70 (Guimarães et alii, 1979). No Brasil, *C. putoria* foi coletada inicialmente na cidade de Curitiba em 1975 (Imbiriba et alii, 1977 apud Guimarães et alii, 1979); depois dessa primeira observação, a mosca foi encontrada em Campinas (SP) pelos pesquisadores A. P. Prado e A. X. Linhares¹ (Guimarães et alii, 1978). Em 1979 sua presença havia sido registrada em Belém (Guimarães et alii, 1979). Linhares (1981) determinou que *C. putoria* é hemisinantrópica² em Campinas. Em 1982, Prado & Guimarães registraram sua presença do Rio Grande do Sul ao Amazonas. A partir de 1976, o gênero *Chrysomya* foi registrado na Argentina (Mariluis, 1980); Baumgartner & Greenberg (1984) registraram *C. putoria* no Peru em 1980; e Prado & Guimarães registraram sua presença na Colômbia e Bolívia em 1982.

C. putoria é frequentadora de granjas de galinhas poedeiras onde ocorre grande acúmulo de esterco sob as gaiolas. Mendes & Linhares (1993) usando várias iscas, entre elas

¹Depto. de Parasitologia IB/UNICAMP

² Sinantropia: termo aplicado a moscas e certos roedores que coexistem com o homem, em ambiente modificado por este e dependem dele, por certo período (Povolný, 1971).

visceras de galinha e fezes humanas, coletaram moscas varejeiras na região urbana de Campinas no período de Outubro de 1989 a Setembro de 1990. Destas, 10,8% eram **C. putoria**.



1.2. O Aparelho Reprodutor de Fêmeas de Dípteros

O aparelho reprodutor de fêmeas de dípteros caliptrados compreende dois ovários, três espermatecas, duas glândulas acessórias, dois ovidutos laterais e uma vagina (Fig. 2) (Imms, 1964).



1.3. Glândulas Sexuais Acessórias de Fêmeas

A classificação das glândulas sexuais acessórias em invertebrados é dificultada devido à sua origem, estrutura, função e bioquímica que serviriam como critérios (Adiyodi & Adiyodi, 1975). Estes autores classificam-nas em gonadais, ductais, seminais, espermatecais, genitoatriais, peniais, colaterais do macho e da fêmea, baseando-se na localização e morfologia dos elementos glandulares em relação ao sistema genital. Em *Glossina* (Diptera: Glossinidade) (mosca tsé-tsé), chama-se glândula de leite (Adiyodi & Adiyodi, 1975).

Genericamente as glândulas sexuais acessórias são chamadas colaterais por serem estruturas pareadas e liberarem seu produto no trato genital comum. O produto está diretamente envolvido no processo reprodutivo. Nas fêmeas, a substância é adesiva e por isso a glândula é chamada coleterial (Snodgrass, 1935; Graham-Smith, 1938; Wigglesworth, 1967; Chapman, 1982; Gillott, 1989).

A origem embrionária das glândulas colaterais nas fêmeas de insetos é ectodérmica (Gillott, 1989).

1.3.1. Morfologia

A forma e número das glândulas são variados entre os insetos. Na família Tingidae, (Heteroptera), Livingstone & Yaccob (1990) verificaram em fêmeas de 34 espécies, que elas podem ser simples ou pareadas, são sempre vesiculares, com formas ovaladas, alongadas, circunferenciais e com a extremidade dilatada. O duto pode ser individual para cada glândula em algumas espécies ou comum ao par em outras espécies.

Apesar da forma das glândulas ser muito variável entre as fêmeas de insetos, a estrutura histológica é uniforme e inclui, considerando de dentro para fora: uma camada interna quitínosa,

uma ou duas camadas de células e uma membrana basal (Gillott, 1989). O termo "quitinoso" utilizado por este autor nos parece impróprio, pois alguns órgãos possuem cutícula revestindo-os internamente, e quitina é um dos componentes da cutícula. Além de quitina, a cutícula possui proteínas, lipídios, pigmentos e enzimas (Richards, 1978). A esclerotização da cutícula, envolve a produção de ligações químicas entre as cadeias polipeptídicas, tornando-a rígida e escura (Richards, 1978; Chapman, 1982). As proteínas covalentemente ligadas juntas, são chamadas de esclerotinas (Hopkins & Kramer, 1992). Nas glândulas acessórias de **C. megacephala**, Sareen e colaboradores (1985) identificaram, de fora para dentro, uma membrana peritonal, membrana basal, uma camada de células glandulares, um epitélio e uma íntima cuticular. Bansal & Murad (1987) observaram que a glândula de **C. megacephala** tem uma região dilatada na extremidade distal, e um epitélio sincicial com núcleos espalhados. Externamente ao epitélio há uma membrana basal.

As glândulas sexuais acessórias das fêmeas do lepidóptero **Heliothis zea** são compostas de um epitélio cuboidal medindo 11 µm de altura na porção terminal da glândula. Os núcleos são arredondados, granulados e localizados junto a um plano mediano. No interior das células notam-se glóbulos secretórios que vão em direção ao lúmen. As células do epitélio possuem uma membrana basal envolvendo-as (Callahan & Cascio, 1963).

Em diferentes regiões da mesma glândula podem ser vistas células secretoras, com diferenças estruturais e funcionais. Este exemplo é claramente observado na glândula colateral esquerda de **Periplaneta americana** (Blattaria: Blattidae) estudada por Brunet (1952).

Nas moscas do gênero **Glossina** a secreção das glândulas colaterais alimenta as larvas que estão no útero (Gillott, 1989; Riddiford & Dhadialla, 1990). Esta glândula compreende três regiões: 1-duto coletor comum, um tubo muscular que internamente inclui dois dutos cuticulares; 2-quatro túbulos proximais sem uma bainha muscular mas tendo uma "íntima" cuticular abaixo da qual estão células secretoras; e 3-numerosos túbulos distais formados por ramificação dos túbulos proximais que têm uma "íntima" fina despida de células secretoras. As

células das regiões distal e proximal são idênticas e sofrem mudanças características relacionadas com ciclos de gravidez (Gillott, 1989).

Nos insetos, de modo geral, as glândulas abrem-se na vagina (Snodgrass, 1935; Wigglesworth, 1967). Em *Hippelates collusor* (Diptera: Chloropidae) as glândulas acessórias das fêmeas também abrem-se na vagina, abaixo da inserção dos dutos espermatecais (Adams & Mulla, 1967). Em *M. domestica*, um conjunto de válvulas vaginais prende o ovo na câmara de fertilização, local de desembocadura dos dutos espermatecais e glandulares (Leopold, 1980).

1.3.1.1. Ultraestrutura da Glândula Sexual Acessória de alguns Insetos

A ultraestrutura das glândulas acessórias é bem conhecida e em muito dos casos a glândula sexual acessória de fêmeas corresponde ao tipo 3 descrito por Noirot & Quennedey (1974). A descrição deste tipo compreende células secretoras cujo ápice é invaginado, formando uma vesícula, e revestido por microvilos apicais. Neste espaço, um ductulo secretado por um segundo tipo de célula, chamada célula formadora do ductulo, termina em uma estrutura chamada *aparelho terminal* sendo que em muitos casos o aparelho é uma extensão do ductulo (Noirot & Quennedey, 1974). A glândula acessória de fêmeas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) apresenta esta organização (Dallai et alii, 1985). O aparelho terminal em *P. americana* possui fosfatase alcalina e atua nas últimas etapas do metabolismo de síntese de proteínas (Brunet, 1952). Lane & Flores (1990), trabalhando com fêmeas desta última espécie, mostraram que os dois tipos celulares estão unidos por junções septadas e junções do tipo "gap". As células secretoras são mantidas unidas junto à lâmina basal por hemidesmosomas. A cavidade no ápice das células secretoras aumenta assim que a atividade secretora inicia.

Dallai e colaboradores (1988) trabalhando com *C. capitata* sustentam que, por ser o citoplasma muito delgado, os feixes de actina dos microvilos fariam contato com a região basal da célula onde há feixes de microfilamentos. A contração sincrônica da rede de actina poderia

comprimir a cavidade extracelular e enviar a secreção para o duto e daí para o lúmen da glândula acessória.

1.3.2. Funções

Em insetos das ordens Hemiptera, Neuroptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera o produto da glândula envolve os ovos e ajuda a sua fixação ao substrato (Graham-Smith, 1938; Adams & Mulla, 1967; Barr, 1974; Adiyodi & Adiyodi, 1975; Degrugillier & Grosz, 1981). A secreção das glândulas sexuais acessórias ativa os espermatozoides em *M. domestica* (Degrugillier, 1985), provoca a contração do oviduto nas fêmeas desta espécie (Wagner et alii, 1993) e lubrifica o oviduto em *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera: Eulophidae) (Wilkes, 1965) e em *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) (Walder & Calkins, 1992).

A remoção das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *M. domestica* provoca a inibição da penetração dos espermatozoides nos ovos. Isto foi observado por Leopold & Degrugillier (1973) que obtiveram 4,2% de ovos fertilizados em fêmeas sem glândulas e 77,4% de ovos fertilizados nas fêmeas com glândulas. Nas fêmeas sem glândulas acessórias, os espermatozoides tendem a agrupar-se dentro da câmara de fertilização (Leopold, 1980).

O mesmo procedimento, isto é, remoção das glândulas sexuais acessórias, em *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) e *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) revelou respectivamente que 1%, 6% e 2% dos ovos foram fertilizados. Os ovos postos por *C. hominivorax* não possuíam a cobertura adesiva que os fixa ao substrato e a micrópila não havia sido penetrada pelo espermatozoide. Além disso, nesta mosca a secreção tem papel lubrificante (Degrugillier & Grosz, 1981).

Verificou-se que a secreção da glândula atua em duas etapas da fertilização: 1-rompe a membrana acrossômica tornando-a fragmentada e/ou vesiculada; 2-desintegra a substância da capa micropilar possivelmente liberando enzimas (Degrugillier & Leopold, 1976; Leopold, 1980;

Degrugillier, 1985). As glândulas sexuais acessórias da fêmea de *M. domestica* produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas incluindo esterase, amidase e material semelhante a tripsina (Leopold, 1980). Este mesmo autor determinou que o pH ótimo de ação da secreção das glândulas sexuais acessórias de *M. domestica* varia de 6 a 9 e o tempo gasto para a remoção da capa micropilar dura de 20 a 30 segundos à temperatura ambiente.

É interessante notar que a secreção da glândula sexual acessória de *M. domestica* não age sobre a capa micropilar de ovos de *M. autumnalis* e *Muscina stabulans* (Diptera: Muscidae). Porém, a secreção hidrolisa a capa micropilar de ovos de *C. hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) em um intervalo de 2 a 3 minutos (Leopold, 1980).

Judd e colaboradores (1983), trabalhando com fêmeas de *M. domestica*, mostraram que algumas enzimas da glândula sexual acessória têm atividade de aminopeptidase e estão diretamente envolvidas na ativação de outras enzimas, possivelmente proteases, da secreção da glândula ou do esperma.

Callahan & Cascio (1963) sugeriram que as secreções das glândulas sexuais acessórias femininas ajudam o movimento dos espermatozóides dentro do duto spermatecal de algumas mariposas.

Dallai e colaboradores (1985) e Marchini e colaboradores (1989) indicam atividade antibacteriana para a secreção da glândula em *C. capitata* (Tephritidae). Um dos peptídeos com tal atividade atua contra bactérias gram-negativas e positivas. A secreção também possui atividade de lisozima. Os peptídeos com atividade anti-bacteriana consistem de 29 aminoácidos, são estáveis ao calor, básicos e diferem entre si pela substituição de dois resíduos (Marchini et alii, 1993); os mesmos autores propuseram o termo "ceratotoxina" para estes peptídeos. O peso molecular calculado é 2,87 e 2,86 kDa para ceratotoxina A e B, respectivamente. Além disso, o conjunto de proteínas secretadas teria a função de tornar mais eficiente o processo reprodutivo e

aumentar a taxa de sobrevivência das larvas (Marchinii et alii, 1993; Dallai, 1989 apud Marchini, 1991).

As células secretoras da glândula sexual acessória de fêmeas de *C. capitata* aparentemente mudam sua forma, parando de secretar em fêmeas muito velhas (Dallai et alii, 1988).

1.3.3. Composição Química da Secreção da Glândula Sexual Acessória Feminina de alguns Insetos

A análise dos aminoácidos presentes na secreção da glândula colateral de *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae) feita por Grayson & Berry (1974) mostrou que glicina está presente em 30% do total e ácido aspártico em 33%, mas há poucos aminoácidos aromáticos. Os mesmos autores mostraram que a secreção tem alto conteúdo proteico sendo digerida por pronase, e que sua síntese é inibida por puromicina e ciclo-heximida. Esta secreção leva à adesão dos ovos ao substrato em que foram postos.

Em *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), a secreção tem papel atrativo e/ou estimulante à oviposição e é solúvel em solventes orgânicos (Dougherty, 1992).

A secreção da glândula sexual acessória de fêmeas de *C. capitata* possui sete polipeptídeos, havendo 0,54 µg de proteína por glândula em média e poucos polissacarídeos. Os peptídeos tem peso molecular entre 13 e 38 kDa. Os aminoácidos ácidos representam 20,28% e os básicos 34,81% do conteúdo total de aminoácidos e ácido aspártico, arginina e histidina estão presentes em grandes quantidades (Dallai et alii, 1986).

Em estudos preliminares mostrou-se que a secreção da glândula sexual acessória da espécie citada acima, tem atividade de fosfatase alcalina (Dallai, 1989 apud Marchini, 1989). Marchini e colaboradores (1989) demonstraram a presença de duas isoenzimas na secreção de das glândulas sexuais de *C. capitata*: β -N-acetilhexosaminidase com mesmo peso molecular,

mas diferentes atividades hidrolíticas sobre 2 glicoproteínas presentes na superfície do ovo. As enzimas atuam em uma larga faixa de pH, 2,6 a 9 à temperatura de 37°C, com pH ideal igual a 4.0. Em temperaturas mais altas que 50°C a atividade da enzima é perdida. A enzima é mais estável entre pH 5 e 8 com um máximo em pH neutro. Além dos polipeptídeos citados, no conteúdo total da glândula acessória está presente uma substância com atividade de endoquitinase. As glicosidases, de uma maneira geral, estão envolvidas na degradação de quitina e atuam no crescimento e diferenciação dos insetos.

1.4. Ovogênese em Insetos

Os ovários normalmente são compostos por um conjunto de ovários onde a ovogênese ocorrerá. Em insetos reconhecem-se os seguintes tipos de ovários (Fig. 3):

1. Panoístico, onde o germário (região anterior do ovário) contém as oogônias, que originarão ovócitos, e tecido pré-folicular;
2. Meroístico, onde o germário contém a oogônia, que gera ovócitos, células tróficas ("nurse cells"; e tecido pré-folicular. Este grupo é subdividido em:

- 2.1 Ovários politróficos: onde ovócito e células tróficas estão dentro do vitelário (região posterior do ovário);

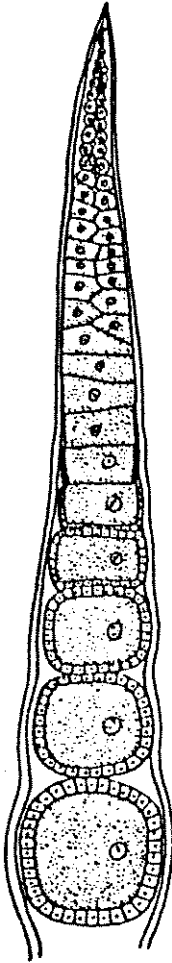
- 2.2 Ovários telotróficos: neste tipo, as células tróficas permanecem no germário havendo cordas nutritivas que comunicam-nas com o ovócito no vitelário (de Wilde & de Loof, 1973; King & Büning, 1985).

Em dípteros da superfamília Muscoidea, que possuem ovários meroísticos politróficos, a oogônia presente no germário divide-se originando um cistoblasto e uma oogônia. O cistoblasto move-se adiante no germário e sofre quatro mitoses originando dezesseis células

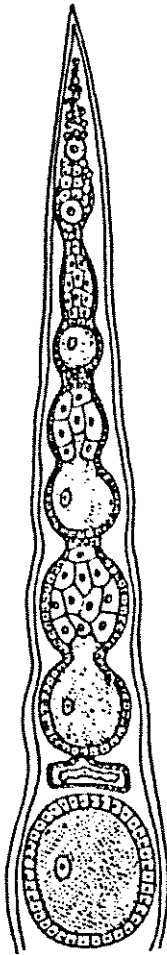
(cistócitos) que não terminam a citocinese, permanecendo unidas por pontes citoplasmáticas. Um dos cistócitos será o ovócito e os outros serão os trofócitos ("nurse cells"). Este conjunto envolvido por células foliculares destaca-se do germário e torna-se um folículo ovariano (de Wilde & de Loof, 1973; King & Büning, 1985).

As células tróficas são responsáveis pelo suprimento de rRNA ao ovócito durante a vitelogênese e a transferência de proteínas para o ovócito se dá por ação das células epiteliais foliculares que envolvem o folículo (de Wilde & de Loof, 1973).

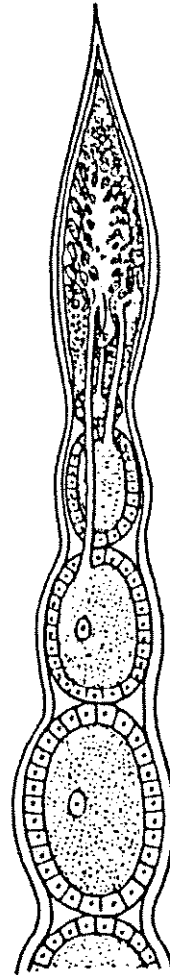
O desenvolvimento dos folículos ovarianos em *C. putoria* e *C. megacephala*, é mais rápido quando a alimentação é rica em proteínas do que com outras dietas como açúcar ou fezes de galinha, humanas e de gado bovino (Linhares & Avancini, 1989). A dieta rica em proteína também favorece o rápido desenvolvimento ovariano de *M. domestica* (Goodman et alii, 1968), *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) (Clift & Mc Donald, 1973; Cook, 1991), de *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) (Webster & Stoffolano, 1978) e de *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (Rosay, 1968). A dieta composta exclusivamente por carboidratos não permite o desenvolvimento ovariano em *M. domestica* (Bodnaryk & Morrison, 1966) em *C. putoria* e *C. megacephala* (Avancini, 1988b; Linhares & Avancini, 1989) e nem em *C. p. quinquefasciatus* (Rosay, 1968).



A



B



C

1.5. Ovogênese em *C. putoria*

Como todo díptero, esta mosca apresenta ovaríolos politróficos, e sua ovogênese foi estudada por Avancini & Prado (1986). Estes autores realizaram medições dos ovários, descreveram a estrutura histológica e acompanharam o desenvolvimento dos folículos ovarianos classificando-os em dez estágios. As características utilizadas para a classificação foram: forma do folículo, morfologia do epitélio que os envolve, tamanho do ovócito e da câmara trófica (conjunto dos trofócitos envolvidos por epitélio).

1.6. Regiões Organizadoras Nucleolares

O tamanho do nucléolo reflete sua atividade. Ele é muito pequeno em células dormentes de plantas, mas pode ocupar até 25% do volume total nuclear em células que estão produzindo quantidades incomuns de proteínas. A região organizadora nucleolar possui cístrons responsáveis pela produção de RNA ribossomal, repetidos muitas vezes, e dispostos sequencialmente (Alberts et alii, 1989). O método de impregnação por prata é utilizado para evidenciar o nucléolo. A ligação da prata possivelmente ocorre porque há grupos sulfidrila em proteínas que agiriam como agentes redutores (Buys & Osinga, 1980). A nucleolina é a principal proteína do nucléolo (Jordan, 1987; Derenzini et alii, 1990) e é impregnada pela prata.

2. OBJETIVOS

Considerando-se a grande importância das glândulas sexuais acessórias em diferentes etapas do processo reprodutivo, desde fertilização até formação dos ovos, e nada se conhecendo sobre o desenvolvimento, morfologia e conteúdo das células e da secreção das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria*, pretendeu-se verificar:

1. se ocorre alteração de tamanho das glândulas sexuais acessórias durante a ovogênese;
2. o que ocorre com as glândulas sexuais acessórias após a oviposição;
3. o efeito de dieta apteica sobre o desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias;
4. se o número de células da glândula se altera durante a ovogênese ;
5. a morfologia das células e;
6. a composição histoquímica:
 - 6a. das células, para se identificar a natureza do seu conteúdo;
 - 6b. do conteúdo do lúmen durante a ovogênese.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manutenção das moscas

As moscas utilizadas foram obtidas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia/UNICAMP cuja criação em laboratório foi iniciada a partir de coleta feita no campus da Universidade Estadual de Campinas e na granja Capuavinha localizada no município de Monte Mor (SP).

No campus, utilizando-se ratos em decomposição, as moscas foram atraídas, capturadas com puçá e colocadas em gaiolas de estrutura metálica envolvidas por tela de "nylon" medindo 30 cm x 30 cm x 48 cm. Na granja, as moscas foram capturadas sob as gaiolas de galinhas poedeiras, onde há acúmulo de esterco, e colocadas nas gaiolas como já descrito. Estas gerações passaram a ser chamadas de parentais. Ofereceu-se uma dieta composta de fígado bovino cru, açúcar e água a fim de obter-se a oviposição. Após a postura dos ovos, estes foram transferidos para um meio artificial (Leal et alii, 1982). Depois de um período de aproximadamente 5 a 7 dias as larvas L₃ foram transferidas para um frasco contendo serragem para ocorrer a pupariação. Após a emergência, as moscas foram colocadas em gaiolas como descrito anteriormente. Para o fim deste trabalho as moscas foram alimentadas com açúcar e água 24 horas por dia e carne crua por 3 horas ao dia. A sala onde as moscas foram mantidas fica à temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro.

3.2. Dissecção das Moscas

Para a observação da alteração da morfologia das glândulas sexuais acessórias, as moscas foram anestesiadas com éter e todo o aparelho reprodutor foi retirado em solução salina (NaCl) 0,85%.

O estágio de desenvolvimento dos folículos ovarianos foi observado de acordo com a classificação proposta por Avancini & Prado (1986) (Fig.4) que se baseia na morfologia apresentada pelos folículos ovarianos. O estágio atribuído à glândula é correspondente ao estágio do folículo.

O estágio I é observado assim que a mosca emerge. O germário é piriforme e o primeiro folículo ovariano começa a se destacar dele ao final deste período.

O estágio II apresenta o folículo ovariano completamente separado do germário e possui forma arredondada.

O terceiro estágio, III, mostra o folículo ovariano muito grande em relação ao germário e os núcleos das 15 células tróficas ocupam a maior parte do folículo.

No estágio IV, o folículo tem a forma elipsoidal e começa a deposição de vitelo na região basal do ovócito.

O estágio V é caracterizado pela deposição de vitelo em cerca de toda a região basal do ovócito, tendo a forma de uma letra U invertida.

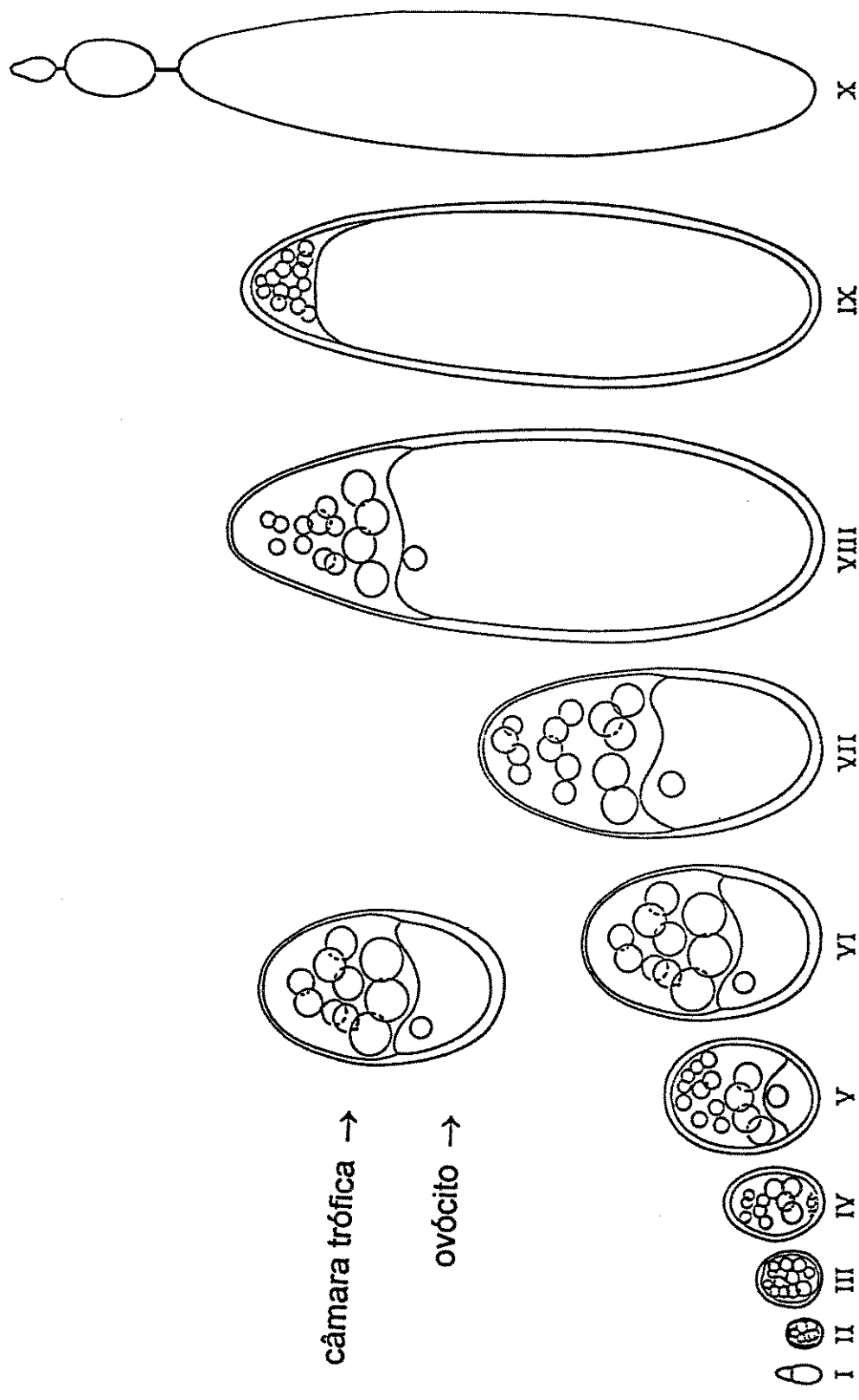
No estágio VI o ovócito alcança 1/3 do comprimento do folículo.

Quando o folículo atinge o estágio VII, metade de seu comprimento é ocupado pelo ovócito.

Estágio VIII: o folículo alonga-se mais, porém sua largura diminui. O ovócito ocupa 2/3 do total.

No estágio IX as células tróficas ocupam uma pequena parte da porção anterior do folículo e o ovócito ocupa a maior parte deste.

No último estágio, X, todo o folículo está ocupado pelo ovócito.



(μm)

1500

1200

900

600

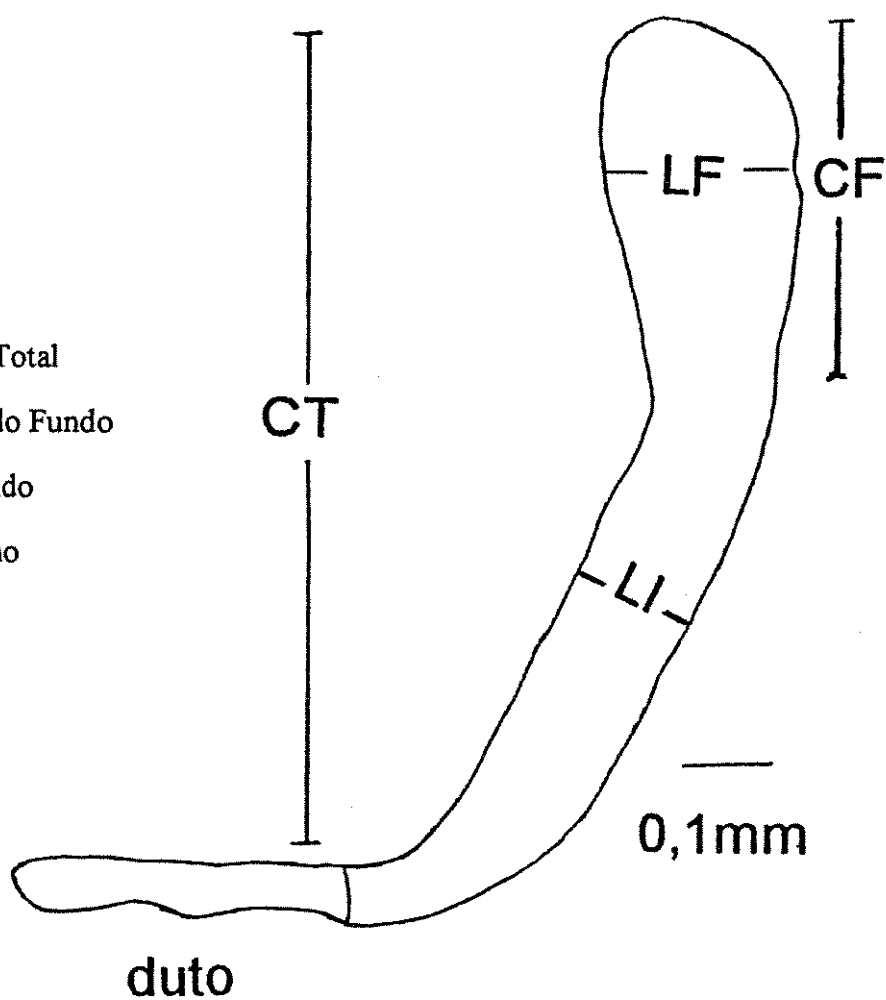
300

3.3. Medição das Glândulas Sexuais Acessórias

A escolha das regiões medidas foi baseada em Stoffolano (1974), que trabalhou com as glândulas sexuais acessórias de fêmeas de **Phormia regina** (Diptera: Calliphoridae), e estão indicadas na Figura 5.

As glândulas foram isoladas do aparelho reprodutor em placa de Petri com solução salina e imediatamente uma delas foi medida com o auxílio de um microscópio estereoscópico Zeiss, equipado com Zoom 2 e ocular milimetrada 10X Zeiss.

CT - Comprimento Total
CF - Comprimento do Fundo
LF - Largura do Fundo
LI - Largura do Ístmo



3.3.1. Medição das Glândulas Sexuais Acessórias Após a Oviposição

Para a realização desta etapa, vinte moscas, 15 fêmeas e 5 machos, foram colocados em gaiolas pequenas medindo 13 cm x 15 cm x 20 cm. As fêmeas eram recém emergidas, portanto desenvolveram o primeiro grupo de ovos. As moscas submetidas a este tratamento receberam carne moída por 24 horas durante 7 dias, sendo privadas desta dieta por 2 dias a fim de sincronizar o desenvolvimento ovariano. As mesmas condições de fotoperíodo foram mantidas. Após a postura, as glândulas foram medidas como descrito anteriormente.

3.3.2. Medição das Glândulas Sexuais Acessórias Sob Dieta Aproteica

As moscas submetidas a dieta aproteica receberam apenas água e açúcar 24 horas ao dia. As moscas mortas eram retiradas da gaiola diariamente. As mesmas condições de criação foram mantidas.

3.4. Contagem de Células

Após a medição, a glândula foi transferida para uma lâmina contendo uma gota de ácido acético 40% e deixada por 5 minutos. O excesso de ácido acético foi absorvido com papel filtro, a glândula corada com orceína lacto-acética, coberta com lamínula e muito levemente esmagada. O número de núcleos foi contado em um microscópio Zeiss equipado com ocular kpl 8X com retículo de integração de 25 pontos e objetiva de 40X num aumento final de 320X.

3.5. Análise Estatística

Para a análise estatística, os dez estágios, foram agrupados em quatro, de acordo com a deposição de vitelo no folículo ovariano.

Os grupos foram os seguintes:

"pr" - pré vitelogênese (estágios I, II e III)

"iv" - início de vitelogênese (estágios IV, V e VI)

"va" - vitelogênese avançada (estágios VII, VIII e IX)

"ov" - ovo (estágio X)

3.5.1. Análise Estatística das Medidas das Glândulas Sexuais Acessórias

A análise de variância de um fator (ANOVA) foi feita utilizando-se o procedimento G.L.M. (Modelos Lineares Gerais) do programa SAS (SAS Institute, 1986), com nível de significância de 5 %. As variáveis dependentes foram a medida de cada região em milímetros e o estágio de desenvolvimento ovariano foi a variável independente.

Possíveis diferenças entre os valores médios das regiões das glândulas sexuais acessórias nos diferentes grupos de vitelogênese, foram verificados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

3.5.2. Análise Estatística das Medidas Após a Oviposição

Foi feito o teste "t" de Student comparando-se os valores médios das regiões medidas, do estágio X, como descrito no item 3.3, e os valores médios do tratamento descrito no item 3.3.1.

3.5.3. Análise Estatística da Contagem do Número de Células das Glândulas Sexuais Acessórias

Foi feita uma análise de variância de um fator (ANOVA) utilizando-se o procedimento G. L. M. (Modelos Lineares Gerais) do programa SAS (SAS Institute, 1986) com nível de significância de 5%. A variável dependente foi o número de células.

Possíveis diferenças entre o número médio de células nos diferentes grupos de vitelogênese foram verificados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

3.6. Estudo Histoquímico

As glândulas sexuais acessórias, juntamente com as espermatecas e vagina, correspondentes a cada estágio da ovogênese, foram isoladas do corpo das moscas em solução salina (NaCl).

3.6.1. Fixação e Desidratação

As glândulas sexuais acessórias e os outros órgãos do aparelho reprodutor, foram fixados em etanol: ácido acético (3:1) por 5 minutos, transferidos para álcool 70%, desidratados com álcool 80% e 95% por 10 minutos cada. A desidratação em álcool 100% foi feita em duas etapas de 25 minutos cada. Na primeira etapa utilizou-se álcool comercial e na segunda álcool PA.

Outro procedimento empregado para fixação foi formol tamponado pH 7.0 por 60 minutos e lavagem em água de torneira por 30 minutos trocada a cada 5 minutos. A desidratação foi feita com álcoois a 50%, 60%, 70%, 80%, 95%, 10 minutos cada, e álcool 100% por 50 minutos.

A fixação utilizada para observação de regiões organizadoras nucleolares (NOR) foi feita com etanol: ácido acético (3:1) por 5 minutos.

3.6.2. Inclusão

As glândulas, juntamente com os outros órgãos, foram incluídas em historesina 2-hidroxietil-metacrilato (GMA) (Heraeus-Kulzer). A etapa de pré-infiltração foi feita com etanol 100% e Technovit 7100 em partes iguais por 3 horas em temperatura ambiente. A infiltração foi feita com Technovit 7100 por 13 horas também em temperatura ambiente. A polimerização foi feita utilizando-se 15 partes da solução de infiltração e 1 parte de endurecedor (13 a 15 gotas). A glândula e os outros órgãos foram colocados em cápsulas de gelatina e preencheu-se esta com a solução polimerizante. O processo de polimerização dura 2 horas em temperatura ambiente. Este procedimento foi feito com pequenas modificações seguindo-se as recomendações do fabricante Heraeus-Kulzer (1990).

3.6.3. Ultramicrotomia

Para feitura dos cortes, a cápsula de gelatina foi retirada e os blocos cortados em ultramicrotomo LKB ULTRATOME III com 2µm de espessura. Os cortes foram colocados em uma gota de água destilada sobre uma lâmina e esta deixada secar à temperatura ambiente.

As lâminas foram guardadas ao abrigo do pó e da luz.

3.6.4. Colorações

A coloração com hematoxilina de Harris foi feita por 20 minutos e os cortes lavados em água corrente por igual período, deixados a secar à temperatura ambiente por 12 horas. Posteriormente foram contra corados com floxina por 10 segundos. Os cortes foram desidratados em série alcoólica crescente e as lâminas montadas em Entellan. Esta dupla coloração visa mostrar os detalhes morfológicos e caráter basofílico/acidofílico da glândula sexual acessória.

A coloração com azul de toluidina pH 4.0 foi feita por 10 minutos e a lâmina lavada em água corrente, seca à temperatura ambiente e montada em Entellan. Esta coloração mostra a presença de ácido ribonucleico no citoplasma, já que em valores de pH acima de 2.0 os grupos fosfato possuem cargas negativas (Pearse, 1985) e os açúcares ácidos, podem ser evidenciados (Chayen & Bitensky, 1991).

A reação de PAS (Pearse, 1968) foi feita tratando-se o material com ácido periódico 0,5% por 10 minutos e aplicação de Reativo de Schiff por 15 minutos. Os cortes foram desidratados e montados em Entellan. Esta coloração identifica a presença de açúcares neutros no citoplasma ligados ou não a glicoproteínas.

A coloração para proteínas totais foi feita com "fast green" pH 2,5 tratando-se os cortes com ácido tricloroacético 5% (peso/volume) (recém preparado) a 90°C por 15 minutos (Pearse,

1985), em seguida as lâminas foram mergulhadas no mesmo ácido, a frio, e depois coradas com solução de "fast green" pH 2,5 por 4 minutos. Os cortes foram lavados em solução de ácido acético 3% por 5 minutos, enxaguados em água destilada, deixados a secar, desidratados em butanol, diafanizados em xilol e a lâmina montada em Entellan.

3.6.5. Determinação Citoquímica de RNA

Para detectar a presença de RNA, fez-se digestão com RNase utilizando-se a enzima na concentração de 0,1% por 1 hora e 20 minutos à temperatura de 37°C. Após a digestão, os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4.0 por 10 minutos e a lâmina lavada em água corrente, seca à temperatura ambiente e montada em Entellan.

3.7. Observação de Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs)

Após a dissecação, as glândulas foram transferidas para uma lâmina e fixadas com etanol:ácido acético (3:1) por 5 minutos, cobertas com laminula e muito levemente esmagadas. A laminula foi retirada com nitrogênio líquido.

3.7.1. Impregnação por Prata

A impregnação por prata foi feita utilizando-se duas soluções: solução A, contendo gelatina 2% em água destilada e 10 µl de ácido fórmico e solução B, contendo nitrato de prata 50% em água deionizada.

As duas soluções, A e B, foram misturadas numa razão de 1:2, uma gota foi colocada sobre o esmagamento, coberto com laminula e a lâmina levada à estufa a 60°C por 5 minutos (Howell & Black, 1980). Em seguida a lâmina foi lavada com água deionizada, deixada a secar, diafanizada com xilol e montada em Entellan.

4. RESULTADOS

4.1. Medidas das Glândulas Acessórias

As Tabelas 1 a 4 mostram os valores das dimensões médias resultantes das medições feitas nas diferentes regiões das glândulas sexuais acessórias do estágio I ao X da ovogênese. Estes dados indicam que há crescimento em todas as dimensões das glândulas sexuais acessórias até a fase IX de modo geral, o que corresponde à vitelogênese avançada. Na fase de ovo, estágio X, verifica-se não haver mais crescimento, mas sim discreta redução, como também observado nas Figuras 6 a 9.

Tabela 1 - Comprimento Total - CT das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese (mm)

Estágio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
x	1,15	1,22	1,32	1,63	1,79	1,95	1,85	2,05	2,13	1,97
s	0,17	0,17	0,20	0,34	0,27	0,23	0,26	0,25	0,12	0,20
n	14	15	11	43	17	12	11	10	15	14

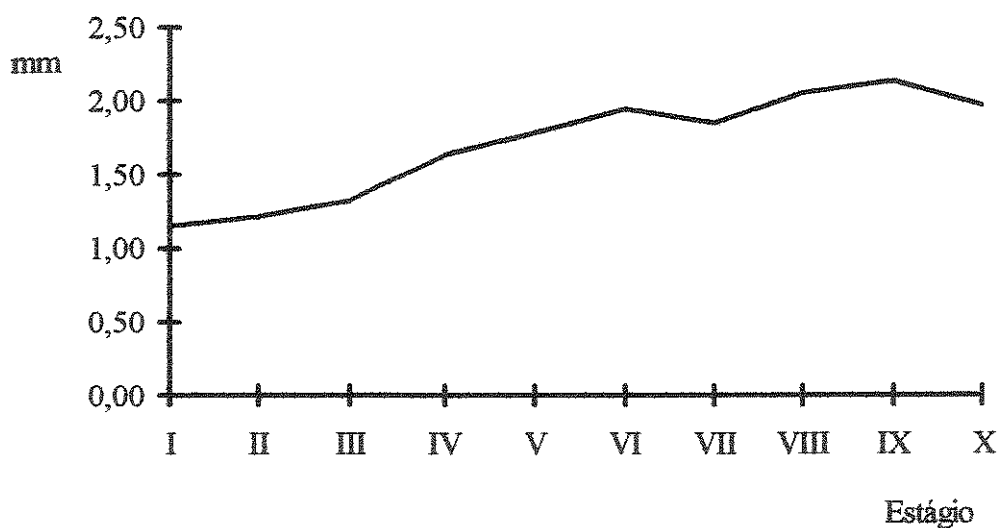


Fig. 6 Comprimento Total das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese.

Tabela 2 - Comprimento do Fundo - CF das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese (mm)

Estágio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
x	0,20	0,21	0,23	0,39	0,52	0,62	0,60	0,71	0,69	0,59
s	0,03	0,02	0,04	0,10	0,09	0,19	0,21	0,23	0,13	0,11
n	14	15	11	43	17	12	11	10	15	14

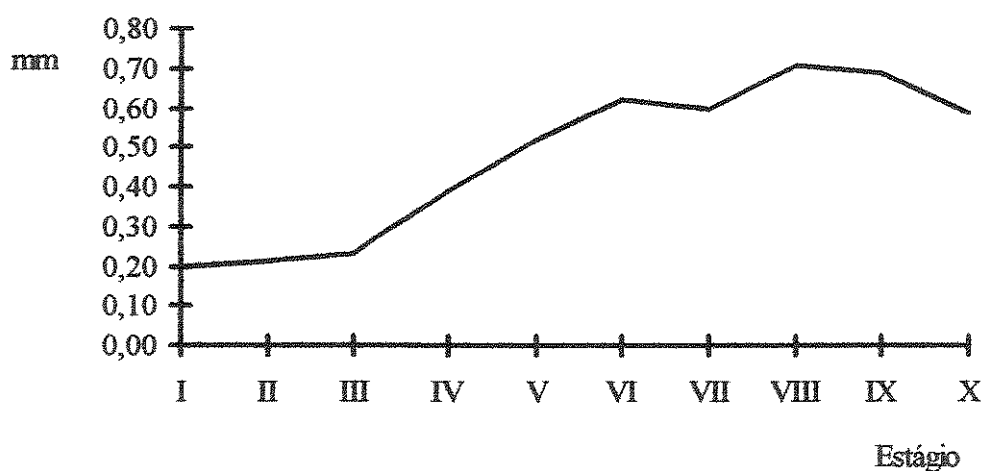


Fig. 7 Comprimento do Fundo das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese.

Tabela 3 - Largura do Ístmo - LI das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese (mm)

Estágio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
x	0,09	0,12	0,14	0,15	0,19	0,20	0,20	0,20	0,23	0,20
s	0,01	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,09	0,02
n	14	15	11	43	17	12	11	10	15	14

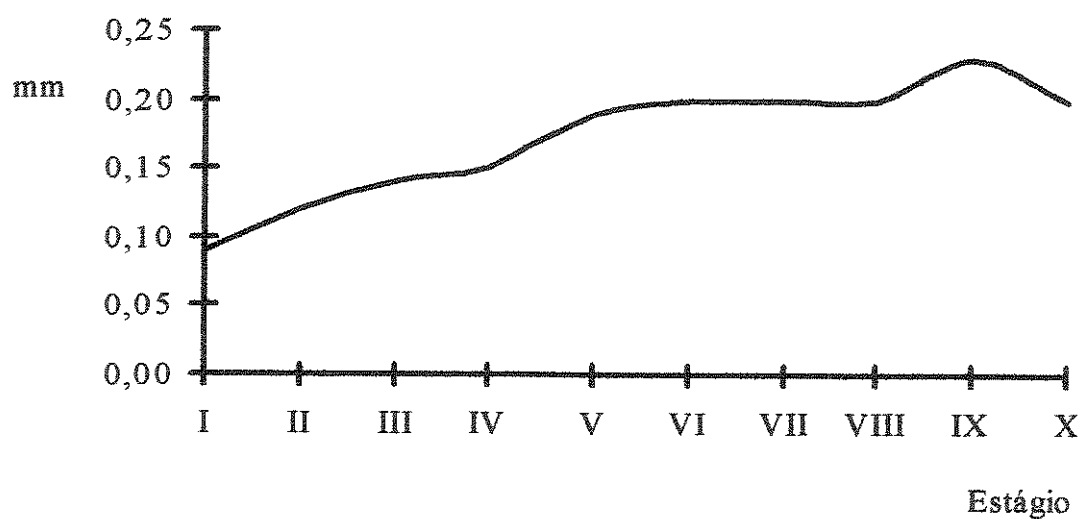


Fig. 8 Largura do Ístmo das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese.

Tabela 4 - Largura do Fundo - LF das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese (mm)

Estágio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
x	0,18	0,19	0,23	0,28	0,31	0,35	0,34	0,33	0,35	0,33
s	0,03	0,05	0,04	0,06	0,03	0,04	0,03	0,04	0,02	0,02
n	14	15	11	43	17	12	11	10	15	14

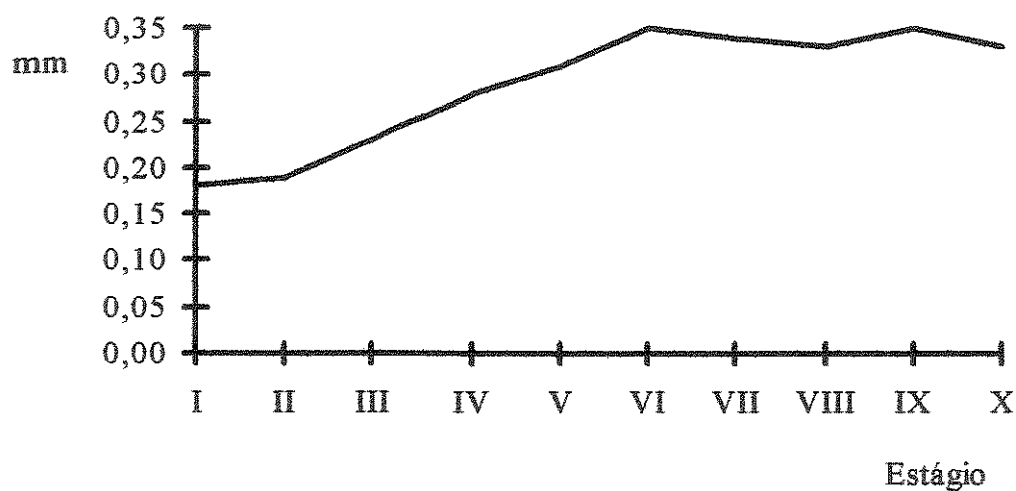


Fig. 9 Largura do Fundo das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese.

A análise das Tabelas 1 a 4 e Figuras 6 a 9 nos mostra que as glândulas sexuais crescem até o estágio IX nas regiões "comprimento total", "largura do istmo" e "largura do fundo" em uma razão de 1,8X, 2,5X e 1,9X respectivamente, quando compara-se com o estágio I e a região de comprimento do fundo aumenta na razão de 3,5X ao se compararem os estágios VIII e I.

4.1.1. Testes Estatísticos das Medidas das Glândulas Sexuais Acessórias

As análises de variâncias mostradas nas Tabelas 5 a 8 comparam as médias dos valores encontrados dentro de cada grupo de vitelogênese nas medições de cada região das glândulas sexuais acessórias e também a média da população. Os valores encontrados de F e P para as regiões medidas confirmam que as glândulas sexuais acessórias crescem durante a ovogênese, indicando haver uma probabilidade menor que 0,01% de não existir desenvolvimento concomitante à ovogênese.

Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para Comprimento Total - CT das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Entre os grupos	13,9443	3	4,6481	60,91	0,0001
Dentro dos grupos	12,0570	158	0,0763		
Total	26,0013	161			

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para Comprimento do Fundo - CF das
Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria*

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Entre os grupos	4,2981	3	1,4327	71,56	0,0001
Dentro dos grupos	3,1635	158	0,0200		
Total	7,4616	161			

Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) para Largura do Ístmo - LI das Glândulas
Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Entre os grupos	0,2106	3	0,0702	39,90	0,0001
Dentro dos grupos	0,2780	158	0,0017		
Total	0,4886	161			

Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) para Largura do Fundo - LF das Glândulas
Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Entre os grupos	0,4517	3	0,1505	56,81	0,0001
Dentro dos grupos	0,4188	158	0,0026		
Total	0,8705	161			

Teste de Duncan

O teste de Duncan, mostrado na Tabela 9, indica ocorrer desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias até vitelogênese avançada. A comparação das médias deste último grupo com as da fase de ovo, mostra não haver diferença significativa, ou seja, além da fase de vitelogênese avançada não ocorre crescimento.

Tabela 9 - Dimensões médias de cada região das glândulas sexuais acessórias nos diferentes grupos de vitelogênese

Região\grupo	PR	IV	VA	OV
CT	1,22 (C)*	1,71 (B)	2,02 (A)	1,97 (A)
CF	0,21 (C)	0,46 (B)	0,67 (A)	0,59 (A)
LI	0,11 (C)	0,17 (B)	0,21 (A)	0,20 (A)
LF	0,20 (C)	0,30 (B)	0,34 (A)	0,33 (A)

*para cada grupo, médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan

PR - pré-vitelogênese; IV - início de vitelogênese; VA - vitelogênese avançada; OV - ovo.

CT - comprimento total; CF - comprimento do fundo; LI - largura do istmo; LF - largura do fundo.

4.2 Medidas Após a Oviposição

Após a oviposição, as mesmas regiões das glândulas sexuais acessórias foram medidas, e o estágio do folículo do segundo ciclo ovariano identificado. Após a primeira postura, alguns folículos estavam em estágio IV e outros em estágio V. Os resultados são apresentados abaixo.

Tabela 10 - Dimensões médias das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* após a oviposição

	2°. fol.	Estágio	IV		2°. fol.	Estágio	V	
	CT	CF	LI	LF	CT	CF	LI	LF
x	1,96	0,52	0,2	0,28	1,86	0,63	0,18	0,33
s	0,31	0,02	0	0,02	0,42	0,1	0,02	0,02
n=4					n=3			

4.2.1. Teste Estatístico para Medidas Pós-Oviposição

O resultado do teste "t" de Student realizado para as medidas pós-oviposição é mostrado na tabela abaixo.

Tabela 11 - Valores dos testes "t" para medidas pós-oviposição das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* comparadas com o estágio X do primeiro ciclo ovariano

regiões medidas	grupo a			grupo b		
	t	Prob.	t _c	t	Prob.	t _c
CT	0,0564	>0,90	2,12	1,3865	>0,10	2,131
CF	0,1001	>0,90	2,12	-0,7321	>0,40	2,131
LI	0,017	>0,90	2,12	0,6497	>0,50	2,131
LF	0,1294	>0,80	2,12	0,005	>0,90	2,131

t_c valor crítico de t; CT comprimento total; CF comprimento do fundo; LI largura do ístmo; LF largura do fundo.

grupo a: estágio do folículo após a oviposição: IV

grupo b: estágio do folículo após a oviposição: V

Os resultados da Tabela 10, segundo folículo em estágio IV, para as dimensões "comprimento total, comprimento do fundo e largura do fundo", comparados com os respectivos valores das Tabelas 1, 2, e 4, estágio X, diminuem, porém não significativamente (Tab. 11). O resultado encontrado para "largura do ístmo" comparado ao estágio X da Tabela 3 mostra não ocorrer alteração (Tab. 11).

Já em relação ao grupo "b", segundo folículo em estágio V, a redução das dimensões das regiões "comprimento total, largura do ístmo e largura do fundo" é maior que aquelas do grupo "a", exceto para "comprimento do fundo" ao comparar-se com o estágio X do primeiro ciclo ovariano. Nas quatro regiões medidas deste grupo "b", não houve redução significativa das dimensões após a oviposição (Tab. 11). Devemos lembrar que o valor negativo ao teste "t" encontrado para "comprimento do fundo" no grupo "b" representa um aumento da dimensão em relação ao estágio X do primeiro ciclo e pode ser resultado da reduzida amostra, visto que a obtenção de glândulas após a oviposição foi dificultada.

4.3. Crescimento das Glândulas Sexuais Acessórias sob Dieta Aproteica

As Figuras 10 a 13 mostram o efeito da dieta aproteica sobre o desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias, avaliado através do crescimento e da presença de atividade secretora. As observações alcançaram 696 horas, e os folículos não ultrapassaram o estágio IV. Encontraram-se folículos em estágio II e III às 120 horas e 528 horas e não se notou atividade secretora das glândulas.

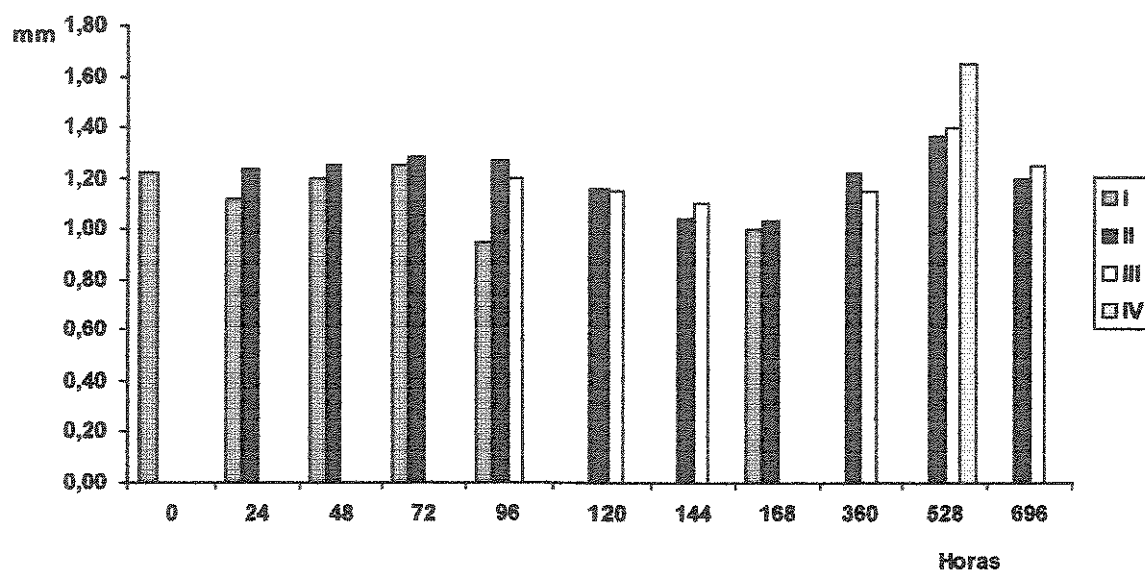


Fig. 10 Comprimento Total

0 hora Est. I n= 7

144 horas Est. II n= 5

24 horas Est. I n= 2

Est. III n= 1

Est. II n= 5

168 horas Est. I n= 1

48 horas Est. I n= 2

Est. II n= 5

Est. II n= 4

360 horas Est. II n= 4

72 horas Est. I n= 1

Est. III n= 2

Est. II n= 5

528 horas Est. II n= 2

96 horas Est. I n= 1

Est. III n= 3

Est. II n= 2

Est. IV n= 1

Est. III n= 3

696 horas Est. II= 4

120 horas Est. II n= 3

Est. III n= 2

Est. III n= 2

Est. IV n= 1

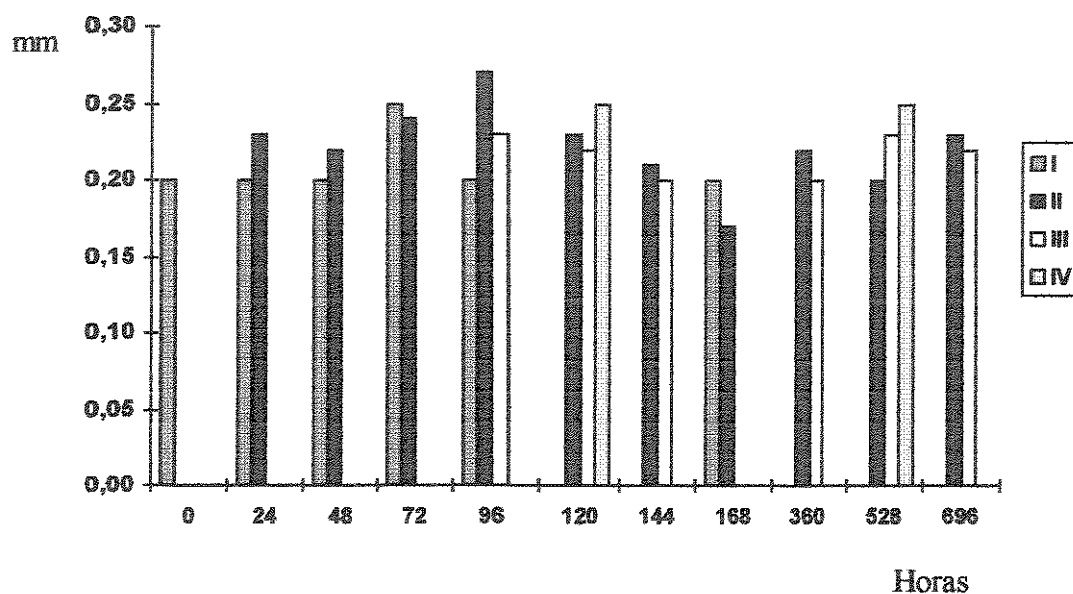


Fig. 11 Comprimento do Fundo

0 hora Est. I n= 7

144 horas Est. II n= 5

24 horas Est. I n= 2

Est. III n= 1

Est. II n= 5

168 horas Est. I n=1

48 horas Est. I n= 2

Est. II n= 5

Est. II n= 4

360 horas Est. II n= 4

72 horas Est. I n= 1

Est. III n= 2

Est. II n= 5

528 horas Est. II n= 2

96 horas Est. I n= 1

Est. III n= 3

Est. II n= 2

Est. IV n= 1

Est. III n= 3

696 horas Est. II= 4

120 horas Est. II n= 3

Est. III n= 2

Est. III n= 2

Est. IV n= 1

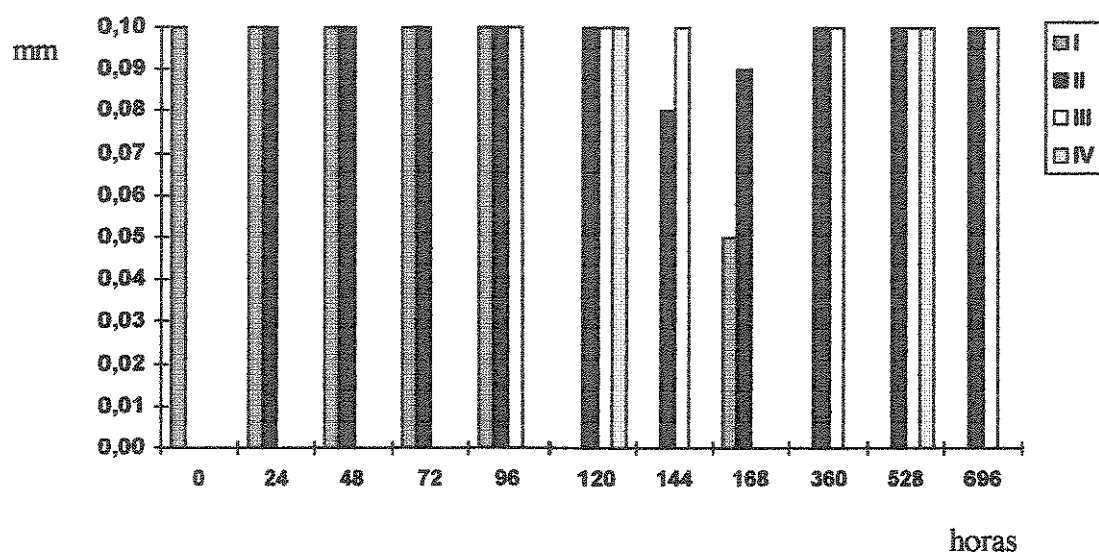


Fig. 12 Largura do Ístmo

0 hora Est. I n= 7

144 horas Est. II n= 5

24 horas Est. I n= 2

Est. III n= 1

Est. II n= 5

168 horas Est. I n=1

48 horas Est. I n= 2

Est. II n= 5

Est. II n= 4

360 horas Est. II n= 4

72 horas Est. I n= 1

Est. III n= 2

Est. II n= 5

528 horas Est. II n= 2

96 horas Est. I n= 1

Est. III n= 3

Est. II n= 2

Est. IV n= 1

Est. III n= 3

696 horas Est. II= 4

120 horas Est. II n= 3

Est. III n= 2

Est. III n= 2

Est. IV n= 1

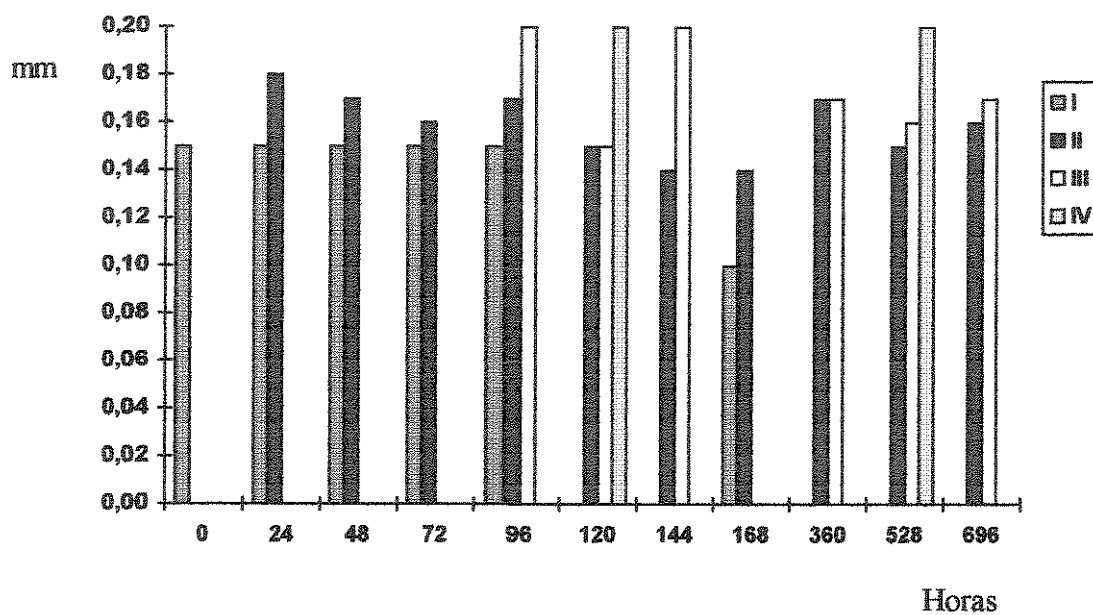


Fig. 13 Largura do Fundo

0 hora Est. I n= 7

144 horas Est. II n= 5

24 horas Est. I n= 2

Est. III n= 1

Est. II n= 5

168 horas Est. I n=1

48 horas Est. I n= 2

Est. II n= 5

Est. II n= 4

360 horas Est. II n= 4

72 horas Est. I n= 1

Est. III n= 2

Est. II n= 5

528 horas Est. II n= 2

96 horas Est. I n= 1

Est. III n= 3

Est. II n= 2

Est. IV n= 1

Est. III n= 3

696 horas Est. II= 4

120 horas Est. II n= 3

Est. III n= 2

Est. III n= 2

Est. IV n= 1

4.4. Número de Células das Glândulas Sexuais Acessórias

Na Tabela 12 são apresentados os valores médios do número de células obtidos nos estágios de I a X.

Tabela 12 - Valores médios do número de células das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria* nos diferentes estágios da ovogênese

Estágio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
x	534	531,2	567,6	569,6	534,5	562,7	546,8	555	582,8	574,4
s	61,5	88	72,1	98,1	104	83,7	41,9	49,1	62,2	66,1
n	3	4	14	19	10	11	5	3	7	11

O número médio obtido considerando-se todas as contagens efetuadas é 561,2 células por glândula e desvio padrão igual a 77,54.

4.4.1. Testes Estatísticos para o Número de Células

As análises apresentadas nas Tabelas 13 e 14 mostram que o número de células permanece inalterado durante a ovogênese.

Tabela 13 - Análise de Variância (ANOVA) para Número de Células das Glândulas Sexuais Acessórias de fêmeas de *C. putoria*

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Entre os grupos	3166,13	3	1055,37	0,1632	0,95
Dentro dos grupos	536426,56	83	6462,97		
Total	539592,69	86			

Tabela 14 - Número médio de células das glândulas sexuais acessórias em cada grupo de vitelogênese

Grupo	PR	IV	VA	OV
Nº. de Células x	544,29 (A)*	555,62 (A)	561,55 (A)	574,45 (A)

*para cada grupo, médias seguidas da mesma letra, não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan.

PR - pré-vitelogênese; IV - início de vitelogênese; VA - vitelogênese avançada; OV - ovo.

4.5. Estrutura Histológica e Histoquímica das Glândulas Sexuais Acessórias

4.5.1. Morfologia das Glândulas Sexuais Acessórias

As glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* são constituídas por duas porções, uma secretora e outra ductal (Fig. 14). A porção secretora possui células grandes, que apresentam núcleos grandes ocupando 1/3 de seu maior eixo e estão em posição basal na maioria das células. Estas células apresentam vesículas em sua região apical, ou seja, mais próxima ao lúmen, e células pequenas junto a este (Fig. 15). Vê-se ainda nesta Figura, que a periferia das vesículas geralmente cora-se pouco. Os núcleos estão, na grande maioria das vezes, dispostos proximamente às vesículas. Apenas em um corte foi observado o núcleo em posição apical. As vesículas por sua vez, aumentam de tamanho com o decorrer do crescimento.

As células pequenas, junto ao lúmen, constituem um epitélio. As glândulas são revestidas internamente em sua totalidade por um material resistente, que em alguns cortes se mostra intacto (Fig. 16) e em outros fragmentado (Fig. 17). É regra geral entre os insetos possuir cutícula revestindo o interior de muitos dos seus órgãos de origem ectodérmica. Admite-se então, que este material resistente representa também, neste caso, a cutícula. A porção ductal da glândula sexual acessória (Fig. 17) comunica a porção secretora com a vagina e possui células alongadas na região próxima à porção secretora. Externamente à porção secretora há uma membrana basal (Fig. 18). Esta última Figura mostra o citoplasma das células secretoras muito granulado.

A Figura 19 mostra as células que formam o duto dispostas à volta da luz deste. Na Figura 20 pode-se observar um material filamentosso no lúmen que não foi notado nas outras fases de desenvolvimento. As Figuras 21 e 22 mostram um corte transversal do que se acredita

ser o aparelho terminal com seu duto que drena a secreção da vesícula ao lúmen. O aparelho terminal é composto por uma porção dilatada dentro da vesícula e um duto que realiza a drenagem do conteúdo desta ao lúmen. Na Figura 22 podemos observar que o duto tem um trajeto sinuoso em direção ao lúmen e próximo à cutícula ocorre uma ramificação. O limite entre o citoplasma das células secretoras e o duto é bem definido.

As Figuras 28 e 29 correspondem a esmagamentos das glândulas sexuais acessórias em estágios IV e X e mostram as regiões organizadoras nucleolares marcadas pela prata. No estágio IV observam-se núcleos com 1, 2 ou 3 nucléolos de contorno irregular, enquanto que no estágio X são vistos núcleos que apresentam 3 ou 4 nucléolos de contorno bem definido e dimensões variadas.

4.5.2. Histoquímica das Glândulas Sexuais Acessórias

No corte histológico corado por hematoxilina/floxina da Figura 18 observa-se que o citoplasma das células da porção secretora é basófilo, indicando atividade sintética. Esta basofilia esteve presente em todos os estágios. A região periférica da vesícula presente nestas células é fracamente corada pela hematoxilina/floxina, e a cutícula não se cora por este método.

A coloração com "fast green" mostrou forte positividade no citoplasma das células secretoras em todos os estágios e as vesículas coraram-se fracamente (Fig. 19). No lúmen da glândula, foi observada uma tênue coloração com aspecto granular em todos os estágios, exceto no X. Observou-se em glândulas correspondendo ao estágio X que há um material filamentososo e emaranhado no lúmen e que se corou por este método.

A cutícula foi corada pelo "fast green" em sua região mais externa (em contato com o epitélio). Alguns cortes atingiram a parte mais alta do lúmen, nos quais observou-se a cutícula ocupando todo sua luz, representando então, uma calota. Nesta calota pôde-se observar perfurações que são aberturas do duto no lúmen.

O conteúdo da vesícula presente nas células secretoras cora-se fracamente pelo azul de toluidina (Fig. 20). Já o citoplasma das células secretoras cora-se fortemente pelo azul de toluidina (Fig. 21) indicando a presença de substâncias com radicais negativos tal como ácido ribonucleico e, portanto, atividade sintética, além da presença de açúcares ácidos.

As Figuras 23, 24, 25 e 26 correspondem respectivamente aos estágios II, VI, VIII e IX e foram coradas pelo método de PAS. Na Figura 23 vê-se a estrutura que se acredita ser o ductulo do aparelho terminal que neste caso é PAS positivo. Apenas no estágio VI o conteúdo da vesícula cora-se por este método (Fig. 24) e vê-se que o conteúdo do lúmen também reage positivamente. A membrana que reveste a glândula é positiva, no entanto, fracamente (Fig. 25). Ainda na Figura 25, que corresponde ao estágio VIII, observa-se o conteúdo do lúmen positivo, perfurações no revestimento do lúmen, que são aberturas dos ductulos, e granulações PAS positivas nas células do duto. No lúmen se observa um material granuloso (Fig. 26) e aspecto idêntico ao observado quando da coloração por "fast green". Em todos os estágios, o citoplasma das células secretoras é fracamente corado pelo método de PAS (Fig. 26).

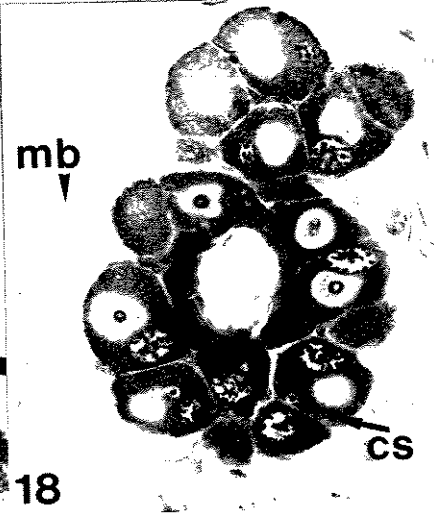
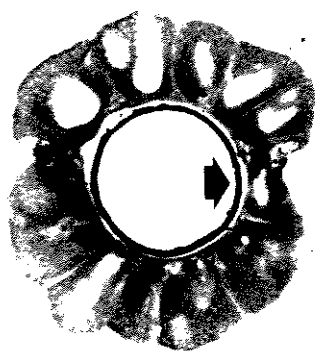
A digestão com RNase e posterior coloração com azul de toluidina pH 4.0 (Fig. 27) indicou, pela ausência de coloração, que o conteúdo do citoplasma das células da porção secretora é rico em RNA, pois não se obteve a mesma reatividade mostrada na Figura 21, por exemplo, onde não houve tratamento por RNase e observa-se o citoplasma das células secretoras fortemente corado.

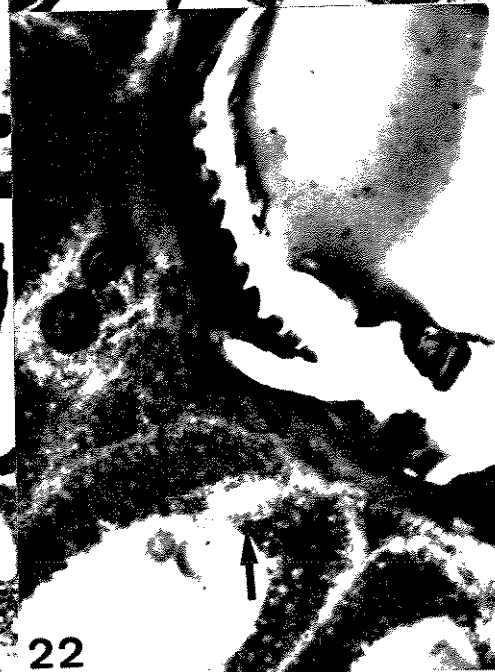
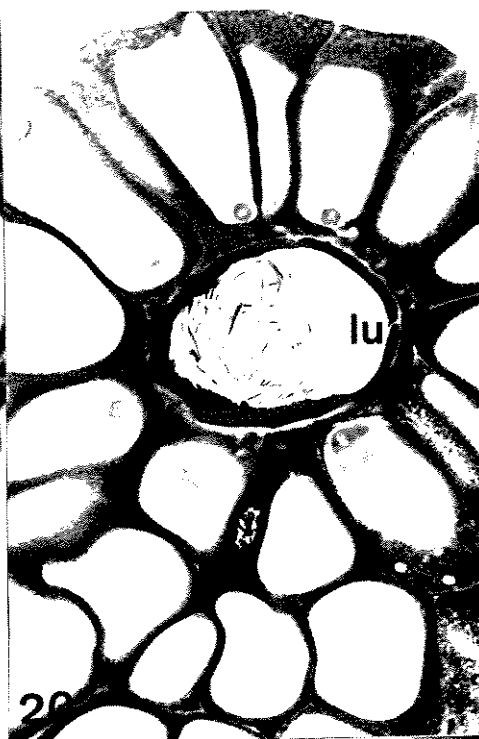
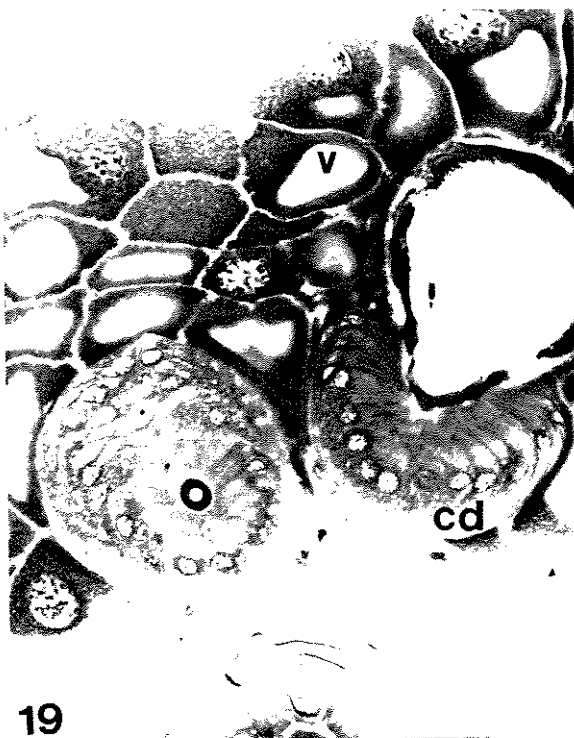
A Tabela 15 reúne os resultados dos testes histoquímicos empregados.

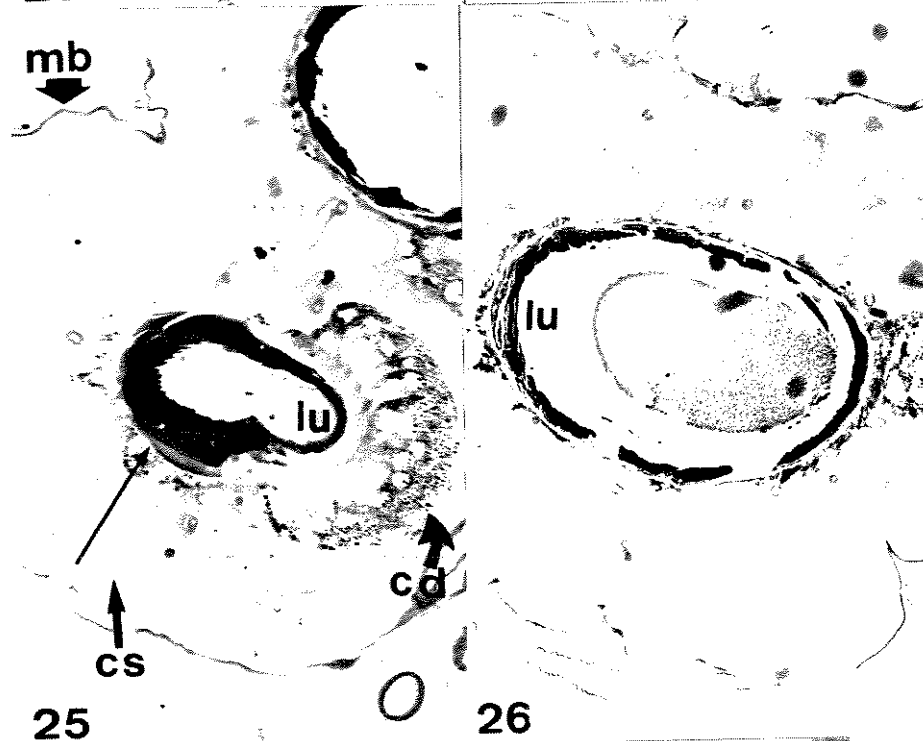
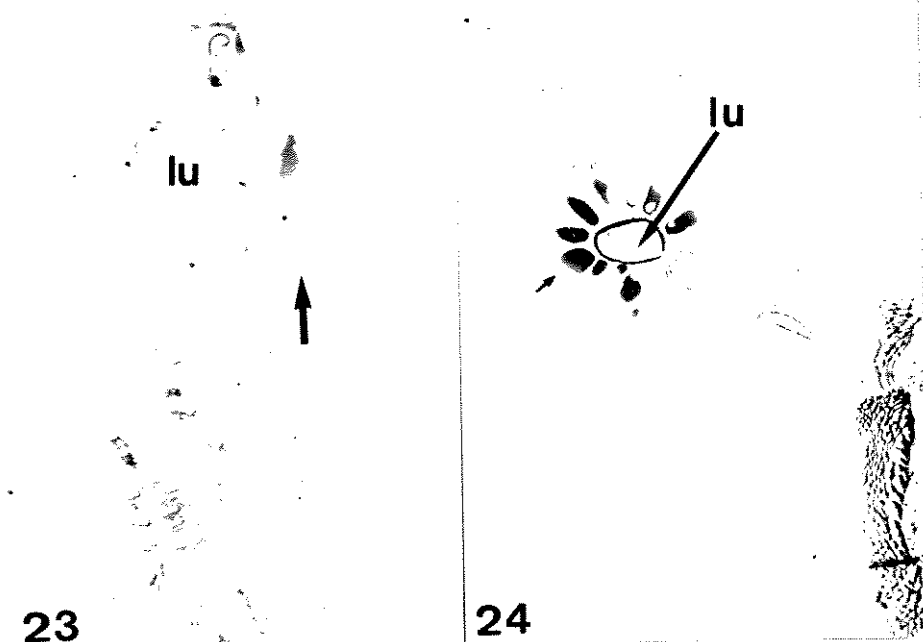
Tabela 15 - Indicação da reatividade dos diferentes componentes das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* aos métodos de coloração

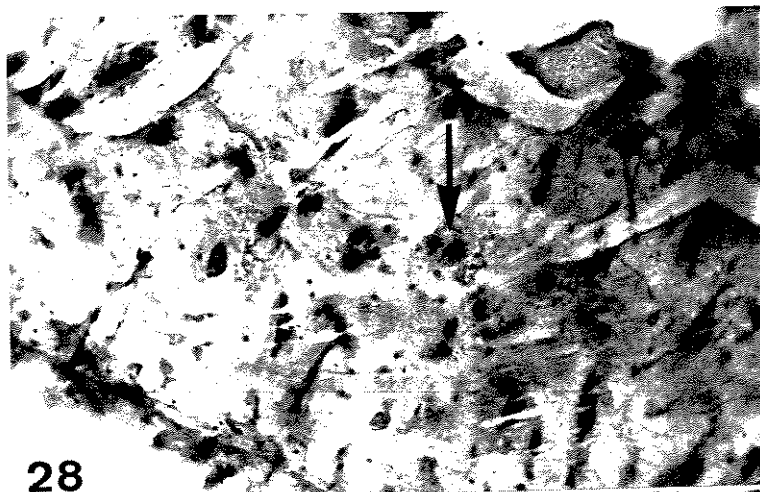
	Hematoxilina/ floxina	"Fast green"	Azul de toluidina		PAS
			s/ RNase	c/ RNase	
Citoplasma das células secretoras	+++	+++	+++	—	+
Vesícula	+	+	+	+	+++ (a)
Lúmen	+	+	+	— (b)	+
Cutícula	—	++	+	++	+

+++ forte; ++ mediano; + fraca; — sem coloração; (a) coloração apenas no estágio VI; (b) este resultado pode ser devido à artefato de técnica.

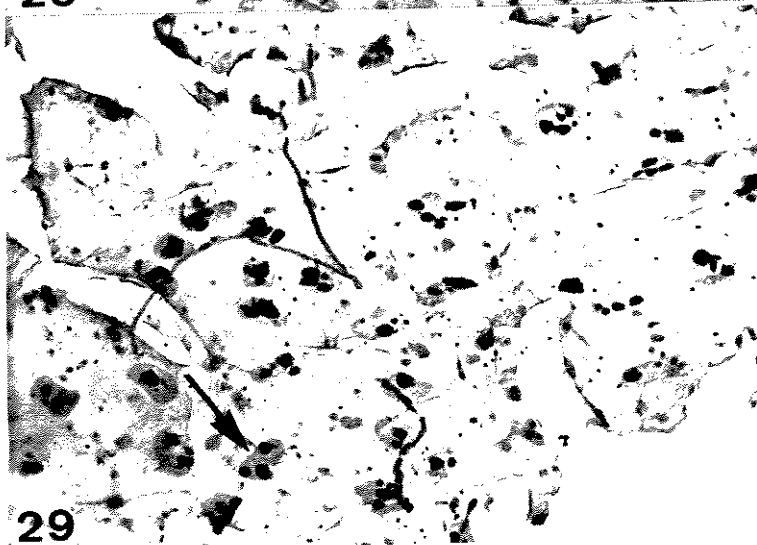








28



29

5. DISCUSSÃO

O número e forma das glândulas sexuais acessórias observados em *C. putoria* (Fig. 2) estão dentro do padrão descrito para outras moscas do mesmo gênero como *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) (Jamil, 1986), *C. megacephala* (Sareen et alii, 1985; Bansal & Murad, 1987) e *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) (Spradbery & Sands, 1976). De modo geral são estruturas tubulares com um duto que comunica-as com a vagina (Fig. 5) (Imms, 1964).

5.1. Medições das Glândulas Sexuais Acessórias

Os dados do presente estudo estão em concordância com os de autores que estudaram o desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias de outros dípteros submetidos a dieta proteica, já que crescimento das glândulas foi sempre observado.

A dieta proteica oferecida por 3 horas diárias às fêmeas de *C. putoria*, proporcionou crescimento das glândulas sexuais acessórias concomitante ao desenvolvimento dos folículos ovarianos em um período médio de 192 horas ao final do qual há presença de folículos maduros ("ovos") nos ovários. Clift & McDonald (1973), trabalhando com fêmeas da mosca *Lucilia cuprina*, observaram crescimento e atividade secretora das glândulas sexuais acessórias após um período de 51 a 54 horas a partir da emergência, coincidindo com a deposição de vitelo nos ovários. Estes autores forneceram dieta proteica por 3 dias consecutivos. Em nosso estudo, a

deposição inicial de vitelo (estágio IV) foi observada após 96 horas em média e a dieta proteica foi fornecida por apenas 3 horas ao dia.

As medidas de "comprimento total" e "largura do ístmo", 2,13 mm e 0,23 mm respectivamente das glândulas sexuais acessórias de **C. putoria** correspondendo a estágio IX foram as maiores obtidas. Estas medidas podem corresponder às mesmas observadas nas glândulas sexuais acessórias de fêmeas de **Chrysomya megacephala** por Sareen e colaboradores (1985) que medem 2mm x 0,15 mm. No entanto, estes autores quando coletaram as moscas utilizando carne decomposta, não mencionaram quais regiões foram medidas, nem indicam qual a idade fisiológica dos espécimes. Assim, não podemos afirmar que as duas espécies têm tamanho de glândulas sexuais semelhante.

O crescimento das glândulas sexuais acessórias de **C. putoria**, em todas as suas dimensões, até o fim da fase de vitelogênese avançada, e ausência, quando se compara esta fase com ovo, nos diz que a glândula pára de crescer quando atinge esta última fase, mas também não diminui, como mostrado pelos testes estatísticos. A diminuição, embora não significativa, observada em todas as dimensões na fase de ovo (Figs. 6 a 9) pode representar início de eliminação da secreção. O maior crescimento relativo observado, 3,5X da região "comprimento do fundo", pode significar que esta região possui atividade sintética mais intensa.

As glândulas sexuais acessórias de **Phormia regina** desenvolveram-se em 6 dias quando os ovários também o fizeram (Stoffolano, 1974). Este autor forneceu uma dieta proteica 24 horas ao dia.

Em **Rhagoletis pomonella**, Webster & Stoffolano (1978) verificaram que o comprimento das glândulas sexuais acessórias aumentou 2,3 vezes entre o primeiro e o décimo terceiro dia após a emergência. A presença de vitelo nos folículos e lúmen bem definido das glândulas foi observado no sexto dia. O aumento de 1,85 vezes na dimensão "comprimento total" observado em nosso estudo, está de acordo com o observado pelos autores citados acima,

apesar de serem espécies muito diferentes. Estes valores indicam a necessidade de fonte proteica para o desenvolvimento das glândulas sexuais.

Rosay (1968) trabalhando com *Culex pipiens quinquefasciatus* e *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) verificou que a dieta proteica favoreceu o crescimento da glândula ao longo da ovogênese e o tamanho máximo da glândula foi atingido quando o "ovo" estava pronto.

Rossignol e colaboradores (1977) trabalhando com *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) verificaram que as glândulas aumentam de tamanho junto com o desenvolvimento ovariano até o estágio IV. Estes autores utilizaram a classificação de Russel e colaboradores (1963) para avaliar os estágios de desenvolvimento dos ovários.

Quando da maturidade sexual, o que ocorre em 5 dias, as glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *Ceratitis capitata* também já cresceram. Neste momento, o reservatório (denominação dada pelos autores à vesícula) mede 0,8 mm de largura e 1,1 mm de comprimento (Dallai et alii, 1985).

Dallai e colaboradores, (1986) não observaram qualquer secreção em *C. capitata* à emergência mas o desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias de fêmeas ocorre independentemente de haverem copulado, junto com o desenvolvimento ovariano (Dallai et alii, 1985).

Em *R. pomonella*, Webster & Stoffolano (1978) verificaram que o comprimento das glândulas sexuais acessórias, submetidas à dieta proteica, aumenta juntamente com o dos folículos ovarianos. O crescimento das glândulas foi mais acentuado neste inseto a partir do sexto dia, quando também se observou deposição de vitelo nos folículos e todas as fêmeas examinadas possuíam o lúmen das glândulas bem definido. Em nosso estudo observou-se o lúmen bem definido sempre a partir do estágio IV, o que corresponde a início de deposição de vitelo ocorrendo em torno de 96 horas (4 dias pós emergência).

5.2. Medidas Após a Oviposição

A diminuição de tamanho das glândulas sexuais acessórias após a oviposição já foi relatada por alguns autores, sendo que alguns demonstraram-na (Rosay, 1968; Rossignol et alii, 1977) e outros apenas a citam (Sareen et alii, 1985).

A comparação dos valores médios de cada região do grupo "ovo" da Tabela 9 e as mesmas regiões mostradas na Tabela 10 das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria*, mostra não haver diferença especialmente quando se compara com os dados referentes ao estágio IV desta última Tabela. O teste "t" mostrado na Tabela 11 indica que a glândula não se esvazia totalmente após a postura, momento em que o segundo folículo está em estágio IV. Em relação ao estágio V, verifica-se que a glândula diminui mais de tamanho em relação ao estágio IV (Tab. 10) porém, a diferença observada não é significativa.

Podemos levantar a hipótese de que, ao atingir o estágio IX do primeiro ciclo ovariano, ocorre interrupção da produção de secreção, início de eliminação, ainda que não significativa, e no decorrer do segundo ciclo ovariano (já iniciado), e nos subseqüentes, a glândula utiliza a secreção produzida no primeiro ciclo.

Após a oviposição, as glândulas de *C. megacephala* diminuem de tamanho e esvaziam-se (Sareen et alii, 1985). Estes autores não mostram nada que confirme, nem citam qual o número de oviposições prévias da mosca. Assim, não podemos assegurar que esta espécie e *C. putoria* apresentam semelhança neste aspecto do desenvolvimento.

Após uma hora da primeira postura em *C. p. quinquefasciatus*, a glândula diminui de tamanho. Após 2 horas a glândula diminuiu ainda mais, atingindo valor intermediário aos estágios I e II do desenvolvimento ovariano deste inseto. Depois desta primeira postura a glândula volta a se encher, atingindo dimensões maiores que antes da primeira postura. Após 24 horas da postura de um segundo grupo de ovos, novo esvaziamento ocorreu sendo que o

tamanho da glândula ficou entre aqueles registrados para os estágios I e II. O autor adotou os critérios de Christophers (1911) para determinação do desenvolvimento ovariano (Rosay, 1968).

Em *C. p. pipiens* após 48 horas de oviposição do primeiro ciclo ovariano a glândula diminui de tamanho mas não da mesma forma que em *C. p. quinquefasciatus*. No estágio V do desenvolvimento do primeiro ciclo ovariano em *C. p. pipiens* e 48 horas após a oviposição notou-se diminuição em relação ao estágio IV. A classificação do desenvolvimento ovariano destes insetos inclui cinco estágios (Rosay, 1968).

Após a postura de um primeiro grupo de ovos por *A. aegypti* as glândulas diminuem de tamanho indicando relação entre desenvolvimento ovariano e crescimento das glândulas sexuais acessórias (Rossignol et alii, 1977).

5.3. Crescimento das Glândulas Sexuais Acessórias sob Dieta Aproteica

A quase ausência de crescimento das glândulas sexuais acessórias em fêmeas submetidas à dieta aproteica observado neste estudo, também foi notada por Clift & Mc Donald (1973) na mosca *L. cuprina*, por Stoffolano (1974) em *P. regina*, por Rosay (1968) em *C. p. quinquefasciatus* e por Webster & Stoffolano (1978) em *R. pomonella*.

Em se confirmando a relação entre crescimento das glândulas sexuais acessórias e desenvolvimento dos folículos em *C. putoria*, a ausência de crescimento das glândulas sexuais acessórias no presente estudo era prevista, já que ausência de desenvolvimento dos folículos ovarianos era conhecida (Avancini, 1988b). Ao se atingir 96 horas do tratamento aproteico não se observou alteração de tamanho nas dimensões das glândulas sexuais acessórias nem os

foliculos apresentavam sinais de deposição de vitelo. Porém, com o mesmo número de horas, sob dieta proteica, a deposição de vitelo foi observada e o lúmen era bem definido.

5.4. Número de Células

Nossos dados mostram que o número de células presentes nas glândulas sexuais acessórias não varia ao longo do seu crescimento. Cada glândula possui em média $561,2 \pm 77,54$ células. Na literatura encontram-se poucos dados sobre o número de células, impossibilitando, assim, uma comparação. Encontrou-se apenas os dados de Rossignol e colaboradores (1977) para *A. aegypti* cujo número gira em torno de 15 a 20 células. Devemos lembrar, no entanto, que este díptero é um mosquito (Nematocera), portanto, bem distante filogeneticamente de *C. putoria*, e com dimensões corporais menores.

Portanto, a glândula cresce, não por aumento do número de células, mas em consequência da atividade sintética de suas células e aumento de suas dimensões e armazenamento da secreção na vesícula e/ou lúmen.

5.5. Morfologia e Histoquímica

A estrutura das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* por nós observada parece ser comum aos poucos dípteros onde tal estudo já foi realizado. Assim, as células das glândulas sexuais acessórias que produzem a secreção são chamadas de células glandulares por se constituírem verdadeiramente em uma unidade secretora, como também observado por Sareen e

colaboradores (1985) na mosca *C. megacephala*, e liberarem seu produto no lúmen que possui um revestimento cuticular, como se observa no mosquito *Hippelates collusor* (Adams & Mulla, 1967).

A presença de células grandes, perfeitamente individualizadas, com núcleos também grandes, demonstrando assim atividade secretora, e células menores em *C. putoria*, está em desacordo com as observações de Bansal & Murad (1987) que afirmam ter a glândula de *C. megacephala* um epitélio sincicial. Se a afirmação destes autores fosse também observada em nosso estudo, não seria possível se efetuar a contagem de células. Nossas observações quanto à estrutura histológica encontram acordo com as observadas em *C. megacephala* por Sareen e colaboradores (1985).

Os dois tipos celulares que encontramos na porção secretora, células grandes secretoras e células pequenas junto ao lúmen, também foram descritos por Dallai e colaboradores (1985) na mosca *C. capitata*, por Sareen e colaboradores (1985) e Bansal & Murad (1987) ambos na mosca *C. megacephala*, por Rosay (1968) em *C. p. quinquemfasciatus* e *C. p. pipiens*, sendo que este autor diz que junto ao lúmen "há grandes grânulos ou células que assemelham-se às do duto da glândula". Jamil (1986) afirmou que uma das glândulas sexuais acessórias de *C. rufifacies* possui corpos esféricos. Tais estruturas não foram observadas por nós no presente estudo.

O citoplasma das células secretoras das glândulas sexuais de *C. putoria* observado neste estudo é granular assim como observado em *C. megacephala* por Sareen & colaboradores (1985). Bansal & Murad, (1987) afirmaram que o citoplasma de *C. megacephala* é vacuolizado. Devemos lembrar que estes últimos autores utilizaram cortes com 5 a 7 μm e as glândulas foram incluídas em parafina. A inclusão em resina empregada no presente estudo e cortes com 2 μm permitem melhor resolução e a vacuolização observada pelos últimos autores pode ser devido a artefato de técnica.

As células secretoras das glândulas sexuais de *C. putoria* possuem em sua região apical uma grande vesícula, não descrita por Bansal & Murad (1987) em *C. megacephala*, onde, em alguns casos, pode-se ver sua comunicação com o lúmen. Tal vesícula também foi observada por Sareen e colaboradores (1985) nesta última mosca. A presença de membrana basal é comum às duas espécies.

Rossignol e colaboradores (1977) identificaram duas regiões distintas das glândulas sexuais acessórias: uma secretora e outra ductal. A porção secretora possui células grandes e células pequenas cuticulogênicas que estão junto ao lúmen, exibindo portanto o mesmo padrão observado por nós no presente estudo.

A presença de vesículas nas células secretoras das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* também foi notada em outros dípteros. Em *A. aegypti*, Rossignol e colaboradores (1977) utilizando técnicas de microscopia eletrônica puderam observar que as células maiores (secretoras) envolvem grandes cavidades extracelulares, revestidas por microvilos e contendo material granular.

A região menos corada nas vesículas das células secretoras das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* pode representar as microvilosidades verificadas por Dallai e colaboradores (1985; 1986) ao trabalharem com *C. capitata*. Tais estruturas são vistas nas células secretoras das glândulas de *Periplaneta americana* (Lane & Flores, 1990). A presença de células com vesículas apicais cuja membrana possui microvilosidades ocorre na maioria dos insetos (Noirot & Quennedey, 1974).

A presença de células epiteliais junto ao lúmen das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* observada na Figura 19 mostra haver correspondência com as encontradas em glândulas sexuais acessórias de outros insetos como *P. americana* (Lane & Flores, 1990).

O conteúdo do lúmen das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* é finamente granular e algumas vezes filamentosos. Sareen e colaboradores (1985) verificaram o mesmo aspecto granular no lúmen das glândulas de *C. megacephala*, mas em nenhum dos dois casos

observou-se vacuolização como observado por Bansal & Murad (1987) nesta última mosca. Devemos considerar a possibilidade de ter ocorrido artefato de técnica no estudo destes últimos autores.

A presença de um material denso e viscoso, presente no lúmen, observada por Barr (1974) em glândulas sexuais de mosquitos, e por Sareen e colaboradores (1985) e por Bansal & Murad (1987) em *C. megacephala* também foi observada por nós quando da preparação para contagem do número de células.

A basofilia citoplasmática por nós observada nas células secretoras, indicando atividade sintética, encontra concordância com os resultados encontrados por Berry (1968) ao estudar as glândulas coleteriais do lepidóptero *Hyalophora cecropia*. Este autor utilizou técnicas de microscopia eletrônica e mostrou a presença de uma invaginação da extremidade apical da célula secretora e a presença de um tubo cuticular que é uma extensão do revestimento do lúmen.

A presença de uma membrana basal, revestindo externamente a glândula, cutícula, revestindo-a internamente e estruturas que drenam a secreção ao lúmen são características comuns aos insetos como lepidópteros, himenópteros, ortópteros e dípteros (Brunet, 1952; Berry, 1968; Dallai et alii, 1985; Blass & Ruthmann, 1989).

A cutícula presente nos insetos é composta por quitina, proteína, complexo quitina/proteína, lipídios, pigmentos, componentes inorgânicos e enzimas. A quitina é um polímero linear de N-acetilglicosamina. Na terminologia moderna é $\beta(1,4)$ - 2 acetamido-2-desoxy-D-glicose (Richards, 1978; Horton et alii, 1993).

A reação de PAS se baseia no fato de o ácido periódico oxidar ligações C-C em estruturas onde elas estão presentes como grupos 1:2 glicóis (CHOH-CHOH) convertendo-as em dialdeídos. Os grupos podem existir na forma cis ou trans (Pearse, 1968). A positividade muito fraca do revestimento do lúmen em todos os estágios, à reação de PAS para quitina, pode ser devido a alguns fatores como: 1- pouquíssimas moléculas, o que seria improvável pois quitina representa 25 a 50% do peso seco da cutícula (Richards, 1978); 2- ela estar complexada

com outros componentes não permitindo a reação; 3- ao fato de quitina ser linear e os grupos que reagiriam com o ácido periódico estarem presentes apenas nas extremidades da molécula impossibilitando sua visualização; 4- ao fato de os cortes serem finos não permitindo a visualização; 5- perda de material durante a preparação.

Não podemos afirmar que o revestimento do lúmen das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* seja quitinoso apenas, mas é cuticular, já que a cutícula reveste internamente dutos de glândulas de insetos e outros órgãos (Richards, 1978) e sua composição inclui 20 a 50 % de quitina (Chapman, 1982).

A positividade ao método de PAS apresentada pelas vesículas presentes nas células secretoras apenas no estágio VI, pode ser devida ao arranjo de alguma molécula glicídica, assim proporcionando a coloração. Nos outros estágios as moléculas poderiam não estar disponíveis à coloração ou até terem sido perdidas durante a preparação desta forma impossibilitando a positividade da reação. No entanto, deve-se lembrar que Dallai e colaboradores (1985) trabalhando com glândulas sexuais acessórias de *Ceratitis capitata* verificaram fraco conteúdo polissacarídico nas vesículas das células secretoras. Estes autores trabalharam com fêmeas de 1 a 5 dias de idade e verificaram que a secreção é descarregada e concentrada no lúmen das glândulas sexuais acessórias.

Se considerarmos que a negatividade ao método de PAS utilizado neste estudo, nas vesículas na maioria dos estágios, ser devida à ausência de grupos glicídicos, podemos afirmar que esta característica é comum a dípteros com biologias diferentes, como *C. capitata* (Dallai et alii, 1985).

Riley & Forgash (1967) indicaram reação PAS positiva para o conteúdo das glândulas sexuais acessórias de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) assim como para a substância adesiva presente nos ovos postos. Esta observação, nesta espécie, indica que as glândulas produzem material utilizado na fixação dos ovos ao substrato. A positividade do conteúdo do lúmen das glândulas sexuais acessórias ao método de PAS nos estágios VI, VIII e

IX de *C. putoria* indica a presença de moléculas glicídicas na composição. Em *C. megacephala*, Sareen e colaboradores (1985) relataram forte positividade do conteúdo do lúmen, que chamaram de grânulos secretores. No entanto, estes autores utilizaram formol como fixador, o que pode interferir no resultado, e não citaram a espessura dos cortes. A negatividade ao método nos outros estágios pode ser devido à indisponibilidade das moléculas ou à sua perda durante a preparação.

Considerando que as células secretoras produzem carboidratos, que as vesículas se coram apenas no estágio VI pelo PAS e que o conteúdo do lúmen também se cora, o aparelho terminal deve atuar sobre as moléculas permitindo então sua visualização no lúmen.

Podemos admitir a hipótese de que no estágio IX o conteúdo do lúmen estaria em sua etapa final de amadurecimento para posterior utilização na fixação dos ovos ao substrato ao relacionarmos a positividade neste estágio e os resultados obtidos por Riley & Forgash (1967) e lembrar que quando os ovos foram postos, estavam aderidos uns aos outros.

As células do duto mais próximas à porção secretora apresentaram reação positiva ao método de PAS. Esta observação representa a presença de glicídios, ligados ou não a proteínas, talvez glicogênio por se tratar de região ductal e ocorrer estrangulamento da luz da porção secretora das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria*. A presença de músculos envolvendo o duto foi sugerido por Rossignol e colaboradores (1977) em *A. aegypti* sugerindo que os músculos exerceriam pressão ao longo do duto. No presente estudo a presença de tais células seriam consideradas como mioepiteliais.

Lane & Flores (1990) chamam de canal secretor a estrutura que comunica as células secretoras e o lúmen. Indicam haver células, que se estendem do lúmen a um tecido conjuntivo (no lado externo da glândula) que contém poucas fibras musculares individuais em *P. americana*, servindo como suporte para as células secretoras.

A presença do aparelho terminal relatada por Noirot & Quennedey (1974) em vários insetos implica em haver uma perfuração na camada de cutícula comunicando a vesícula e o

lúmen. Em nosso estudo tais perfurações foram notadas, mostrando haver conformidade com os dados de literatura.

A comunicação da vesícula das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* com o lúmen é feita pelo dúctulo do aparelho terminal. Em *C. megacephala*, Sareen e colaboradores (1985) utilizando microscopia de contraste de fase puderam observar a drenagem da vesícula ao lúmen.

A coloração com "Fast green" indicou elevado conteúdo proteico no citoplasma das células secretoras, já que a coloração foi intensa. Sareen e colaboradores (1985) encontraram positividade para o conteúdo do citoplasma em *C. megacephala*. A positividade do citoplasma era esperada, já que se trata de tecido secretor.

A cutícula presente em todo o lúmen ao apresentar positividade ao método de "fast green" indica que existe proteína em sua composição, o que está em acordo com Richards (1978). A fraca coloração apresentada pelas vesículas e pelo conteúdo do lúmen das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* ao método de "fast green" pode ser devido a metabolização que as proteínas sofreram. A fraca coloração do lúmen também foi verificada por Riley & Forgash (1967) trabalhando com glândulas sexuais de *D. melanogaster*.

Os resultados obtidos com os métodos de "fast green" e PAS levam à interpretação de que o conteúdo das células é proteico em vez de glicoproteico. No entanto, devemos lembrar que a ausência de coloração pelo método de PAS por parte do citoplasma pode ser devido à indisponibilidade dos grupos que deveriam reagir positivamente.

Sareen e colaboradores (1985) demonstraram que o citoplasma das células secretoras de *C. megacephala* é rico em ribonucleoproteínas. Após obter-se resultado positivo ao método de "fast green" nas células da porção secretora das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria*, era esperado que a digestão com RNase e posterior coloração com azul de toluidina pH 4,0 demonstrasse a presença de RNA no citoplasma por se tratar de tecido secretor. A reação foi positiva, demonstrando atividade sintética das células. Por ter havido reação positiva à RNase, desconsideramos a presença de açúcares ácidos no citoplasma das células secretoras.

A positividade apresentada pela cutícula ao azul de toluidina antes e após o tratamento com RNase pode ser devida a radicais negativos presentes nas células epiteliais que estão próximas ao lúmen, ou artefato de técnica.

O número de nucléolos parece variar entre 1 e 3 no início de vitelogênese e, juntamente com a irregularidade de seus contornos, frouxidão da cromatina, positividade ao "fast green" e à digestão com RNase sugerem elevada atividade de síntese proteica nas células. Por outro lado, o contorno regular dos nucléolos observado no estágio X, quando o folículo está maduro indica atividade sintética diminuída. Em *C. megacephala* o número de nucléolos oscila de 1 a 5 (Sareen et alii, 1985). Em *A. aegypti*, Rossignol e colaboradores (1977) relatam a presença de um único nucléolo nas células secretoras.

6. CONCLUSÕES

As glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* crescem em todas as dimensões concomitantemente à ovogênese e, após a oviposição, as glândulas não diminuem significativamente de tamanho.

As fêmeas submetidas à dieta apróteica não apresentaram crescimento das glândulas sexuais acessórias.

O número de células das glândulas sexuais acessórias não se altera durante o seu crescimento.

As glândulas são compostas por duas regiões: uma secretora e outra ductal. A porção secretora possui células grandes com núcleos grandes. Há vesículas em sua região apical, e células menores junto ao lúmen. A presença de uma estrutura que drena a secreção da vesícula ao lúmen foi notada. O lúmen é revestido por um material resistente, que, a literatura indica ser cutícula. A porção ductal possui células alongadas em toda a extensão.

Os testes citoquímicos mostraram que as células secretoras são basófilas, possuem citoplasma fracamente PAS positivo, positivo para proteínas e indicaram a presença de RNA. A vesícula é fracamente basófila, possui pouco conteúdo proteico e não reagente ao PAS, exceto no estágio VI. Os núcleos das células secretoras têm cromatina frouxa e 3 ou 4 nucléolos.

O conteúdo do lúmen é glicídico e proteico.

Portanto, o crescimento é devido à atividade sintética das células que, aumentam de tamanho por produzirem secreção, armazenarem-na no citoplasma, vesícula e/ou lúmen.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T.S. MULLA, M.S. The reproductive biology of *Hippelates collusor* (Diptera: Chloropidae). I Morphology of the reproductive system, with notes on physiological aging. **Ann. Ent. Soc. Am.** 60(6): 1170-6, 1967.
- ADIYODI, K. G. & ADIYODI, G. G. Morphology and cytology of the accessory sex glands in invertebrates. **Int. Rev. Cytol.** 43: 353- 98, 1975.
- ALBERTS, B. , BRAY, D. , LEWIS, J. , RAFF, M. , ROBERTS, K. , & WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell.** 2nd Ed. Garland Publishing Inc. New York p.541, 1989.
- AVANCINI, R. M. P. Desenvolvimento nuclear de células tróficas ovarianas de *C. putoria* (Diptera: Calliphoridae). Campinas S. P. Tese de Doutorado 106 pág. Universidade Estadual de Campinas, 1988a.
- AVANCINI, R. M. P. The influence of non-protein diet on ovarian development in *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). **Revta. bras. Ent.** 32(2): 103-5, 1988b.
- 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.
- BANSAL, A. & MURAD, H. Morphology of the reproductive organ of the Oriental latrine fly, *Chrysomya megacephala* F.(Diptera, Calliphoridae). **Jpn. J. Sanit. Zool.** 38(3): 233-8, 1987.
- BARR, A. R. Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance V. Reproduction in Diptera of medical importance with special reference to mosquitoes. **J. Med. Ent.** 11(1): 35-40, 1974.
- BAUMGARTNER, D. L. & GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in the new world. **J. Med. Entomol.** 21: 105-13, 1984.

- BERRY, S. J. The fine structure of the colleterial glands of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera). **J. Morph.** 125: 259-80, 1968.
- BLASS, S. & RUTHMANN, A. Fine structure of the accessory glands of the female genital tract of the ichneumonid *Pimpla turionellae* (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology** 108: 367-77, 1989.
- BODNARYK, R. P. & MORRISON, P. E. The relationship between nutrition haemolymph proteins, and ovarian development in *Musca domestica* L. **J. Insect Physiol.** 12: 963-76, 1966.
- BRUNET, P. C. J. The formation of the ootheca by *Periplaneta americana*. **Quart. J. Microsc. Sci.** 93(1): 47-69, 1952.
- BUYS, C. H. M. & OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. **Chromosoma (Berl.)**, 77: 1-11, 1980.
- CALLAHAN, P. S. & CASCIO, T. Histology of the reproductive tracts and transmission of sperm in the corn earworm, *Heliothis zea*. **Ann. Ent. Soc. Amer.** 56: 535-56, 1963.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects - Structure and Function**. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, 3rd ed., p. 333, 1982.
- CHAYEN, J. & BITENSKY, L. **Practical Histochemistry**. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 2nd ed. p. 51, 1991.
- CLIFT, A. D. & McDONALD, F. J. D. Morphology of the internal reproductive system of *Lucilia cuprina* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae) and a method of determining the age of both sexes. **Int. J. Morphol. & Embryol.** 2(4): 327-33, 1973.
- COOK, D. F. Ovarian development in the females of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) fed on sheep faeces and the effect of ivermectin residues. **Bull. Entomol. Res.** 81: 249-56, 1991.

- DALLAI, R. , DEL BENE, G. , FANCIULLI, P. P. & MELIS-PORCINAI, G. Fine structure of the female reproductive accessory glands in the Dipteran *Ceratitis capitata* Wied. **Redia**. **68**: 189-97, 1985.
- DALLAI, R. , DEL BENE, G. , FANCIULLI, P. P. , MELIS-PORCINAI, G. , GALLAINI, G. & MARCHINI, D. Further data on the ultrastructure and the secretory products of the female accessory glands of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Intern. Symp. Fruit Flies/Crete Sept.** p. 61-70, 1986.
- DALLAI, R. , MARCHINI, D. & CALLAINI, G. Microtubule and microfilament distribution during the secretory activity of an insect gland. **Journal of Cell Science** **91**: 563-70, 1988.
- DEGRUGILLIER, M. E. In vitro release of house fly, *Musca domestica* L. , (Diptera: Muscidae), acrosomal material after treatments with secretion of female accessory gland and micropile cap substance. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** **14**(6): 381-91, 1985.
- DEGRUGILLIER, M. E. & GROSZ, S. G. Effects of female accessory gland ablation on fertility of screwworms, stable flies, and face flies. **Ann. Ent. Soc. Am.** **74**(2): 217-21, 1981 .
- DEGRUGILLIER, M. E. & LEOPOLD, R. A. Ultrastructure of sperm penetration of housefly eggs. **J. Ultrastruct. Res.** **56**: 312-25, 1976.
- DERENZINI, M. , THIRY, M. , & GOESSENS, G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. **J. Histochem. Cytochem.** **38**(9): 1237-56, 1990.
- de WILDE, J. & de LOOF, A. Biology of the Insecta In: M. Rockstein. **The Physiology of Insecta**. New York, Academic Press, 1973 p. 12-20 v. 1.
- DOUGHERTY, M. J. WARD, R. D. & HAMILTON, G. Evidence for the accessory glands as the site of production of the oviposition attractant and/or stimulant of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J. Chem. Ecol.** **18**(7): 1165-75, 1992.

- GILLOTT, C. Arthropoda-Insecta In: K. G. Adiyodi & R. G. Adiyodi (eds.) **Reproductive Biology of Invertebrates**. John Wiley and Sons, Chichester, V. III p. 371-84, 1988.
- GOODMAN, T. , MORRISON, P. E. & DAVIES, D. M. Cytological changes in the house fly fed milk and other diets. **Can. J. Zool.** **46**: 409-27, 1968.
- GRAHAM-SMITH, G. S. The generative organs of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (L), with special reference to their musculature and movements. **Parasitology** **30**: 441-76, 1938.
- GRAYSON, B. & BERRY, S. J. Synthesis and intracellular transport of protein by the coelenteral gland of the cecropia silkworm. **Develop. Biol.** **38**: 150-6, 1974.
- GREENBERG, B. & POVOLNÝ, D. Bionomics of Flies. In GREENBERG, B. **Flies and Disease**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, V. I p. 60, 1971.
- GREENBERG, B. & SZYSKA, M. L. Immature stages and biology of fifteen species of peruvian Calliphoridae flies(Diptera). **Ann. Ent. Soc. Am.** **77**(5): 488-517, 1984.
- GUIMARÃES, J. H. , PRADO, A. P. , & LINHARES, A. X. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.** **22**(1): 53-60, 1978.
- GUIMARÃES, J. H. , PRADO, A. P. & BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revta. bras. Ent.** **23**(4): 245-55, 1979.
- HERAEUS-KULZER. Staining procedures for tissues embedded in 2-Hydroxyethyl Metacrylate by P. O. Gerrits. 1990.
- HOPKINS, T. L. & KRAMER, K. J. Insect cuticle sclerotization. **Annu. Rev. Entomol.** **37**: 273-302, 1992.
- HORTON, H. R. , MORAN, L. A. , OCHS, R. S. , RAWN, J. D. & SCRIMGEOUR, K. G. **Principles of Biochemistry**. Neil Patterson Publishers/Prentice-Hall, Inc. New Jersey, p. 21. 1993

- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** **36**: 1014-5, 1980.
- IMMS, A. D. **A General Textbook of Entomology** Methuen & Co. Ltd. 9th ed. , London. p. 252-649. 1964
- JAMES, M. T. **The Flies That Cause Myiasis in Man**. United States Department of Agriculture. Miscellaneous Publications n°. 631 Washington, D. C. September 1947.
- JAMIL, N. Internal reproductive organs of the sheep blowfly **Chrysomya rufifacies** Macq. (Diptera: Calliphoridae). **J. Anim. Morphol. Physiol.** **33**(1-2): 87-92, 1986.
- JORDAN, G. At the heart of the nucleolus. **Nature** **329**: 489-90, 1987.
- JUDD, S. R. , LEOPOLD, R. A. , & TURNER, R. B. Characteristics of the aminopeptidase activity of female housefly reproductive accessory glands. **Int. J. Invertebr. Repr.** **6**: 93-8, 1983.
- KETTLE, D. S. **Medical and Veterinary Entomology**. John Wiley & Sons, New York, p. 241-61. 1984
- KING, R. C. & BÜNING, J. The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. In KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I. **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology** Pergamont Press, vol. 1 Embriogenesis and Reproduction., 1985.
- LANE, N. J. & FLORES, F. The role of cytoskeletal components in the maintence of intercellular junctions in an insect. **Cell Tissue Res.** **262**: 373-85, 1990.
- LAURENCE, B. R. Old world blowflies in the new world. **Parasitology 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): 41-4, 1982.

- LEOPOLD, R. A. Accessory reproductive gland involvement with the sperm-egg interaction in muscoid flies. In: W. H. Clark, Jr. , & T. S. Adams, (eds.). **Advances in Invertebrate Reproduction**. Elsevier North Holland, Inc. , p. 253-70, 1980.
- LEOPOLD, R. A. & DEGRUGILLIER, M. E. Sperm penetration of housefly eggs: evidence for involvement of a female accessory secretion. **Science**. **181**: 555-7, 1973.
- LIMA, M. L. P. S. & LUZ, E. Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogênicas em Curitiba, Paraná, Brasil. **Acta Biol. Par.** , Curitiba, **20**(1, 2, 3, 4): 61-83, 1991.
- LINHARES, A. X. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Revta. bras. Ent.** **25**(3): 189-215, 1981.
- LINHARES, A. X. & AVANCINI, R. M. P. Ovarian development in the blowflies *Chrysomya putoria* and *C. megacephala* on natural diets. **Med. Vet. Entomol.** **3**: 293-5, 1989.
- LIVINGSTONE, D. & YACOOB, M. H. S. Female accessory glands and sperm reception in Tingidae (Heteroptera). **Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)** **99**(6): 431-46, 1990.
- MARCHINI, D. , BERNINI, L. F. & DALLAI, R. β -N-Acetylhexosaminidase in the secretion of the female reproductive accessory glands of *Ceratitis capitata* (Diptera). **Insect Biochem.** **19**(6): 549-55, 1989.
- MARCHINI, D. , BERNINI, L. F. , MARRI, L. , GIORDANO, P. C. & DALLAI, R. The female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*: antimicrobial activity of the secretion fluid. **Insect Biochem.** **21**(6): 597-605, 1991.
- MARCHINI, D. , GIORDANO, P. C. , AMONS, R. , BERNINI, L. F. & DALLAI, R. Purification and primary structure of Ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the Medfly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). **Insect Biochem Molec. Biol.** **23**(5): 591-8, 1993.

- MARILUIS, J.C. Presencia del genero **Chrysomya** Robineau-Desvoidy, 1830 en la region Neotropical (Calliphoridae, Chrysomyiinae, Chrysomyiini). **Rev. Soc. Entomol. Argen.** 39: 126, 1980.
- MENDES, J. & LINHARES, A. X. Atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em várias espécies sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). **Revta. bras. Ent.** 37(1): 157-66, 1993.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Ann. Rev. Entomol.** 19: 61-80, 1974.
- OKAEME, A. N. Flies (Diptera) Infesting landed fresh water fishes of the Kainji Lake area, Nigeria. **Int. J. Zoon.** 13: 49-53, 1986.
- POVOLNÝ, D. Synanthropy. In GREENBERG, B. **Flies and Disease** Princeton University Press, vol. I New Jersey, p. 17-54, 1971
- PRADO, A. P. & GUIMARÃES, J. H. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero **Chrysomya** Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). **Revta bras.Ent.** 26(3/4): 225-31, 1982.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Williams and Wilkins Company. Baltimore. 3rd ed. p. 307-22, 1968.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Churchill Livingstone. Edinburgh, 4th ed. p. 632-3, 1985.
- RICHARDS, A. G. The chemistry of insect cuticle. In Rockstein, M. **Biochemistry of Insects** Academic Press, New York, p. 205-17, 1978.
- RIDDIFORD, L. M. & DHADIALLA, T. S. Protein synthesis by the milk gland and fat body of the Tsetse Fly, **Glossina pallidipes**. **Insect Biochem.** 20(5): 493-500, 1990.
- RILEY, R. C. & FORGASH, A. J. **Drosophila melanogaster** Eggshell adhesive. **J. Insect Physiol.** 13: 509-17, 1967.

- ROSAY, B. Accessory glands of female **Culex pipiens quinquefasciatus** Say and autogenous **Culex pipiens pipiens** L. (Diptera, Culicidae): appearance and behavior in relation to oögenesis. **J. Med. Ent.** 5(4): 478-82, 1968.
- ROSSIGNOL, P. A. , McIVER, S. B. & GOLDENBERG, M. Accessory reproductive gland of female **Aedes aegypti** : structure and relationship to oögenesis. **Ann. Ent. Soc. Am.** 70(2): 279-81, 1977.
- SAREEN, M. L. , THUKRAL, D. & GOYAL, S. Female accessory gland in **Chrysomya megacephala** and **Physiphora aenea** (Diptera). **Research Bulletin of the Panjab University** 36: 1-6, 1985.
- SAS INSTITUTE, INC. SAS, user's guide: Statistics. Version 6th ed. Cary, North Carolina. U. S. A., 1986.
- SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. McGraw-Hill Book Company, New York, p. 552-66, 1935.
- SPRADBERY, J. P. & SANDS, D. P. A. Reproductive system and teminalia of the old world screw-worm fly **Chrysomya bezziana** Villeneuve (Diptera: Calliphoridae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** 5(6): 409-421, 1976.
- STOFFOLANO Jr, J. G. Influence of diapause and diet on the development of the gonads and accessory reproductive glands of the black blowfly, **Phormia regina** (Meigen). **Can. J. Zool.** 52: 981-8, 1974.
- WAGNER, R. M. , WOODS, C. W. , HAYES, J. A. , KOCHANSKY, J. P. , HILL, J. C. & FRASER, B. A. Isolation and identification of a novel peptide from the accessory sex gland of the female house fly, **Musca domestica**. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 194(3): 1336-43, 1993.
- WALDER, J. M. & CALKINS, C. O. Gamma radiation effects on ovarian development of the caribbean fruit fly, **Anastrepha suspensa** (Loew) (Diptera: Tephritidae), and its relationship to sterile fly identification. **Florida Entomologist** 75(2): 267-71, 1992.

WEBSTER, R. P. & STOFFOLANO JR., J. G. The influence of diet on the maturation of the reproductive system of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *Ann. Ent. Soc. Am.* 71(6): 849-859, 1978.

WIGGLESWORTH, V. B. *The Principles of Insect Physiology*. Methuen, London, & CO LTD, p. 629-37, 1967.

WILKES, A. Sperm transfer and utilization by the Arrhenotokous Wasp *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Hymenoptera: Eulophidae) *Can. Entomol.* 97: 647-57, 1965.

ZUMPT, F. *Malaria in Man And Animals in The Old World*. Butterworths, London, p. 3, 1965.