

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T/UNICAMP	
T517c	
EV	
41817	
278/00	
G <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 05-07-00	
N.º CPD	

CM-00142791-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Tirone, Guido

T517c Glândulas sexuais acessórias de dípteros muscóideos: perfil protéico e atividade antibacteriana da secreção. Ultraestrutura de uma espécie (Calliphoridae, Muscidae & Sarcophagidae) Guido Tirone. - - Campinas, SP [s.n.], 2000.
80f:ilus.

Orientador: Rita Maria Pereira Avancini
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Reprodução. 2. Microscopia. 3. Eletroforese de proteínas. I. Avancini, Rita Maria Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa 16/05/2000

BANCA EXAMINADORA:

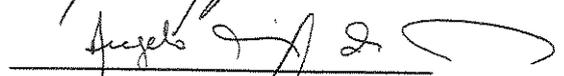
Profa. Dra. Rita Maria Pereira Avancini (Orientadora)



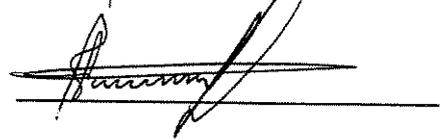
Profa. Dra. Maria Risoleta Freire Marques



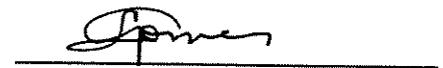
Prof. Dr. Angelo Pires do Prado



Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Profa. Dra. Laurecir Gomes



Prof. Dr. José Camillo Novello

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Altos e Baixos

Caminhos pedregosos sempre existiram...

Nuvens escuras estarão presentes algumas vezes em tua jornada, mas se desmancharão inesperadamente...

Vendavais destruidores virão, mas passarão trazendo novos ares renovados...

Dores abruptas tomaram teu coração desprevenido, mas bálsamos energéticos acalantarão, renovando-te...

Saibam que, nossa vida é, por enquanto, de altos e baixos, luzes e trevas, felicidades e tristezas; até que um dia, habitaremos os planos eternos de paz perene e gozos espirituais, quando então, de alma burilada e lapidada, teremos uma estabilidade vivencial.

Use do amor e da paciência, trabalhe teu interior, acalma-te e espere

BATUÍRA

Bem-aventurados os pobres de espírito, pois que deles é o reino dos céus. (S. Mateus, cap. V, v.3)

A incredulidade zombou desta máxima: *Bem aventurados os pobre de espírito*, como tem zombado de muitas outras coisas que não compreende. Por pobres de espírito Jesus não entende os baldos de inteligência, mas os humildes, tanto que diz ser para estes o reino céus e não para os orgulhosos.

Índice

APÊNDICE	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aparelho reprodutor das fêmeas de dípteros	2
1.2. Glândulas sexuais acessórias de dípteros	4
1.2.1. O processo de inseminação e fertilização	4
1.2.2. Morfologia das glândulas sexuais acessórias femininas de insetos	5
1.2.2.1. Ultra-estrutura da glândula sexual acessória	5
1.2.3. Funções das glândulas sexuais acessórias femininas de insetos	6
1.2.4. Composição química da secreção das glândulas sexuais acessórias femininas de insetos	9
1.3. As espécies de moscas deste estudo	11
1.3.1. Calliphoridae - <i>Chrysomya putoria</i>	11
1.3.2. Calliphoridae - <i>Chrysomya megacephala</i>	12
1.3.3. Muscidae - <i>Muscina stabulans</i>	12
1.3.4. Muscidae - <i>Synthesiomya nudiseta</i>	13
1.3.5. Sarcophagidae - <i>Pattonella intermutans</i>	14
1.4. Hábitos de postura	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19

4.1. Obtenção e manutenção das moscas	19
4.2. Dissecção das moscas e retirada da secreção das glândulas	21
4.3. Dosagem de proteínas	23
4.4. Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	23
4.5. Determinação da massa molecular aparente das proteínas presentes na secreção	25
4.6. Detecção de glicoproteínas contendo açúcares neutros na secreção	25
4.7. Medição das glândulas sexuais acessórias femininas e da largura da cabeça das moscas	26
4.8. Teste para detecção de atividade antibacteriana da secreção das glândulas sexuais acessórias de <i>C. putoria</i> e <i>S. nudiseta</i> sobre <i>E. coli</i> K12	27
4.9. Procedimentos para estudo ultra-estrutural das glândulas sexuais acessórias femininas de <i>C. putoria</i>	28
4.10. Procedimentos para observação por microscopia eletrônica de varredura das glândulas sexuais acessórias femininas de <i>C. putoria</i>	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Dosagem protéica	30
5.2. Análise eletroforética da secreção	31
5.3. Presença de glicoproteínas com açúcares neutros na secreção	35
5.4. Dimensões das glândulas	37
5.5. Atividade antibacteriana da secreção das glândulas sexuais acessórias de <i>C. putoria</i> e <i>S. nudiseta</i>	38
5.6. Microscopia eletrônica das glândulas sexuais acessórias femininas de <i>C. putoria</i>	42
6. DISCUSSÃO	52
6.1. Aspectos bioquímicos	52

6.2. Aspectos morfológicos	55
6.3. Atividade antibacteriana	57
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

APÊNDICE

1. Abreviações

APS	Persulfato de amônia
BSA	Soro albumina bovina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HCl	Ácido clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
PAS	Ácido periódico de Schiff
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
SDS-PAGE	Sódio dodecil sulfato - eletroforese em gel de poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N' – tetrametil-etilenodiamina
Tris	Hidroximetil - aminometano

2. Procedência das drogas

Fosfato monoácido de sódio – Quimis

Fosfato dibásico de sódio – Synth

Cloreto de sódio, álcool etílico, ácido fosfórico, ácido acético, glicerol, álcool metílico, ácido clorídrico – Chemco

PMSF, EDTA, Coomassie brilliant blue R250, Coomassie brilliant blue G, sódio dodecil sulfato, bis- acrilamida, APS, TEMED, glicina, acetato de sódio, azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, Tris-HCL, tiosulfato de sódio, triptona, extrato de levedura, ágar, glutaraldeído, tetróxido de ósmio, óxido de propileno, resina epon, acetato de uranila, ácido tânico, ácido cacodílico – Sigma

Kit de calibração para eletroforese - Pharmacia

Fucsina básica – Carlo Erba

Bissulfito de sódio, bicarbonato de sódio – Reagen

Carvão ativo, formaldeído, nitrato de prata, álcool isopropílico- Merck

Ácido periódico – Nuclear

RESUMO

A grande maioria das espécies de dípteros muscóideos cria-se em fezes de vertebrados, carcaças e outros tipos de matéria orgânica em decomposição. Algumas espécies também frequentam o ambiente doméstico e por isto têm importância sanitária para o homem e animais domésticos. Ainda, umas poucas espécies podem causar miíases. O aparelho reprodutor interno das fêmeas possui dois ovários, três espermatecas, oviduto comum e laterais, vagina e um par de glândulas sexuais acessórias. A secreção das glândulas sexuais acessórias dos insetos, de modo geral, tem o papel de adesão dos ovos ao substrato escolhido pela fêmea para oviposição. Outras funções fisiológicas estão sendo descritas para esta secreção, como a fragmentação da membrana acrossomal e da capa micropilar. A função da secreção mais recentemente descrita, é sua ação antibacteriana.

As proteínas presentes na secreção das glândulas sexuais acessórias de cinco espécies de moscas, *Chrysomya putoria* (Calliphoridae), *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae), *Muscina stabulans* (Muscidae), *Synthesiomya nudiseta* (Muscidae) e *Pattonella intermutans* (Sarcophagidae) foram investigadas neste estudo. Determinamos em que quantidade as proteínas estão presentes na secreção das glândulas de cada espécie das famílias Calliphoridae e Muscidae, bem como a sua massa molecular aparente através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. O perfil eletroforético variou entre as espécies bem com a massa molecular aparente das proteínas. Em *C. putoria* a massa molecular aparente variou de 16,5 a 77,5 kDa, em *C. megacephala* de 15,8 a 79,5 kDa, em *M. stabulans* de 19,5 a 155,5 kDa, em *S. nudiseta* de 14,7 a 82,3 kDa e em *P. intermutans* de 8,5 a 99,4 kDa. Algumas proteínas são comuns às espécies pertencentes à mesma família, outras são características de cada espécie.

Algumas proteínas dos Calliphoridae e Muscidae são glicosiladas. A secreção das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* e *S. nudiseta* inibiu o crescimento de colônias de *Escherichia coli* K 12.

Dois tipos celulares compõem as glândulas sexuais acessórias de *C. putoria*: células secretoras e epiteliais, o que não difere de alguns outros dípteros. A célula secretora possui uma grande invaginação, formando um reservatório que armazena a secreção produzida. Estas características foram observadas em nível ultra-estrutural.

ABSTRACT

Most species of dipteran Muscoidea breed in vertebrate feces and carcasses, as well as in other decomposing organic material. Several of these species occur around human dwellings where they represent an important sanitary problem for man and domestic animals and may, in some cases, cause myiasis. The internal reproductive system of female flies consist of two ovaries, three spermatheca, common and lateral oviducts, a vagina and a pair of accessory sex glands. The secretions of insect accessory sex glands are important in the adhesion of eggs to the surface chosen for oviposition, as well as in the fragmentation of the acrosomal membrane and the egg micropylar cap; the secretions may also have antibacterial activity.

In this work, we investigated the quantities and molecular weights (by SDS-PAGE) of the proteins present in the accessory sex glands secretions of five species of flies: *Chrysomya putoria* (Calliphoridae), *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae), *Muscina stabulans* (Muscidae), *Synthesiomya nudiseta* (Muscidae) and *Pattonella intermutans* (Sarcophagidae). The number of electrophoretic bands and molecular masses for proteins in the secretion of accessory sex glands of these flies were: *C. putoria* - 16.5 - 77.5 kDa, *C. megacephala* - 15.8 - 79.5 kDa, *M. stabulans* - 19.5 - 155,5 kDa, *S. nudiseta* - 14.7 - 82,3 and *P. intermutans* - 8.5 - 99.4 kDa. Some of these proteins were common to species belonging to the same family whereas others were characteristic of a particular species. Several of the proteins were glycosilated. The secretion of accessory sex glands of *C. putoria* and *S. nudiseta* had antibacterial activity as shown by their ability to inhibit *Escherichia coli* K12 growth.

Ultrastructural examination of the accessory sex glands of *C. putoria* showed that, in common with other dipterans, this gland has secretory cells and epithelial cells, with the reservoir of secretory cells storing the gland's secretions.

1. INTRODUÇÃO

A classe Insecta corresponde a um grupo de animais com quase um milhão de espécies. Três características são importantes ao se considerar o potencial reprodutivo dos insetos: o número de ovos férteis ou larvas produzidas, postos por fêmea (BAXTER *et alii*, 1973), a longevidade de uma geração e a proporção de fêmeas em uma dada geração que produzirá a próxima geração (BORROR *et alii*, 1989).

As glândulas sexuais acessórias femininas têm importantes papéis no processo reprodutivo, produzindo secreções que agem sobre os folículos ovarianos e espermatozóides. Em se tratando do potencial reprodutivo de espécies de interesse médico-veterinário, é importante conhecer algumas características das glândulas sexuais acessórias femininas de dípteros muscóideos que se criam em fezes de vertebrados, carcaças e outros tipos de matéria orgânica em decomposição.

1.1. Aparelho reprodutor das fêmeas de dípteros

O aparelho reprodutor das fêmeas de dípteros caliptrados, como os *Calliphoridae*, compreende dois ovários, três espermatecas, duas glândulas acessórias, dois ovidutos laterais, oviduto comum e vagina (Fig. 1).

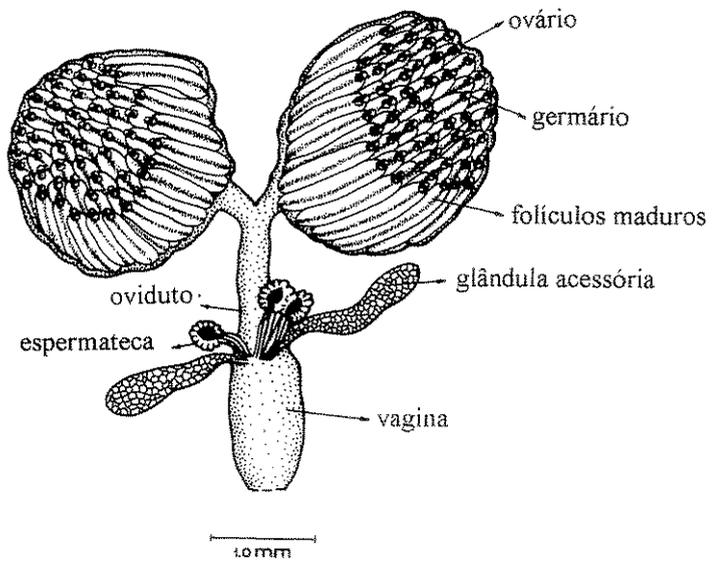


Figura 1
Aparelho reprodutor de *Chrysomya putoria*. Notar os ovários com folículos desenvolvidos e glândulas desenvolvidas (adaptado de AVANCINI & PRADO, 1986).

1.2. Glândulas sexuais acessórias de dípteros

As glândulas sexuais acessórias do aparelho reprodutor feminino de dípteros caliptrados produzem secreções envolvidas no processo reprodutivo. As glândulas são estruturas pares, assim sendo chamadas de colaterais e liberam seu produto na vagina. A secreção tem função adesiva, e por este motivo as glândulas são também chamadas de colaterais (SNODGRASS, 1935; GRAHAM-SMITH, 1938; WIGGLESWORTH, 1967; CHAPMAN, 1982; GILLOTT, 1988). Moscas do gênero *Glossina* (Diptera: Glossinidae) (mosca tsé-tsé) possuem uma dilatação na vagina, formando um útero que abriga uma larva. A secreção das glândulas alimenta a larva e por este motivo, as glândulas são denominadas glândulas de leite ("milk glands") (ADIYODI & ADIYODI, 1975).

1.2.1. O processo de inseminação e fertilização

DEGRUGILLIER & LEOPOLD (1973) descreveram a genitália interna do aparelho reprodutor de fêmeas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) e identificaram estruturas importantes que participam do processo de fertilização.

A válvula dorsal é uma estrutura formada por 2 dobras de tecido epitelial que surgem da superfície dorsal da vagina anterior; a região entre as duas dobras de tecido epitelial recebe o nome de vestíbulo, local onde os ductos das glândulas acessórias se abrem; à frente da válvula dorsal, o epitélio da vagina dobra-se e forma a válvula posterior; e a câmara genital distingui-se do oviduto comum por ser a região em que os ductos espermatecais se abrem. Durante a penetração do espermatozóide, os braços da válvula dorsal prendem o ovócito

firmemente junto à região ventral da câmara genital, enquanto os braços da válvula posterior são forçados para os lados e comprimidos pelo ovócito. Normalmente, 2 a 4 espermatozóides são encontrados dentro da câmara genital antes da entrada do ovócito. Portanto, é durante a passagem do ovócito, pela região da vagina, que ocorre a fertilização.

1.2.2. Morfologia das glândulas sexuais acessórias femininas de insetos

De modo geral, as glândulas são estruturas tubulares. A glândula esquerda de *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) é muito longa em relação à direita (GILLOTT, 1988), enquanto que em *Glossina* as glândulas são estruturas tubulares ramificadas (KAULENAS, 1992). Em *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) as glândulas são tubulares e apresentam uma dilatação na extremidade oposta ao ducto (GRAHAM-SMITH, 1938).

Apesar da forma das glândulas entre os diferentes grupos de fêmeas de insetos ser variada, a estrutura histológica é muito uniforme e inclui, considerando-se de dentro para fora do órgão: uma camada interna quitinosa, uma ou duas camadas de células e uma membrana basal (GILLOTT, 1988).

1.2.2.1. Ultra-estrutura da glândula sexual acessória

A ultra-estrutura das glândulas epidérmicas de insetos foi revista por NOIROT & QUENNEDEY (1974; 1991) que as agruparam em três classes. A classe 1 apresenta apenas um tipo celular que é recoberto por cutícula na superfície apical. A classe 2 é composta por dois tipos celulares: a célula secretora e uma ou mais células epidérmicas. As células epidérmicas possuem cutícula em sua

superfície. A classe 3 é composta por células secretoras que possuem uma invaginação em seu ápice. Um duto cuticular ou canal (produzido por uma célula chamada célula canal) penetra na invaginação e faz a comunicação com o lume. A partir destas descrições nota-se que a cutícula está presente em todas as classes.

A ultra-estrutura das glândulas acessórias foi estudada em alguns insetos e, nos exemplos descritos, a glândula sexual acessória feminina apresenta o arranjo correspondente à classe 3 descrita por NOIROT & QUENNEDEY (1974). Os estudos foram realizados em *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae) por BERRY (1968), em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) por LOCOCO & HUEBNER (1980) e em *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) por DALLAI *et alii.* (1996). Em relação aos dípteros, os estudos se referem principalmente e quase que exclusivamente, a *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) (DALLAI *et alii.*, 1985), que apresenta glândulas com o padrão referente à classe 3. Este tipo de glândula compreende células secretoras cujo ápice é invaginado, formando um reservatório, revestido por microvilos apicais. Neste espaço, o duto termina em uma estrutura chamada *aparelho terminal*, sendo que em muitos casos o aparelho é uma extensão do duto.

Também sobre os dípteros, FAUSTO *et alii* (1997) observaram que as glândulas de *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) são constituídas por um epitélio simples com células globulares.

1.2.3. Funções das glândulas sexuais acessórias femininas de insetos

Fixar os ovos ao substrato onde foram depositados, é a função geral mais conhecida da secreção entre insetos das ordens Hemiptera, Neuroptera,

Lepidoptera, Hymenoptera (ADIYODI & ADIYODI, 1975) e Diptera (DEGRUGILLIER & GROSZ, 1981). Em alguns insetos, como por exemplo, *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera: Eulophidae) (WILKES, 1965) e *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) (WALDER & CALKINS, 1992), descreveu-se que a secreção das glândulas tem função lubrificante do oviduto.

Outras funções se relacionam diretamente ao processo de fertilização. Estudos com a secreção das glândulas de *M. domestica*, realizados por LEOPOLD & DEGRUGILLIER (1973), mostraram que a secreção é crucial para o processo reprodutivo: a remoção das glândulas sexuais acessórias provocava a inibição da penetração dos espermatozóides nos ovócitos, de modo que apenas 4,2% dos ovos eram fertilizados em fêmeas sem glândulas, enquanto 77,4% de ovos eram fertilizados nas fêmeas com glândulas. LEOPOLD (1980) observou ainda que nas fêmeas sem glândulas os espermatozóides tendiam a acumular-se dentro do aparelho reprodutor. DEGRUGILLIER & LEOPOLD (1976) e DEGRUGILLIER (1985) verificaram que a secreção da glândula atua em duas etapas da fertilização: rompe a membrana acrossômica tornando-a fragmentada e/ou vesiculada e desintegra a substância da capa micropilar, possivelmente liberando enzimas. Ainda com a secreção das glândulas femininas de *M. domestica*, WAGNER *et alii* (1993), isolaram um peptídeo da secreção, que provoca a contração do oviduto.

A remoção das glândulas sexuais acessórias em outros dípteros, como o Calliphoridae *Cochliomyia hominivorax* e os Muscidae *Stomoxys calcitrans* e *Musca autumnalis* revelou respectivamente que, somente 1%, 6% e 2% dos ovos são fertilizados. Os ovos postos por *C. hominivorax* não possuíam a cobertura adesiva que os fixaria ao substrato, a micrópila não havia sido penetrada pelo espermatozóide e, ocasionalmente, as fêmeas eram incapazes de depositar ovos,

possivelmente pela ausência de secreção que agiria como lubrificante do oviduto (DEGRUGILLIER & GROSZ, 1981).

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

Além das atividades já citadas da secreção das glândulas de *M. domestica*, JUDD *et alii* (1983) mostraram que algumas enzimas da glândula sexual acessória têm atividade aminopeptidásica e estão diretamente envolvidas na ativação de outras enzimas, possivelmente proteases, da secreção da glândula ou do esperma.

MARCHINI *et alii* (1991) observaram atividade antibacteriana da secreção da glândula de *C. capitata*. Um dos peptídeos com tal atividade atua contra bactérias gram-negativas e positivas, apresentando também atividade de lisozima. Os peptídeos com atividade antibacteriana possuem 29 resíduos de aminoácidos, são estáveis ao calor, básicos e diferem entre si pela substituição de dois resíduos, tendo sido denominadas de "ceratotoxina" (MARCHINI *et alii*, 1993). A massa molecular aparente (M_r) calculada é 2,87 e 2,86 kDa para ceratotoxina A e B, respectivamente. O conjunto de proteínas secretadas pelas glândulas, teria a função de tornar mais eficiente o processo reprodutivo, aumentando a taxa de sobrevivência das larvas no meio ambiente (DALLAI *et alii*, 1989; MARCHINI *et alii*, 1993).

MARCHINI *et alii* (1997) realizaram um interessante experimento onde recuperaram a secreção das glândulas sexuais acessórias femininas de *C.*

capitata depositada sobre os ovos postos e testaram-na contra *Escherichia coli*, verificando que ocorria inibição do crescimento da bactéria. Os autores sugeriram a hipótese de que a secreção sobre os ovos é utilizada para preservar um sítio íntegro para o desenvolvimento da larva nas frutas.

Os peptídios encontrados na secreção das glândulas de *C. capitata* ocorrem naturalmente, ao contrário dos peptídios encontrados na hemolinfa, que são produzidos após o contato da mosca com bactérias (POSTLETHWAIT *et alii*, 1988).

1.2.4. Composição química da secreção das glândulas sexuais acessórias femininas de insetos

Estudos bioquímicos da secreção das glândulas sexuais acessórias da fêmea de *M. domestica* foram feitos por LEOPOLD (1980), que observou que o conteúdo protéico da secreção varia de 0,7 a 1,0 µg de proteína por glândula e é constituído por uma variedade de enzimas hidrolíticas, incluindo esterase e amilase. Este mesmo autor observou que o pH ótimo de ação da secreção varia de 6 a 9 e que o tempo gasto para a remoção da capa micropilar dura de 20 a 30 segundos à temperatura ambiente. TERRANOVA & LEOPOLD (1973) demonstraram a presença de fosfatase ácida em vários órgãos reprodutivos de *M. domestica*, entre eles as glândulas sexuais acessórias femininas.

A secreção da glândula sexual acessória de fêmeas de *C. capitata* possui 0,8 µg de proteína por glândula em média, sendo três proteínas da secreção, de Mr de 28, 32 e 38 kDa, glicosiladas. Os aminoácidos ácidos representam 20,28% e os básicos 34,81% do conteúdo total de aminoácidos, sendo que ácido

aspártico, arginina e histidina estão presentes em quantidades maiores que os demais (DALLAI *et alii* 1986; 1989).

Em estudos preliminares, foi demonstrado que a secreção da glândula sexual acessória de *C. capitata* tem atividade de fosfatase alcalina (DALLAI *et alii*, 1989). Duas isoenzimas foram demonstradas na secreção das glândulas sexuais de *C. capitata* (MARCHINI *et alii*, 1989). As enzimas, β -N-acetilhexosaminidases, têm mesma Mr (69kDa), mas diferentes atividades hidrolíticas sobre 2 glicoproteínas presentes na superfície do ovo. As enzimas atuam em uma ampla faixa de pH, de 2,6 a 9 à temperatura de 37°C, sendo o pH ideal igual a 4.0. Em pH neutro uma rápida perda da atividade é observada em temperaturas acima de 50°C, sendo a enzima mais estável entre pH 5 e 8. Além dos polipeptídeos citados, no conteúdo total da glândula acessória está presente uma endoquitinase. As glicosidases, de modo geral, estão envolvidas na degradação da quitina e atuam no crescimento e na diferenciação dos insetos.

A análise dos aminoácidos presentes na secreção da glândula colateral de *H. cecropia* feita por GRAYSON & BERRY (1974) mostrou que glicina representa 30% e ácido aspártico 33% do total de aminoácidos, mas há poucos aminoácidos aromáticos. Os mesmos autores observaram que a secreção tem alto conteúdo protéico sendo digerida por pronase, e que sua síntese é inibida por puromicina e cicloheximida.

A produção e armazenamento de proteínas adesivas na secreção das glândulas coleteriais de *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae) foi demonstrada por AMORNSAK *et alii* (1992). Estes autores verificaram que a quantidade de proteína e açúcar neutro na secreção é de 109,6 mg/ml e 6,19 mg/ml, respectivamente.

1.3. As espécies de moscas deste estudo

1.3.1. Calliphoridae - *Chrysomya putoria*

Chrysomya putoria é mosca varejeira pertencente à subordem Brachycera, infraordem Muscomorpha (Cyclorrapha), família Calliphoridae (BORROR *et alii*, 1989). Duas subfamílias, Calliphorinae e Chrysomyinae, têm importância médico-veterinária e a última inclui o gênero *Chrysomya*. As moscas deste gênero têm cor de verde metálica a preto-azulada (KETTLE, 1984) e dimensões externas (comprimento) de cerca de 8 mm (JAMES, 1947).

Esta mosca é atraída por matéria orgânica em decomposição, como por exemplo esterco em granjas, onde ovipõe e cria-se em abundância (BRUNO *et alii*, 1993; MENDES & LINHARES, 1993). A espécie, portanto, é veiculadora potencial de poliovírus, *Salmonella* e outros agentes enteropatogênicos (GREENBERG & POVOLNÝ, 1971; FURLANETTO *et alii*, 1984), podendo transportá-los mecanicamente ao domicílio humano onde contaminaria alimentos e utensílios expostos (LAURENCE, 1986).

As larvas podem ser causadoras de miíase¹ facultativa, quando ocasionalmente têm acesso a pequenos ferimentos presentes nos animais, principalmente mamíferos domésticos (ZUMPT, 1965).

Sua distribuição geográfica limitava-se à África (GUIMARÃES *et alii*, 1978) e sua chegada ao Brasil deu-se em 1975, talvez vinda daquele continente durante a migração de refugiados moçambicanos e angolanos (IMBIRIBA *et alii*, 1977).

¹ Miíase: infestação do corpo de humanos e vertebrados com larvas de dípteros, que, por certo período, alimentam-se do tecido vivo ou morto, líquidos corporais, ou alimento ingerido (ZUMPT, 1965).

Seu processo de ovogênese foi estudado por AVANCINI & PRADO (1986) que definiram dez estágios morfo-fisiológicos para o desenvolvimento dos folículos ovarianos. TIRONE & AVANCINI (1997) verificaram ocorrer aumento no tamanho das glândulas sexuais acessórias até o desenvolvimento completo dos folículos ovarianos. Após a postura dos ovos há redução no tamanho das glândulas, indicando que parte da secreção é liberada durante a passagem dos ovos pela vagina.

1.3.2. Calliphoridae - *Chrysomya megacephala*

Esta mosca pertence à família Calliphoridae, tem cor azul metálico, é encontrada sobre fezes, bem como em carne e em peixes expostos em mercados (LAURENCE, 1986), onde deposita seus ovos e as larvas se criam (MENDES & LINHARES, 1993). Os adultos medem de 8 a 11mm de comprimento, e as larvas podem causar miíase facultativa (ZUMPT, 1965). Os adultos são veiculadores potenciais do poliovírus tipo III (FURLANETTO *et alii*, 1984).

Esta espécie é encontrada na Ásia e Oceania e sua presença foi registrada em Campinas (Sp) em 1977 (GUIMARÃES *et alii*, 1978).

O processo de ovogênese foi estudado por LINHARES (1988) que o descreveu baseado em dez estágios morfo-fisiológicos.

1.3.3. Muscidae - *Muscina stabulans*

Este díptero pertence à subordem Brachycera, infraordem Muscomorpha (Cyclorrapha), família Muscidae (BORROR *et alii*, 1989). A maior parte de seu corpo é preto, o abdômen é avermelhado nas laterais ou pode ser totalmente

preto e a tíbia é amarela (JAMES, 1947). Como *C. putoria*, o habitat desta espécie de mosca são as granjas de aves poedeiras onde se criam no esterco úmido que se deposita sob as gaiolas (BRUNO *et alii*, 1993). Ela é causadora acidental de miíase dérmica (ZUMPT, 1965) e miíase intestinal no homem (JAMES, 1947).

O adulto mede cerca de 8mm de comprimento e tem distribuição cosmopolita (JAMES, 1947).

1.3.4. Muscidae - *Synthesiomya nudiseta*

Este díptero tem como sinonímia *Synthesiomyia brasiliana* (Brauer e Bergenstamm) e *Synthesiomyia analis* (Macquart). Dentre os caracteres de reconhecimento do indivíduo adulto, incluem-se: o corpo é acinzentado, o tórax listrado, o abdomen exhibe um padrão semelhante a um tabuleiro de xadrez, com a extremidade amarelada, e antenas amarelo-alaranjadas brilhantes. Superficialmente a mosca se assemelha a moscas do gênero *Sarcophaga*, mas a arista é nua e há falta de cerdas hipopleurais o que distinguem-na deste gênero. O adulto mede cerca de 10 mm de comprimento (JAMES, 1947).

As larvas se criam em matéria animal e vegetal, tais como cadáveres humanos e de animais, sementes de algodão em decomposição, gafanhotos mortos, fezes, e restos de alimentos. Esta espécie está envolvida em casos de miíase secundária (JAMES, 1947) e está associada a poliovírus tipo I e III (GREENBERG, 1971).

Sua distribuição é cosmopolita (JAMES, 1947), e LINHARES (1981) classificou-a como espécie eussinatrópica² na região de Campinas (SP).

² Eussinatrópica: termo aplicado a moscas que frequentam o ambiente doméstico, abatedouros, matéria vegetal em decomposição e depósitos de lixo (Povolný, 1971).

1.3.5. Sarcophagidae - *Pattonella intermutans*

A espécie *P. intermutans* pertence à família Sarcophagidae e como todos os membros desta, são conhecidas como "fleshflies" na língua inglesa. O corpo mede aproximadamente 12,5 mm de comprimento (LOPES, 1974). Os adultos possuem corpo acinzentado, com o abdômen exibindo um padrão semelhante a um tabuleiro de xadrez. Muitas moscas da família Sarcophagidae criam-se em carcaças de animais e são causadoras de miíase (JAMES, 1947). Como todos os Sarcophagidae, *P. intermutans* é ovovivípara.

Sua distribuição é Neotropical e no Brasil esta espécie ocorre do Pará a São Paulo. A sua presença em Campinas foi relatada por LINHARES (1981), que a capturou utilizando vísceras de galinha, fezes humanas e carcaça de ratos como iscas. Este autor classificou a espécie como assinantrópica³.

1.4. Hábitos de postura

Os hábitos de postura das cinco espécies de moscas citadas diferem marcadamente entre si. *C. putoria* e *C. megacephala* colocam aproximadamente 150 ovos agrupados entre si a cada postura (AVANCINI & PRADO, 1986; LINHARES, 1988), enquanto que *M. stabulans*, que deposita cerca de 100 ovos, e *S. nudiseta* colocam seus ovos espalhados sobre o substrato e, quando muito, encontram-se 3 ou 4 ovos juntos.

³ Assinantrópia: termo aplicado a moscas que não convivem com o homem e não dependem do ambiente modificado por ele (Povolný, 1971).

P. intermutans, diferentemente das quatro espécies de moscas citadas, não coloca ovos, mas cerca de 60 larvas em primeiro instar⁴ (SANTAROSA & AVANCINI, 1997). Esta mosca possui um útero que recebe os ovos que estão nos ovários. No útero, as larvas em primeiro instar, ficam até serem postas sobre um substrato.

⁴ Instar: estágio entre as mudas (Borror *et alii*, 1989)

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos hábitos de postura das espécies das moscas enfocados neste estudo diferirem entre as famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae, todas as cinco espécies depositam seus ovos/larvas sobre matéria orgânica em decomposição, onde abundam bactérias e outros microorganismos. Deste modo, seriam os invólucros do ovo suficientes para o proteger da ação destas bactérias durante o período de desenvolvimento embrionário ou, uma proteção além desta estrutural seria necessária? Um único dado de literatura em Diptera (*Ceratitis capitata*) nos indica que a secreção das glândulas sexuais acessórias poderia ter mais uma função biológica: a proteção dos ovos contra a ação das bactérias. *C. capitata* deposita seus ovos em frutos íntegros, onde não se espera a presença abundante de bactérias. Considerando-se o substrato de oviposição das moscas, que serão objeto deste estudo, julgamos que se houver uma ação antibacteriana na secreção, esta poderia ser até mais intensa do que aquela observada em *C. capitata*. Para a investigação do possível papel antibacteriano da secreção das glândulas sexuais acessórias, o conhecimento da sua composição bioquímica seria de grande importância, já que pouco se conhece sobre esta composição em dípteros. Como há outras funções descritas para a secreção em outros dípteros (DEGRUGILLIER, 1985; WAGNER *et alii*, 1993), julgamos que o estudo comparativo da composição protéica da secreção entre as diferentes espécies, poderá contribuir para o entendimento da função da secreção e associá-la a componentes moleculares presentes.

3. OBJETIVO GERAL

Estudar comparativamente a ultra-estrutura, a composição da secreção e sua atividade antibacteriana das glândulas sexuais acessórias em cinco espécies de dípteros muscóideos, pertencentes a três famílias (Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae)

3.1. Objetivos específicos

Com a secreção das glândulas sexuais acessórias femininas de cada espécie de mosca, procuramos:

- a- determinar a concentração de proteínas presentes;
- b- analisar o perfil protéico da secreção;
- c- determinar a presença de glicoproteínas com açúcares neutros na secreção;
- d- testar o efeito da secreção sobre o crescimento de *E. coli* k12;

Com as glândulas sexuais acessórias femininas íntegras, procuramos:

- e- medir e analisar seu comprimento e largura;
- f- conhecer a ultraestrutura das glândulas de um dos muscóideos, no caso, *C. putoria*.

E com as moscas inteiras, procuramos:

g- medir a largura da cabeça

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e manutenção das moscas

Moscas das espécies *C. putoria* e *C. megacephala* foram obtidas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia/UNICAMP, cuja criação em laboratório foi iniciada a partir de coleta realizada no *campus* da Universidade Estadual de Campinas. Os adultos capturados foram colocados em gaiolas de estrutura metálica envolvidas por tela de "nylon" e mantidos em sala com temperatura e umidade controladas.

As moscas da espécie *M. stabulans* foram obtidas em granjas nos municípios de Monte Mor (SP) ou Sumaré (SP). Os adultos foram capturados sob as gaiolas de aves poedeiras, onde havia acúmulo de esterco.

Espécimes de *S. nudiseta* e *P. intermutans* começaram a ser mantidos em laboratório a partir de larvas coletadas no *campus* da Universidade Estadual de Campinas, utilizando-se carcaças de roedores em decomposição. Os adultos de *S. nudiseta* foram identificados pelo Prof. Dr. A. P. Prado⁵ e os adultos de *P. intermutans* foram identificados pelo Prof. Dr. J. Mendes⁶.

Às cinco espécies de moscas, foi oferecida uma dieta composta de fígado bovino cru, ou carne crua moída, açúcar e água, a fim de se obter várias oviposições e assim se formarem as colônias.

⁵ Departamento de Parasitologia - IB/Unicamp. SP.

⁶ Universidade Federal de Uberlândia – MG.

Os ovos de *C. putoria* e *C. megacephala* foram transferidos para um meio artificial (LEAL *et alii*, 1982) e, após um período de 5 a 7 dias, as larvas L3 foram transferidas para um frasco contendo serragem onde ocorria a pupariação. Após 6 a 7 dias os adultos que emergiam foram colocados em gaiolas como descrito anteriormente. Para o propósito deste trabalho, as moscas foram alimentadas com açúcar e água durante todo o período do experimento, e com carne crua, que foi renovada diariamente, por 3 a 4 dias, até que os ovários estivessem totalmente desenvolvidos.

Os ovos de *M. stabulans* e *S. nudiseta* foram transferidos para um meio artificial contendo farelo de trigo (465 gramas) e levedura (75 gramas) umedecidos com 500 ml de água (A. P. PRADO comunicação pessoal). Neste meio, as larvas de *M. stabulans* se desenvolveram e empuparam após 7 dias e decorrido uma semana, os adultos emergiram. A emergência de *S. nudiseta* ocorreu 8 dias após a pupariação.

Os adultos de *P. intermutans* receberam carne bovina, açúcar e água. As larvas depositadas na carne foram transferidas para frascos contendo meio artificial (LEAL *et alii*, 1982) onde se alimentaram por 4 dias. A seguir, as larvas foram transferidas para frascos, com três centímetros de altura, e estes frascos foram colocados dentro de outros recipientes contendo serragem umedecida, para que o processo de pupariação tivesse início. Depois de 17 dias em média, os adultos emergiram.

Os adultos de todas as espécies, foram mantidos em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro.

4.2. Dissecção das moscas e retirada da secreção das glândulas

As dissecções das glândulas de *C. putoria*, *C. megacephala*, *M. stabulans*, *S. nudiseta* e *P. intermutans* foram realizadas quando seu primeiro ciclo gonotrófico estava completo, não tendo sido observada ou tendo ocorrida oviposição ou larviposição. Nesta fase os folículos ovarianos estavam totalmente desenvolvidos em fase X, de acordo com a classificação de AVANCINI & PRADO (1986). Essa padronização é importante, pois durante a passagem do folículo pela vagina, quando da oviposição ou larviposição, as glândulas acessórias e a espermateca liberam secreção e espermatozóides, respectivamente. Assim, não utilizamos moscas que não apresentavam folículos totalmente desenvolvidos, nem moscas que já tivessem oviposto. Esta última situação é importante de ser evitada porque, nesta condição, parte da secreção já foi utilizada, e conseqüentemente o tamanho das glândulas apresenta-se diminuído, embora não significativamente (TIRONE & AVANCINI, 1997).

Para a retirada da secreção glandular, as moscas foram anestesiadas por exposição a baixa temperatura (-23°C), durante aproximadamente 8 minutos, dissecadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e, cada glândula, transferida para tubos de centrifugação (1,5 ml) contendo 1µl de solução de NaCl 5mM em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, contendo 1 mM de PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoreto) e 2 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) por glândula, conforme descrito em MARCHINI *et alii* (1989), com modificações introduzidas neste trabalho. Tomou-se o cuidado de não perfurá-las, evitando-se assim, perda de secreção. Todas estas etapas foram realizadas a 4°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 13000 rpm em centrífuga refrigerada

Beckman modelo J2-21, com rotor Beckman modelo JA 18.1. O sobrenadante foi recuperado e congelado a -74°C . O precipitado foi ressuspenso com o mesmo tampão utilizado para dissecção e colocado numa lâmina para verificar se as glândulas e/ou células tinham sido rompidas. A constatação de que as glândulas e suas células estavam intactas, indicava que o conteúdo antes presente no lume saíra da glândula sem que suas células tivessem sido rompidas.

As fêmeas de *P. intermutans* têm uma biologia reprodutiva diferente das outras espécies, pois a passagem dos ovos do ovário para o útero é um processo rápido (durando menos de seis horas), e quando isto acontece, as glândulas se esvaziam totalmente. Assim, obtivemos glândulas suficientes apenas para a análise eletroforética das proteínas presentes na secreção. As glândulas foram armazenadas em solução de NaCl 5mM em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 (1 μl por glândula) a -74°C . O procedimento de retirada da secreção das glândulas de *P. intermutans* foram os mesmos utilizados anteriormente. Para nos certificar de que nenhuma secreção tinha permanecido no interior das glândulas, as mesmas foram retalhadas com uma agulha, submetidas a nova centrifugação e o sobrenadante analisado em gel de poliacrilamida e este corado pelo método da prata como descrito por BLUM *et alii* (1987). Nenhuma banda protéica foi visualizada.

Para nos certificar de que o congelamento não alterava o padrão obtido na eletroforese, secreção das glândulas de *C. putoria*, recém-colhida, foi comparada com secreção mantida sob congelamento a -74°C .

4.3. Dosagem de proteínas

Para dosagem protéica foi utilizado o micrométodo de BRADFORD (1976), utilizando como padrão soro albumina bovina (BSA) nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Foram utilizados 10 μl de secreção das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria*, *C. megacephala* e *S. nudiseta* e 30 μl para *M. stabulans*. As determinações forma realizadas em triplicata.

A quantidade de proteínas presentes na secreção de cada glândula, foi expressa pelo quociente obtido entre a quantidade de proteínas totais determinada para cada espécie e o número de glândulas utilizadas. Cada microlitro de secreção utilizada corresponde a uma glândula.

Não foi realizada a dosagem protéica da secreção de *P. intermutans* devido à escassez de secreção.

4.4. Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi feita em gel com gradiente de poliacrilamida (4-16%) na presença de SDS (SDS-PAGE) utilizando um sistema descontínuo de tampão, segundo LAEMMLI (1970). As dimensões do gel foram 16 x 13 x 0,1 cm. O gel foi preparado de acordo com HAMES (1990) sendo nas cubas utilizado o tampão Tris-glicina: tris 0,25M, glicina 0,19M e SDS 0,1%. A quantidade de proteína (12 microgramas) foi a mesma para todas as espécies, exceto para *P. intermutans*, para a qual não foi possível realizar a dosagem protéica. A precipitação de

proteínas das amostras foi realizada de modo que a proporção da amostra, tampão acetato de sódio 0,5M pH 7,4 e etanol 95%, fosse 1:2:27. Após deixar por pelo menos 8 horas a 4°C, o material foi centrifugado a 10000 rpm, durante 20 min, em centrífuga refrigerada Beckman com rotor Beckman JA 18.1. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado à temperatura ambiente para evaporação completa do etanol. A este precipitado foram adicionados 30µl de solução de solubilização, contendo SDS 0,04%, glicerol 8%, EDTA 0,4M, azul de bromofenol 0,4%, 2-mercaptoetanol 0,2% e tampão tris-HCl 0,05M, pH 6,8.

Para verificar a presença de proteínas oligoméricas na secreção, algumas amostras foram suspensas na mesma solução solubilizadora mas sem o agente redutor 2-mercaptoetanol. Durante a eletroforese a corrente foi de 30mA. Após a eletroforese, o gel foi fixado em uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 12%. A coloração do gel, que continha a secreção das glândulas de *C. putoria*, *C. megacephala*, *M. stabulans* e *S. nudiseta*, foi feita com Coomassie brilliant blue R250 0,2g em metanol 50% e ácido acético 10%. Devido à escassez de material, para o gel de eletroforese contendo a secreção das glândulas de *P. intermutans* foi utilizado o método de coloração por prata de BLUM *et alii* (1987).

A secreção das glândulas de *C. putoria*, colhida momentos antes da eletroforese, foi submetida ao mesmo processo de precipitação descrito acima, para comparação com a secreção congelada.

4.5. Determinação da massa molecular aparente das proteínas presentes na secreção

Para a determinação da massa molecular aparente (M_r) das proteínas foi utilizado um "kit" de calibração da Pharmacia contendo fosforilase b, BSA, ovalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina e α -lactalbumina, com massa molecular de 94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4 kDa, respectivamente. A curva de calibração foi obtida plotando-se o log dos valores da massa molecular das proteínas utilizadas como padrão no eixo das ordenadas e os valores da migração relativa (R_f), daquelas proteínas no eixo das abscissas. Os valores de R_f foram obtidos dividindo-se a distância percorrida pelas proteínas em relação à migração do azul de bromofenol. Os cálculos foram executados pelo programa de computador Minitab versão 10.1 (1994). Para se conhecer o valor da M_r das proteínas presentes nas diferentes amostras, o valor de R_f foi substituído na equação da reta obtida por regressão linear e calculado o antilog do valor de y obtido.

4.6. Detecção de glicoproteínas contendo açúcares neutros na secreção

Amostras das secreções foram precipitadas em etanol, dissolvidas no tampão apropriado para solubilização e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, como mencionado no ítem 4.4. A quantidade mínima de glicoproteínas necessária para detecção por PAS (reação pelo ácido

periódico de Schiff) em gel, é de 1,25 μ g (DUBRAY & BEZARD, 1982). Em nosso caso, utilizamos aproximadamente 24 μ g de proteínas de cada espécie de mosca.

A coloração foi realizada seguindo-se o método de FAIRBANKS *et alii* (1971) modificado. Os procedimentos foram os seguintes: fixação do gel em álcool isopropílico 25% e ácido acético 10% por 21 horas; lavagem com ácido acético 7,5% por 30 minutos; e oxidação por ácido periódico 0,2% por 1 hora a 4°C. O ácido periódico foi desprezado, e sem lavagem o gel foi corado com reativo de Schiff por 1 hora a 4°C. O gel foi lavado com ácido acético 7,5%, em temperatura ambiente, por 2 horas.

Não foi realizado o experimento com a secreção das glândulas de *P. intermutans* devido à escassez de amostra.

4.7. Medição das glândulas sexuais acessórias femininas e da largura da cabeça das moscas

As glândulas sexuais acessórias femininas de *C. putoria*, *C. megacephala*, *M. stabulans* e *S. nudiseta* foram medidas, a fresco, em duas dimensões: comprimento e largura da região média. Também mediu-se a largura da cabeça, como estimativa do tamanho do corpo (HAGGARD *et alii*, 1980), utilizando-se um estereomicroscópio Olympus modelo SZ 4045, com ocular graduada e régua calibradora com divisões de 10 μ m. Para calcular o volume das glândulas, utilizou-se a fórmula do volume de um cilindro, ou seja, $V = h \times \pi \times r^2$, onde: h, comprimento; π , 3,14; e r, largura/2.

As diferenças entre as médias dos volumes das glândulas e a razão entre larguras da cabeça e volumes das glândulas das quatro espécies de moscas estudadas, foram analisadas por ANOVA, utilizando o procedimento GLM (Modelos Lineares Gerais) para $P < 0,05$ e para separação das médias, foi realizado o teste de Tukey (SAS Institute, 1992).

4.8. Teste para detecção de atividade antibacteriana da secreção das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* e *S. nudiseta* sobre *E. coli* K12.

Para realizar o teste para detecção de atividade antibacteriana da secreção, utilizou-se a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* K12 que cresceu em meio LB (triptona 10g/l, NaCl 10g/l e extrato de levedura 5g/l). Do meio contendo as bactérias, 50µl da suspensão (100.000 céls./ml) foram transferidos para placa de Petri com meio LA (LB + ágar 1,5% pH 7,2) e espalhadas na superfície da mesma com auxílio de uma alça de Drigalsky.

Foram utilizados 120µg de proteína (100µl de secreção) de *C. putoria*, colocados no centro de uma placa de Petri com a cultura de bactérias cultivada como descrito anteriormente e sendo a placa a seguir mantida em estufa a 37°C por 24 horas.

Para *S. nudiseta*, utilizamos 120µg de proteína (100µl de secreção) que foram colocados no centro de uma placa de Petri com 25µl da cultura de bactérias (100.000 céls./ml) cultivadas como descrito anteriormente e sendo a placa a seguir mantida em estufa a 37°C por 24 horas.

Como controle, 25µl da suspensão (100.000 céls./ml) de bactérias foram adicionados a 25µl de salina que foram, a seguir, aplicados em placa de Petri por espalhamento. Na placa, aplicamos 50µl de uma solução de NaCl 5mM em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, do mesmo modo que realizado para a secreção das glândulas. A placa foi mantida em estufa a 37°C por 24 horas.

4.9. Procedimentos para estudo ultra-estrutural das glândulas sexuais acessórias femininas de *C. putoria*

As glândulas sexuais de *C. putoria* foram inicialmente dissecadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,1 a 4°C, e posteriormente fixadas em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 2 horas a 4°C, lavadas 3 vezes por 5 minutos no mesmo tampão, pós fixadas em ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por uma hora a 4°C e lavadas no mesmo tampão. A desidratação das glândulas foi realizada em série etanólica crescente. Em seguida as glândulas foram transferidas para banho de álcool:óxido de propileno (1:1) por 15 minutos, óxido de propileno (puro) por 10 minutos (2x). Em seguida os espécimens foram processados nas seguintes etapas: óxido de propileno:resina - Epon por uma hora, Epon puro "overnight" e incluídos em Epon em estufa a 60°C por 48 horas (SESSO, 1998).

As secções de 70nm foram obtidas em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT 2.0, contrastadas com acetato de uranila 2% em tampão maleato 0,05M, pH 5,2 e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss LEO 906.

4.10. Procedimentos para observação por microscopia eletrônica de varredura das glândulas sexuais acessórias femininas de *C. putoria*

O processamento utilizado nesta etapa foi realizado segundo SILVEIRA (1998), com modificações. As glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* foram dissecadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,1 a 4°C e fixadas em glutaraldeído 4,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,3, por 2 horas, a 4°C. Ao fixador foi adicionado ácido tânico em concentração final de 1,5% (KITAJIMA & LEITE, 1998). Após a fixação, as glândulas foram lavadas em tampão cacodilato por 12 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato por 1 hora a 4°C, lavadas no mesmo tampão 3 vezes, por 15 minutos cada, e transferidas para etanol 70%. Algumas glândulas foram transferidas para nitrogênio líquido a fim de serem fraturadas. Após a desidratação em série etanólica crescente, as glândulas foram submetidas ao ponto crítico em aparelho Balzer CPD 030 e cobertura com ouro em aparelho Balzer SCD 050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL 5800 LV.

5. RESULTADOS

5.1. Dosagem protéica

A quantidade de proteínas presente na secreção de cada glândula foi aproximadamente a mesma para as espécies *C. putoria*, *C. megacephala* e *S. nudiseta*, ou seja, em torno de 1,20µg/glândula (Tabela I). Para *M. stabulans* a quantidade de proteínas foi bem menor, conforme mostrado na Tabela I.

Tabela I.
Quantidade de proteínas encontradas na secreção de cada glândula sexual acessória feminina de 4 espécies de dípteros

Espécie	Quantidade de proteínas (µg/glândula)
<i>C. megacephala</i>	1,26
<i>C. putoria</i>	1,20
<i>M. stabulans</i>	0,39
<i>S. nudiseta</i>	1,20

5.2. Análise eletroforética da secreção

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida da secreção obtida das glândulas sexuais acessórias das diferentes espécies, revelou que a maioria das proteínas, aquelas que são mais evidentes, têm Mr inferior a 82,3 kDa. Sob condição não redutora, as proteínas mais evidentes de *C. putoria* têm massa molecular aparente de: 16,5, 18,5, 21,1, 31,9, 34,8, 40,8, 50, 57,1, 70 e 77,5 kDa; de *C. megacephala*: 15,8, 18,6, 20,9, 29,8, 31,5, 33,4, 50,4, 57,6, 68,6 e 79,5; de *M. stabulans*: 19,5, 21,7, 34,9, 35,9, 61,3, 82,3, 138,4 e 155,5; e de *S. nudiseta*: 14,7, 33,8, 38,6, 74,3 e 82,3. O perfil eletroforético da secreção de *C. putoria* e *C. megacephala* foi muito semelhante, exceto pela proteína com 20,9 kDa, observada mais evidentemente em *C. megacephala* que em *C. putoria* (Fig. 2).

O perfil protéico da secreção recém-colhida das glândulas de *C. putoria* e submetida à eletroforese, e o perfil da secreção armazenada a -74°C, não mostrou diferença (resultados não mostrados).

A comparação das proteínas encontradas nos dois Muscidae, *M. stabulans* e *S. nudiseta*, mostra diferenças maiores do que aquelas observadas entre as duas espécies de Calliphoridae. *M. stabulans* apresenta proteínas com 19,5, 21,7, 61,3, 138,4 e 155,5 kDa não observadas em *S. nudiseta*. No perfil desta última, observa-se proteínas com 14,7 e 74,3 kDa não observadas em *M. stabulans*, mas a proteína com 82,3 kDa é comum aos dois Muscidae (Fig. 2).

Em presença de 2-mercaptoetanol, foram observadas bandas protéicas com massa molecular acima de 70 kDa, mas as proteínas mais evidentes, observadas sob condição não redutora, mantiveram suas posições. No entanto, deve-se destacar que as proteínas com 38,6 e 33,8 kDa de *S. nudiseta*, em

quatro eletroforeses sob ausência de agente redutor, apresentaram comportamento bem diferente quando submetidas à redução, podendo ter apresentado este resultado devido à presença de pontes dissulfeto intracadeias.

A secreção das glândulas de *P. intermutans* apresentou bandas protéicas com Mr entre 8,5 e 99,4 kDa sob condições não redutoras (Fig. 3). As bandas mais relevantes têm 17,7, 18,8, 21,4, 25,1, 27, 33,2, 35,7, 40,1, 42,6, 59,6, 68,9, 73,1 e 75,3 kDa. Sob condição redutora, a secreção apresentou bandas protéicas com Mr entre 8,5 e 85,8 kDa, e a banda com 54,6 kDa é a mais relevante. Algumas bandas, aquelas com 25,1, 27, 93,7, 96 e 99 kDa, observadas quando o gel foi corrido na ausência de agente redutor, não foram observadas sob presença do agente redutor (Fig. 3).

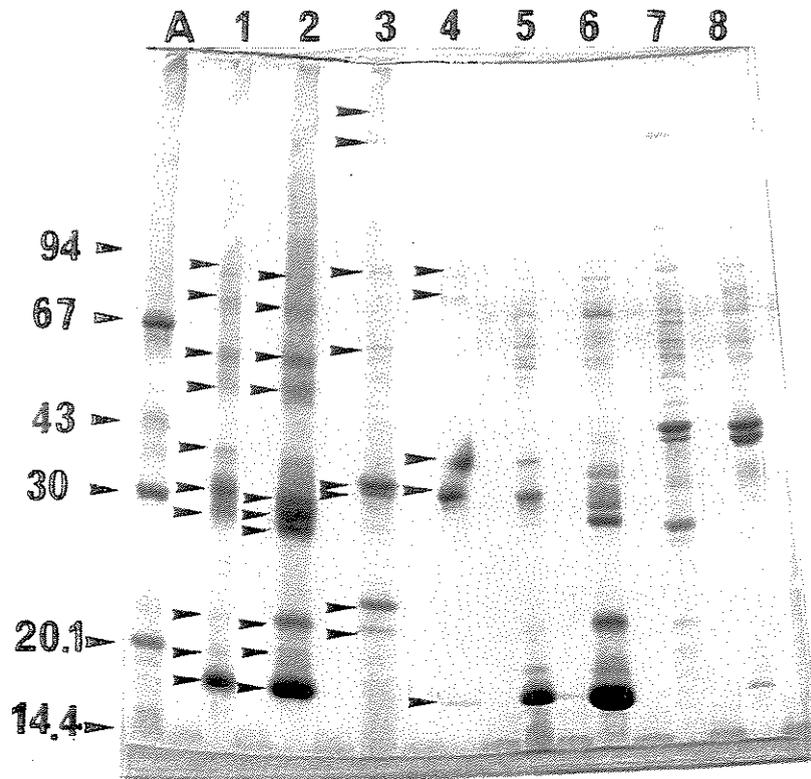


Figura 2
 SDS-PAGE (4-16%) da secreção das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* (1 e 5), *C. megacephala* (2 e 6), *M. stabulans* (3 e 7) e *S. nudiseta* (4 e 8); sob condições não redutoras (1, 2, 3 e 4) e redutoras (5, 6, 7, e 8). *C. putoria* apresenta proteínas com Mr entre 16,5 e 77,5 kDa; *C. megacephala* entre 15,8 e 79,5 kDa; *M. stabulans* entre 19,5 e 155,5 kDa e *S. nudiseta* entre 14,7 e 82,3 kDa sob condições não redutoras. (A), marcadores de peso molecular - fosforilase b (94), BSA (67), ovalbumina (43), anidrase carbônica (30), inibidor de tripsina (20,1) e α -lactalbumina (14,4). Coloração por Coomassie brilliant blue R250.

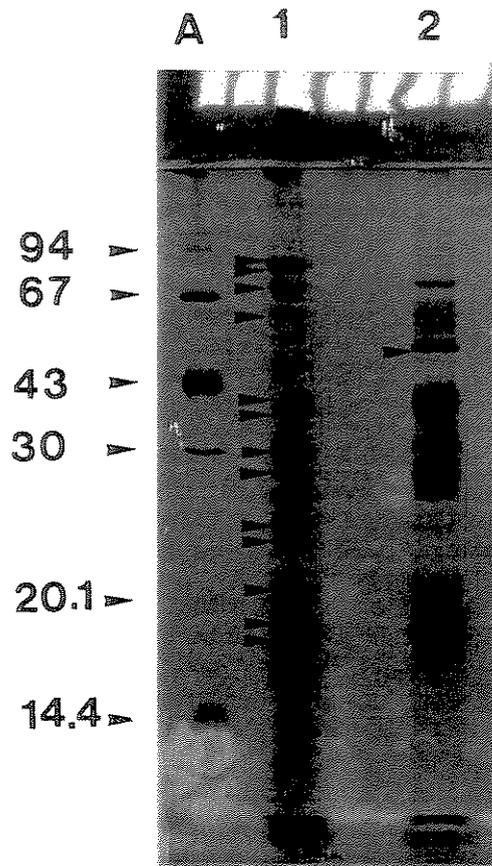


Figura 3
 SDS-PAGE (12,5%) da secreção das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *P. intermutans* sob condições não redutoras (1) e redutoras (2). A, marcadores de peso molecular - fosforilase b (94), BSA (67), ovalbumina (43), anidrase carbônica (30), inibidor de tripsina (20,1) e α -lactalbumina (14,4). Coloração pelo método da prata.

5.3. Presença de glicoproteínas com açúcares neutros na secreção

A reação histoquímica para açúcares neutros foi positiva para seis proteínas presentes na secreção das glândulas de *C. putoria*, de massa molecular aparente de 16,5, 18,5, 31,9, 34,8, 40,8 e 57,1 kDa respectivamente. O mesmo foi observado para as proteínas de 15,8, 18,6, 20,9, 29,8, 31,5 e 33,4 kDa de *C. megacephala*. Para *M. stabulans*, três proteínas de 21,7, 34,9 e 35,9 kDa e duas de 33,8 e 38,6 kDa de *S. nudiseta* foram reativas (Fig. 4).

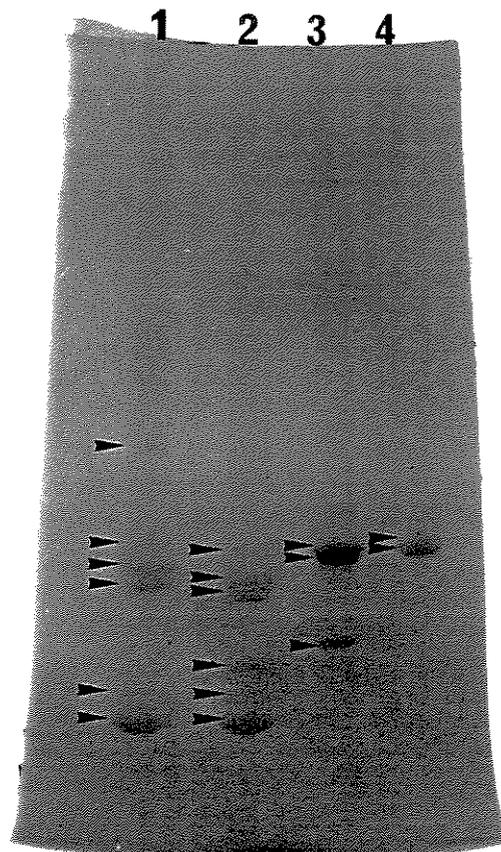


Fig. 4
SDS-PAGE (4-16%) da secreção das glândulas sexuais acessórias de fêmeas de *C. putoria* (1), *C. megacephala* (2), *M. stabulans* (3) e *S. nudiseta* (4) corado pelo método de PAS para açúcares neutros. *C. putoria* apresenta 6 proteínas glicosiladas: 16,5, 18,5, 31,9, 34,8, 40,8 e 57,2 kDa; *C. megacephala*, 6 proteínas: 15,8, 18,6, 20,9, 29,8, 31,5 e 33,4; *M. stabulans*, 3 proteínas: 21,7, 34,9 e 35,9 kDa; e *S. nudiseta*, 2 proteínas: 33,8 e 38,6 kDa.

5.4. Dimensões das glândulas

A partir dos resultados das medições do comprimento e largura das glândulas das quatro espécies, *C. putoria*, *C. megacephala*, *M. stabulans* e *S. nudiseta*, foi calculado o volume da glândula como descrito no item 4.7. Medidas de largura da cabeça serviram para estimar o tamanho da mosca. Os resultados das dimensões dos órgãos citados foram analisados e são mostrados na Tabela II.

Tabela II
Valores médios (EP) das medidas observadas para cada espécie de mosca

	Espécies			
	<i>C. megacephala</i>	<i>C. putoria</i>	<i>M. stabulans</i>	<i>S. nudiseta</i>
Comprimento da glândula (mm)	2,98 (0,055) a	2,21 (0,050) b	1,54 (0,030) c	2,02 (0,034) d
Largura da glândula (mm)	0,15 (0,002) a	0,17 (0,005) b	0,11 (0,004) c	0,11 (0,004) c
Largura da cabeça (mm)	3,54 (0,044) a	3,06 (0,026) b	2,55 (0,020) c	3,08 (0,020) b
Volume da glândula (mm ³)	0,054 (0,002) a	0,056 (0,003) a	0,018 (0,001) b	0,020 (0,002) b
Razão entre largura da cabeça e volume da glândula	69,40 (4,038) a	60,25 (3,568) a	172,19 (12,153) b	172,94 (9,371) b

N = 30 para cada medida de cada espécie.

Médias dentro das linhas, representadas pela mesma letra, não são significativamente diferentes para P= 0,05 (teste de Tukey)

Os resultados representados na Tabela II mostraram que as médias diferem significativamente entre as quatro espécies para: comprimento da glândula (F=185,55; P<0,0001); largura da glândula (F=50,07; P<0,0001); largura

da cabeça ($F=183,52$; $P<0,0001$); volume da glândula ($F=65,02$; $P<0,0001$); e razão entre largura da cabeça e volume da glândula ($F=58,70$; $P<0,0001$).

A análise dos resultados obtidos pelo teste de Tukey, indica que para o comprimento das glândulas, tanto a família Calliphoridae quanto Muscidae apresentam diferenças significativas entre as médias.

O mesmo não ocorre quando se observam os resultados obtidos para o teste em relação à largura da glândula que são iguais para as duas espécies da família Muscidae. Em relação à largura da cabeça a semelhança é observada entre *C. putoria* e *S. nudiseta*.

Em relação ao volume da glândula e razão entre largura da cabeça e volume da glândula, o teste de Tukey mostrou não haver significativa entre as médias das espécies da mesma família.

5.5. Atividade antibacteriana da secreção das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* e *S. nudiseta*

A secreção das glândulas sexuais acessórias de *C. putoria* (120 μ g de proteína) inibiu o crescimento de *E. coli* K12 quando colocada diretamente no centro de uma placa de Petri com crescimento bacteriano (50 μ l de suspensão) (Fig. 5). Da mesma forma, a secreção das glândulas sexuais acessórias de *S. nudiseta*, 120 μ g de proteína, também inibiu o crescimento da colônia de *E. coli* K12 (25 μ l de suspensão) (Fig. 6). O controle apresentou crescimento de bactérias (Fig. 7).



Figura 5
Atividade antibacteriana (seta) da secreção (120 μ g de proteína) das glândulas de *C. putoria* sobre colônia de *E. coli* K12 (50 μ l de suspensão). A área indicada pela seta mostra a região onde a secreção foi depositada e houve reduzido crescimento bacteriano.



Figura 6

Atividade antibacteriana (seta) da secreção (120 μ g de proteína) das glândulas de *S. nudiseta* sobre colônia de *E. coli* K12 (25 μ l de suspensão). A área indicada pela seta mostra a região onde a secreção foi depositada e houve reduzido crescimento bacteriano.

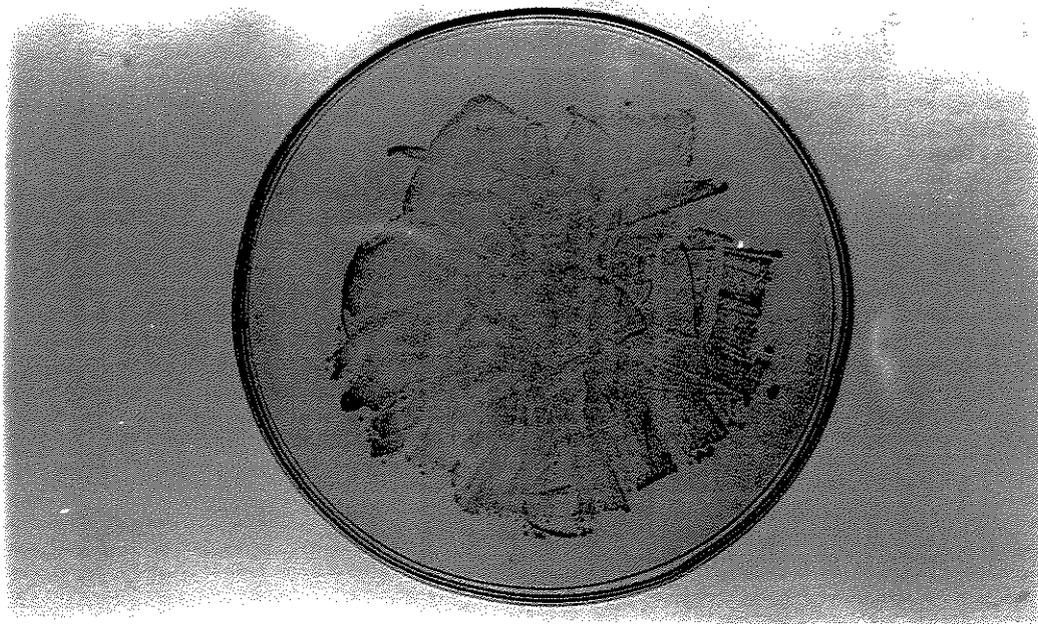


Figura 7
Crescimento de colônias de *E. coli* K12 (25 μ l de suspensão - 100.000 céls./ml) em placa que recebeu apenas solução tampão (controle).

5.6. Microscopia eletrônica das glândulas sexuais acessórias femininas de *C. putoria*

As glândulas sexuais acessórias femininas de *C. putoria* são tubulares e apresentam uma discreta dilatação na parte apical (Fig. 8); o epitélio secretor que forma as glândulas é delgado (Fig. 9).

Dois tipos celulares são reconhecidos: células secretoras grandes com núcleos grandes, e células epiteliais pequenas e alongadas. As células secretoras apresentam uma invaginação na superfície apical formando um grande reservatório revestido por microvilos. No limite entre a invaginação e seu lume há um material filamentososo em arranjo concêntrico formando uma malha frouxa. Este material está conectado a camadas cuticulares que revestem o lume (Fig. 10). A secreção no reservatório é uniformemente densa, com o mesmo aspecto daquela presente em seu lume (Fig. 10) e invade os estreitos compartimentos entre os microvilos (Fig. 11). No citoplasma da célula secretora observam-se muitos microtúbulos próximos à invaginação e o contato entre as células secretoras e epiteliais é caracterizado pela presença de junções septadas (Fig. 11).

Quando a glândula está cheia de secreção, correspondente ao estágio X da ovogênese, o reservatório das células secretoras está preenchido com secreção, e ocupa grande parte da célula (Fig. 12). Observa-se nas células secretoras o núcleo, ao lado do reservatório, com cromatina frouxa, e no citoplasma, grandes estruturas vesiculares de retículo endoplasmático rugoso. Na outra célula, não se observa núcleo ao lado do reservatório e o citoplasma não apresenta vesículas de retículo endoplasmático.

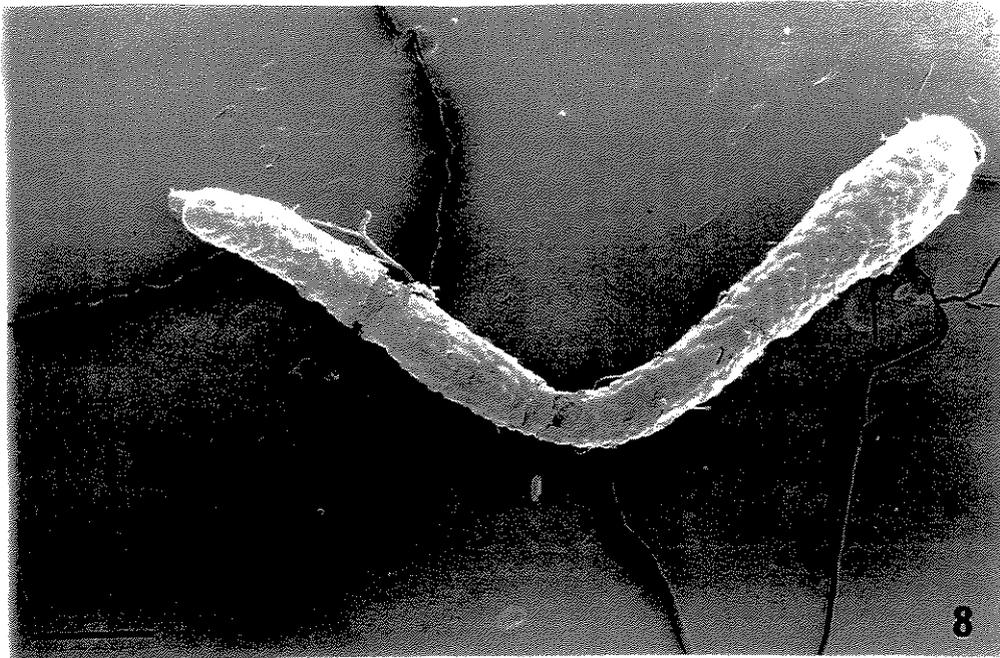


Figura 8
Micrografia eletrônica de varredura da glândula sexual
accessória de *C. putoria*, mostrando sua forma tubular e
uma discreta dilatação da parte apical da glândula
(seta). Barra 200 μ m.

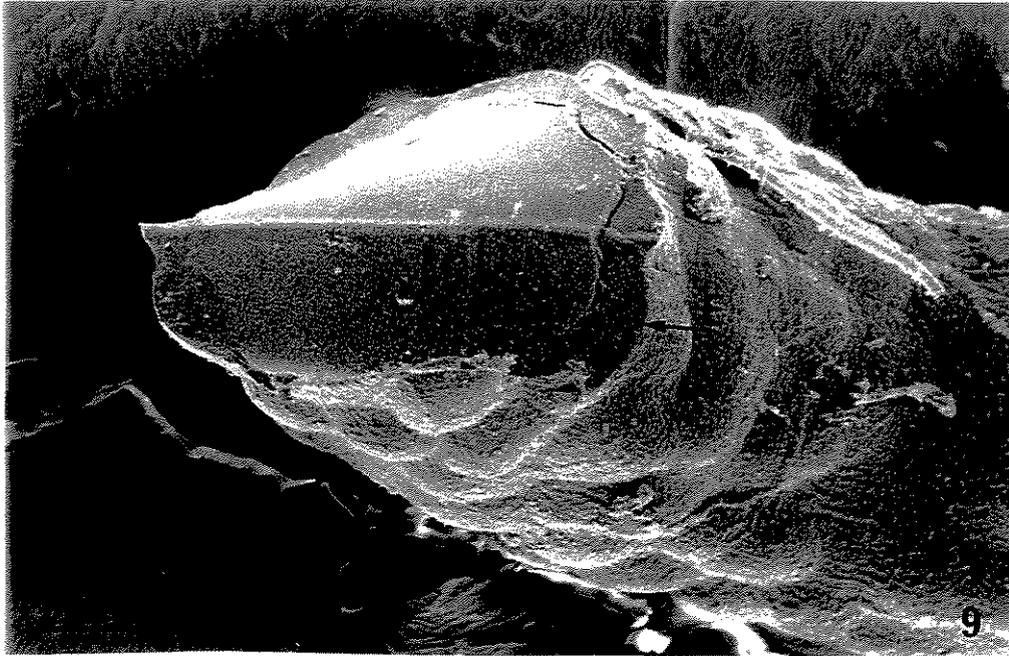


Fig. 9
Micrografia eletrônica de varredura da glândula sexual acessória de *C. putoria* onde se vê epitélio (E) delimitando o lume da glândula preenchido pela secreção. Barra 20 μ m.

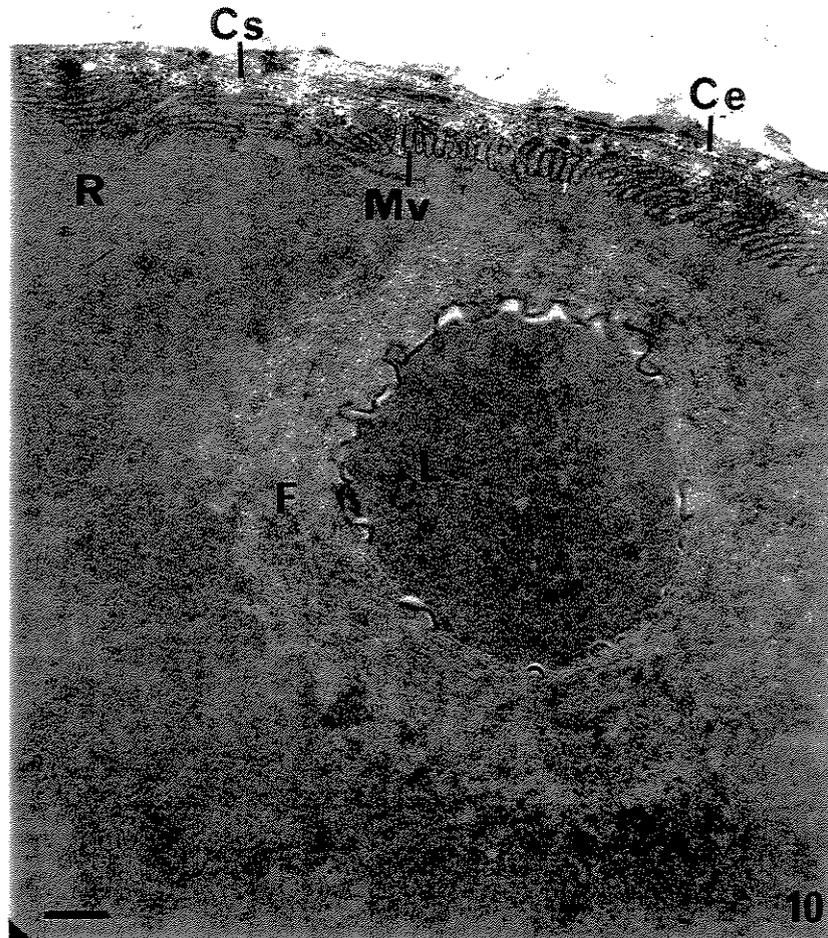


Figura 10

Micrografia eletrônica de transmissão. Corte transversal de célula secretora (Cs) e epitelial (Ce) da glândula sexual acessória feminina de *C. putoria*. A célula secretora apresenta uma invaginação, revestida por microvilos (Mv), formando um grande reservatório (R) que delimita um lume (L). Entre o reservatório e seu lume há um material filamentosos (F), em arranjo concêntrico, que conecta-se às camadas cuticulares do lume. Ce, célula epitelial. Barra, 1 μ m.

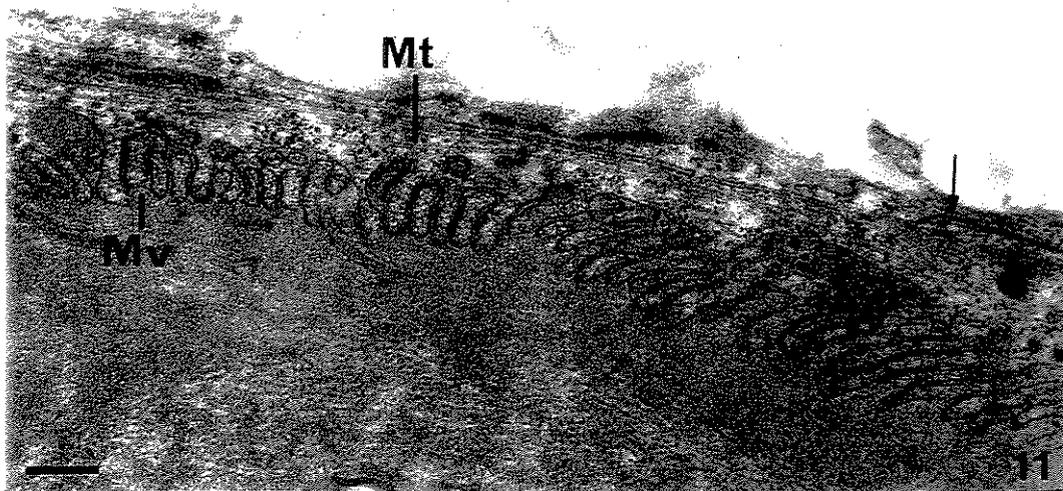


Figura 11
Micrografia eletrônica de transmissão. Detalhe da
Figura 10 mostrando microtúbulos (Mt) no citoplasma
das células secretoras; limite entre células secretoras e
as células epiteliais com junção septada unindo-as
(seta) e secreção no espaço entre os microvilos (Mv).
Barra, 0,5 μ m.

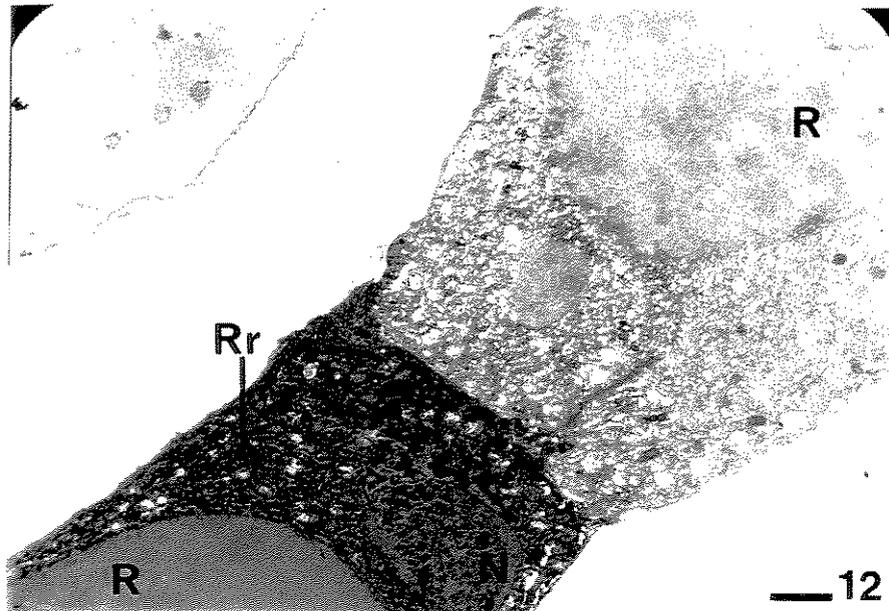


Figura 12

Micrografia eletrônica de transmissão. Corte transversal da glândula sexual acessória feminina de *C. putoria* mostrando duas células secretoras. A célula à esquerda apresenta a região próxima ao núcleo (N) com muitas vesículas de retículo endoplasmático (Rr). Estas vesículas não são vistas na célula à direita. O núcleo apresenta cromatina frouxa. R, reservatório. Barra, 4 μ m.

As glândulas possuem em seu exterior muitas traquéias que se ramificam e diminuem de calibre, originando traquéolas (Fig. 13). Em contato com o epitélio que forma a glândula, as traquéolas ligam-se a ele pela lâmina basal que por sua vez liga-se às células secretoras por meio de hemidesmossomos (Figs. 14 e 15).

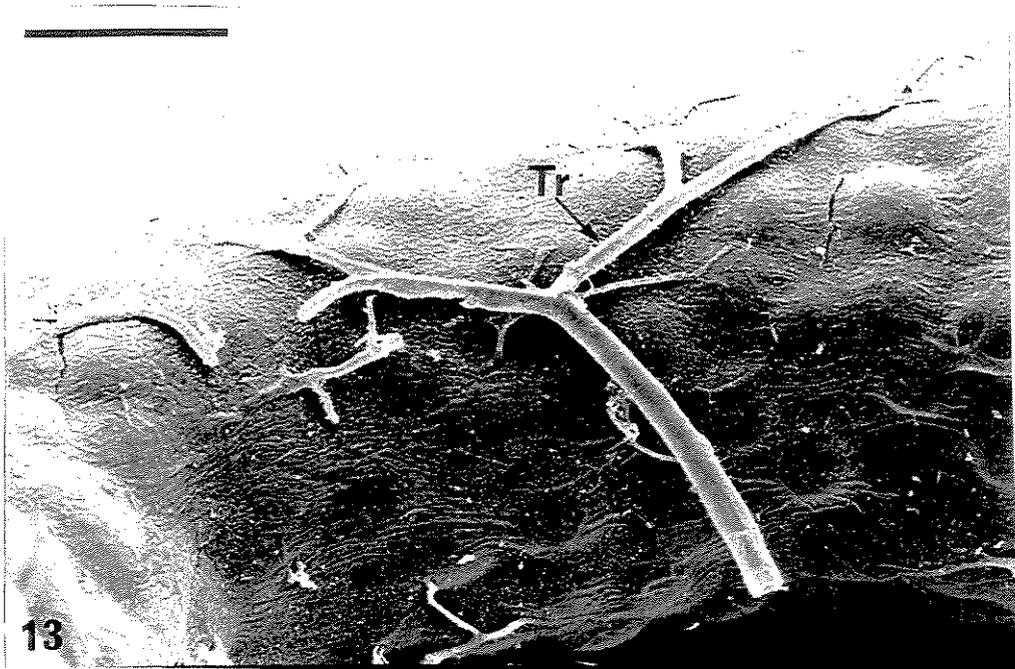


Figura 13
Micrografia eletrônica de varredura da glândula sexual
acessória feminina de *C. putoria*, mostrando traquéola
(Tr) em contato com o epitélio da glândula. Barra
50 μ m.

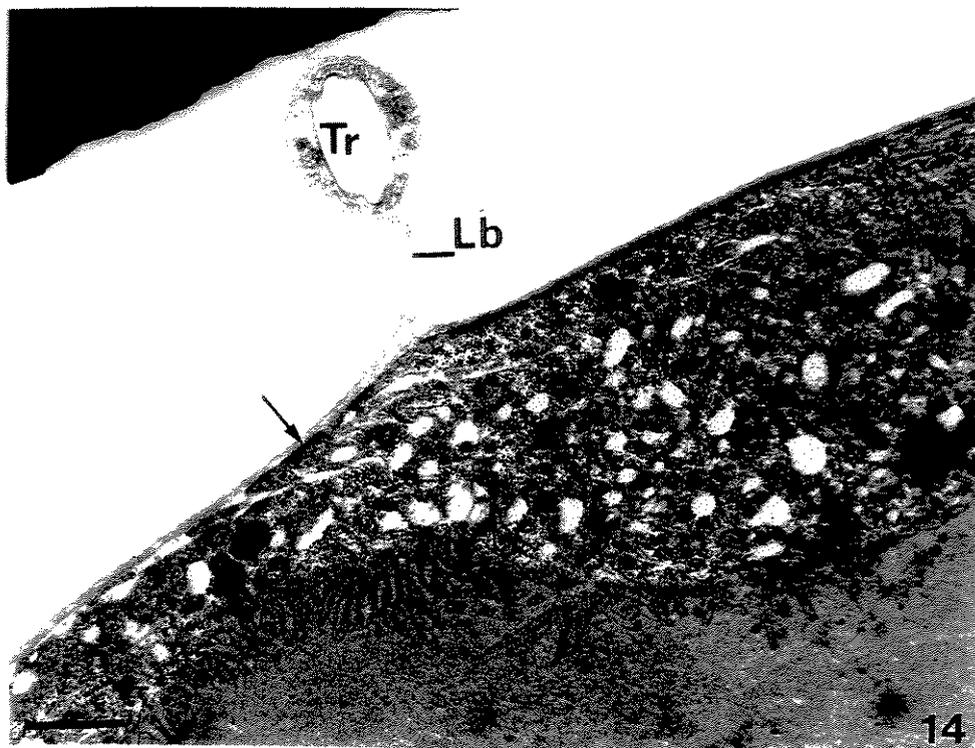


Figura 14

Micrografia eletrônica de transmissão. Corte transversal da glândula sexual acessória feminina de *C. putoria* mostrando célula secretora ligada à lâmina basal por hemidesmosomos (seta). A lâmina basal (Lb) liga-se a uma célula com traquéola (Tr) no seu interior, ligando-a à célula secretora Barra, 2 μ m.

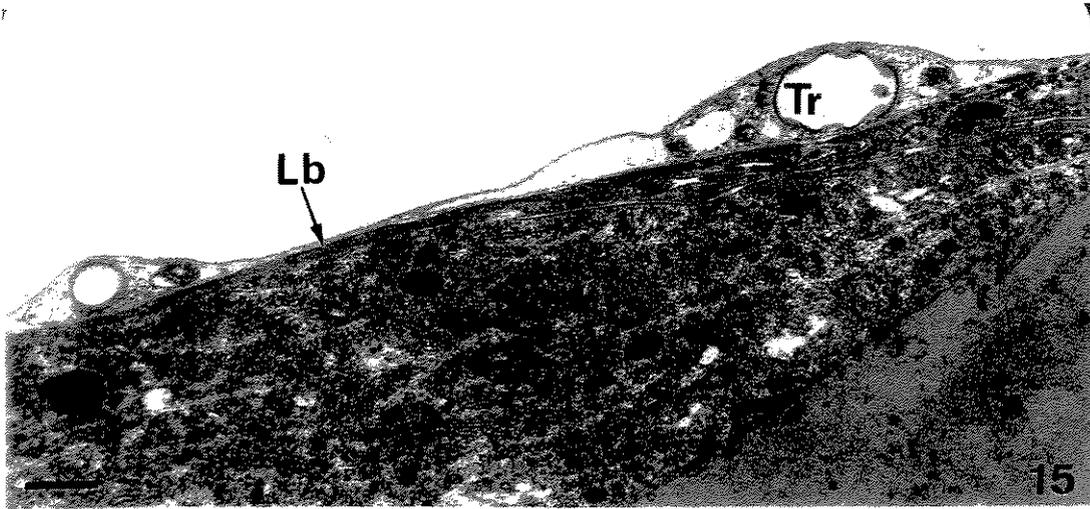


Figura 15
Micrografia eletrônica de transmissão. Células com traquéolas (Tr) junto à lâmina basal (Lb) da glândula sexual acessória feminina de *C. putoria*. Barra 1 μ m.

6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos bioquímicos

Poucos dados há na literatura referindo-se à quantidade de proteínas totais encontrada na secreção das glândulas acessórias femininas de insetos. Entre os Muscidae, *M. domestica* apresenta 0,7 a 1 µg de proteína por glândula (LEOPOLD, 1980), uma quantidade intermediária àquela encontrada em *M. stabulans* (0,39µg) e *S. nudiseta* (1,2µg). A quantidade de proteínas encontrada em cada glândula de *M. stabulans* difere enormemente da quantidade descrita na literatura para *M. domestica* (LEOPOLD, 1980), e mesmo para outras espécies de famílias como os Calliphoridae, a julgar por nossos dados de *C. megacephala* e *C. putoria*. Não encontramos dados na literatura, que se refiram à quantidade de proteínas encontrada na secreção das glândulas de outros Calliphoridae. Nossos resultados mostraram que a diferença na quantidade de proteínas observada em *C. putoria*, *C. megacephala* e *S. nudiseta* foi muito pequena.

Cada glândula de fêmeas de *C. capitata* produz 0,8µg de proteína (DALLAI *et alii*, 1989), uma quantidade intermediária àquelas encontradas por nós nas espécies em estudo.

As diferenças encontradas na migração eletroforética, especialmente das bandas correspondentes às proteínas com Mr compreendido entre 16,5 e 77,5 kDa de *C. putoria*, e 15,8 e 79,5 de *C. megacephala*, podem ser devidas à

presença de diferentes graus de glicosilação das proteínas, já que são de natureza glicoprotéica, como mostrado no gel corado pelo PAS.

As proteínas encontradas em *C. megacephala*, especialmente as com Mr de 29,8, 31,5 e 33,4 kDa, apresentaram uma migração aparentemente mais rápida no gel, em relação a *C. putoria*. Esta diferença pode ser devida à menor quantidade de açúcares presentes nas moléculas, já que se tratam de glicoproteínas, como indicado no gel corado pelo PAS. É importante ter em mente que no caso de glicoproteínas é bastante comum que as mesmas apresentem uma migração anômala em gel SDS-poliacrilamida, devido à própria presença dos açúcares (HAMES, 1990).

As proteínas encontradas na secreção das glândulas de *C. putoria* e *C. megacephala* têm um comportamento eletroforético semelhante, o que é esperado dada a proximidade filogenética entre as duas espécies do mesmo gênero. A proteína com 20,9 kDa que apareceu nitidamente em *C. megacephala* apareceu apenas em forma de traços em *C. putoria*, o que sugere que sua expressão seja sensivelmente reduzida nesta última espécie.

A comparação dos resultados dos membros da família Calliphoridae com os membros da família Muscidae, mostra diferença notável. Dentro desta última família, também se notou uma correspondência entre as bandas de 34,9 e 35,9 kDa de *M. stabulans* e as bandas de 33,8 e 38,6 kDa de *S. nudiseta*. As bandas correspondentes às proteínas com 19,5 e 21,7 kDa foram detectadas em *M. stabulans* mas não em *S. nudiseta*, podendo ser um fator diferencial importante entre estas duas espécies.

Avaliando o comportamento das várias proteínas em ausência e presença do agente redutor, vale ressaltar que as proteínas de aproximadamente 57 e 50 kDa encontradas ambas em *C. putoria* e *C. megacephala*, não puderam ser

identificadas em condições redutoras, no entanto as bandas nas posições de 16,5 e 15,8 kDa estão sensivelmente aumentadas, possivelmente pela presença de subunidades originadas das proteínas de 57 e 50 kDa. Com relação às outras proteínas tanto da família Calliphoridae como Muscidae, as diferenças observadas nas migrações das bandas em condições não redutoras e redutoras, muito provavelmente se devem às mudanças conformacionais resultantes do rompimento de pontes dissulfeto intracadeia, podendo levar a uma menor saturação do polipeptídeo com SDS (HAMES, 1990). A migração mais lenta das proteínas de *M. stabulans*, com 34,9 e 35,9 kDa e as proteínas com 33,8 e 38,6 kDa de *S. nudiseta*, sob condição redutora, pode ser atribuída ao rompimento de pontes dissulfeto intracadeia e à presença de açúcares ligados a elas. Acreditamos que a maioria das proteínas presentes na secreção das glândulas, das quatro espécies citadas, seja constituída por apenas uma cadeia polipeptídica.

A proteína 57,1 kDa observada em *C. putoria* e a proteína com 57,6 kDa observada em *C. megacephala*, são próprias de cada espécie, pois a primeira é glicosilada e a segunda não. Esta observação pode ser aplicada à proteína com 20,9 kDa observada em *C. megacephala* e à proteína com 21,1 kDa observada em *C. putoria*. A proteína com 20,9 kDa é própria de *C. megacephala*.

Em *C. capitata*, DALLAI *et alii* (1986) identificaram oito bandas protéicas no perfil eletroforético da secreção das glândulas sexuais acessórias. Destas, três bandas, com 28, 32 e 38 kDa, são glicosiladas. Nosso estudo mostrou proteínas glicosiladas com massa de 31,9 kDa na secreção das glândulas de *C. putoria*, 31,5 kDa em *C. megacephala* e 38,6 kDa em *S. nudiseta*. Elas podem ter relação com aquelas observadas em *C. capitata*.

Na quinta espécie analisada, *P. intermutans*, pertencente a uma terceira família, Sarcophagidae, observou-se semelhança em relação às proteínas com massa molecular relativa ao redor de 57, 50, 40, 34, 21 e 18 kDa de *C. putoria*; 20 e 18 kDa de *C. megacephala*; às proteínas com massa ao redor de 61, 35, 21 e 19 kDa de *M. stabulans*; e a proteína com massa ao redor de 74 e 33 kDa de *S. nudiseta*. A diferença observada no perfil protéico da secreção das glândulas de *P. intermutans* sob condição não redutora e redutora, indicou que há proteínas oligoméricas. As proteínas com 25,1, 27, 93,7, 96 e 99 kDa, não foram observadas sob condição redutora, muito provavelmente por serem compostas por mais de uma cadeia polipeptídica. A proteína com 54,6 kDa foi observada apenas sob condição redutora, podendo ter sido originada de alguma proteína oligomérica que permaneceu no gel de concentração ou que não apresentou migração característica.

6.2. Aspectos morfológicos

A comparação entre volume das glândulas e a razão largura da cabeça/volume da glândula mostrou não haver diferença entre as espécies de Calliphoridae estudadas, o mesmo ocorrendo com as espécies de Muscidae. No entanto, os resultados obtidos para Muscidae mostraram que suas glândulas são menores em relação ao corpo se comparados aos resultados obtidos para os Calliphoridae. Poderíamos assim especular que os Calliphoridae necessitam de glândulas maiores para produzir mais secreção, que seria empregada na fixação

dos ovos, em massa, no substrato; e os Muscidae não teriam esta necessidade por colocarem os ovos isolados entre si.

Os resultados ultraestruturais observados para *C. putoria* estão de acordo com os observados para as glândulas sexuais acessórias de insetos de modo geral, como descrito por NOIROT & QUENNEDEY (1974) e em dípteros como *M. ovinus* (LENOBLE & DENLINGER, 1982) e *C. capitata*, por exemplo (DALLAI *et alii*, 1985). Segundo a classe 3 descrita por NOIROT & QUENNEDEY (1974), as glândulas consistem de dois tipos celulares, a célula secretora e a célula epitelial. A célula secretora possui uma invaginação extracelular que contém o produto secretado. Em *P. perniciosus*, FAUSTO *et alii* (1997) observaram apenas um tipo celular sem invaginação extracelular. Os autores notaram ainda uma ligação temporal entre glândulas acessórias e desenvolvimento ovariano, também observado por TIRONE & AVANCINI (1997) nas glândulas de *C. putoria*.

A invaginação na célula secretora da glândula de *C. putoria* é um típico aparelho terminal (LOCOCO & HUEBNER, 1980). O material filamentososo observado no reservatório da célula secretora também foi observado por MA & DENLINGER (1974) em *G. morsitans morsitans* e por LENOBLE & DENLINGER (1982) em *M. ovinus*, os quais sugeriram um papel de proteção contra bactérias que estariam próximas à entrada do reservatório, a estrutura formada pela invaginação apical das células secretoras e que armazena a secreção originada no citoplasma.

A secreção produzida pelas células secretoras das glândulas de *C. putoria* é proteínácea e algumas proteínas são glicosiladas. A composição bioquímica e o tipo predominante de organela presente no citoplasma das células, retículo endoplasmático rugoso, confirma a natureza protéica da secreção. A presença de grandes volumes de retículo endoplasmático rugoso e liso foi observada nas glândulas de *G. morsitans morsitans* que produzem grande quantidade de

proteínas e lipoproteínas para alimentar a larva presente no útero (HECKER & MOLOO, 1983). Em *M. ovinus*, LENOBLE & DENLINGER (1982) observaram figuras de retículo endoplasmático rugoso, mas não de retículo endoplasmático liso. Como esperado, a região à volta do núcleo das células secretoras de *C. putoria* é rica em retículo endoplasmático rugoso, indicando atividade sintética da célula.

Junções septadas são comumente encontradas na região apical, onde as células secretoras das glândulas de *C. putoria* formam contatos com as células epiteliais. Isto foi observado também em *M. ovinus* por LENOBLE & DENLINGER (1982). Os microtúbulos preenchem o citoplasma das células secretoras em volta do reservatório, formando o citoesqueleto, fato também observado por DALLAI *et alii* (1988) em *C. capitata*. Saliente-se que nesta espécie os microtúbulos mudam sua distribuição em relação à atividade secretora das células e estariam envolvidos na secreção de proteínas.

A presença de traquéolas, exteriormente às glândulas, e em contato com a lâmina basal, observada em *C. putoria*, também foi observada em *C. capitata* por Dallai *et alii* (1985). Em *R. prolixus*, as traquéolas estão em contato com células musculares (LOCOCO & HUEBNER, 1980). Acreditamos que as glândulas são órgãos que necessitam de grande suprimento de oxigênio, por terem atividade de síntese.

6.3. Atividade antibacteriana

A resposta inata imune de insetos tem atraído muito interesse nos últimos anos. Os mecanismos de resposta imune incluem três modos, relacionados entre

si, de defesa; a indução de cascatas proteolíticas após ferimentos; reações de defesa celular que consistem de fagocitose e/ou encapsulação do microorganismo invasor; e a síntese transitória de peptídios antibacterianos pelo corpo gorduroso. Algumas moléculas antimicrobianas podem ser sintetizadas pelas células intestinais e pelas glândulas salivares (HOFFMANN *et alii*, 1996).

Existem estudos bem adiantados sobre o modo de produção, estrutura e ação de peptídios, das glândulas sexuais acessórias femininas de *C. capitata* (MARCHINI *et alii*, 1991 & 1993; MARRI *et alii*, 1996; ROSETTO *et alii*, 1997).

Em *C. capitata*, algumas proteínas têm atividade enzimática (MARCHINI *et alii*, 1989) e antibacteriana (MARCHINI *et alii*, 1991; 1993). A atividade antibacteriana da secreção das glândulas de *C. putoria* sobre a colônia de bactérias *E. coli* k12, mostrou maior poder inibitório que a secreção de *S. nudiseti*. A quantidade de proteína utilizada (120µg) da secreção de *C. putoria*, produziu uma área de inibição maior, mesmo quando a quantidade de bactérias (50µl de suspensão – 100.000 céls./ml) foi maior. Para *S. nudiseti*, também utilizamos 120µg de proteínas, mas 25µl de suspensão (100.000 céls./ml) de bactérias, e a área de inibição foi menor. Sugerimos a hipótese que as proteínas com 16,5 e 14,7 kDa da secreção das glândulas de *C. putoria* e *S. nudiseti*, respectivamente, poderiam ter função antibacteriana, pois em *C. capitata*, uma proteína com 15.5 kDa da secreção das glândulas tem atividade antibacteriana contra *E. coli* k12, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter cloacae* (MARCHINI *et alii*, 1991). FAUSTO *et alii* (1997) sugeriram a hipótese de que a secreção das glândulas de *P. perniciosus* poderia proteger os ovos contra bactérias e fungos, mas não apresentaram nenhuma evidência disto.

7. CONCLUSÕES

A quantidade de proteínas por glândula encontrada em *C. putoria*, *C. megacephala* e *S. nudiseta* é aproximadamente a mesma, sendo cerca de 3 vezes maior àquela encontrada em *M. stabulans*.

A eletroforese, sob condição não redutora, das proteínas presentes na secreção das glândulas de *C. putoria* mostrou que a massa molecular aparente entre 16,5 e 77,5 kDa; em *C. megacephala* entre 15,8 e 79,5 kDa; em *M. stabulans* entre 19,5 e 155,5 kDa; e em *S. nudiseta* entre 14,7 e 82,3 kDa. Sugerimos que algumas destas proteínas sejam monoméricas e algumas são glicosiladas. O perfil protéico observado entre os Calliphoridae é muito semelhante, assim como o perfil entre os Muscidae.

As proteínas presentes na secreção das glândulas de *P. intermutans* têm massa molecular aparente entre 8,5 e 99,4 kDa e algumas são oligoméricas.

O volume das glândulas dos Calliphoridae é maior que o dos Muscidae, o mesmo ocorrendo em relação à razão largura da cabeça/volume da glândula.

A secreção das glândulas de *C. putoria* e *S. nudiseta* inibe o crescimento de colônias de *E. coli* K12.

As glândulas de *C. putoria* são compostas por: células secretoras e células epiteliais, sendo observada a presença de traquéolas, que estão em contato com as células secretoras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIYODI, K. G. & ADIYODI, R. G. Morphology and cytology of the accessory sex glands in invertebrates. **Int. Rev. Cytol.** **43**: 353-78, 1975.
- AMORNSAK, W. , NODA, T. & YAMASHITA, O. Accumulation of glue proteins in the developing colleterial glands of the silkworm, *Bombix mori*. **J. Seric. Sci. Jpn.** **61**(2): 123-30, 1992.
- 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.
- BAXTER, J. A., MJENI, A. M. & MORRISON, P.E. Expression of autogeny in relation to larval population density of *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). **Can. J. Zool.** **51**: 1189-93, 1973.
- BERRY, S. J. The fine structure of the colleterial glands of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera). **J. Morph.** **125**: 259-80, 1968.
- BLUM, H. , BEIER, H. & GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** **8**:93-9, 1987.
- BORROR, D. J. , TRIPLEHORN, C. A. & JOHNSON, N. F. **An introduction to the study of insects**. 6th ed. Saunders College Publishing, Philadelphia, 875p. 1989.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**:248-54, 1976.

- BRUNO, T. V. , GUIMARÃES, J. H. , SANTOS, A. M. M. & TUCCI, E. C. Moscas sinantrópicas (Diptera) e seus predadores que se criam em esterco da aves poedeiras confinadas, no estado de São Paulo, Brasil. **Revta. bras. Ent.** **37(3):** 577-90, 1993.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects - Structure and Function.** 3rd ed. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, 919p. 1982.
- DALLAI, R. , DEL BENE, G. & LUPETTI, P. Fine structure of spermatheca and accessory of *Frakliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.** **25(3):**317-30, 1996.
- DALLAI, R. , MARCHINI, D. & CALLAINI, G. Microtubule and microfilament distribution during the secretory activity of an insect gland. **J. Cell Sci.** **91:** 563-70, 1988.
- 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. , DEL BENE, G. & MELIS-PORCINAI, G. Studies on the secretion of female reproductive accessory glands of *Ceratitis capitata*. **Proc. of the CEC/IOBC Inter. Symp.** p. 191-7, Rome/7-10 April 1987. Ed. R. Cavaloro. A. A. Balkema/Rotterdam/Brookfield/1989.
- 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. Internal genitalia of the female house-fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): analysis of copulation and oviposition. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** **2**(4): 313-25, 1973.
- DEGRUGILLIER, M. E. & LEOPOLD, R. A. Ultrastructure of sperm penetration of house fly eggs. **J. Ultrastruct. Res.** **56**: 312-25, 1976.
- DUBRAY, G. & BEZARD, G. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem** **119**: 325-9, 1982.
- FAIRBANKS, G. , STECK, T. L. & WALLACH, D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry** **10**(13): 2606-17, 1971.
- FAUSTO, A. M. , KHOURY, C. , MAROLI, M. & MAZZINI, M. Ultrastructure of reproductive accessory glands in the female sandfly *Phlebotomus perniciosus* Newstead (Diptera: Psychodidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** **26**(2): 121-8, 1997.
- FURLANETO, S. M. P. , CAMPOS, M. L. C. , HÁRSI, C. M. , BURALLI, G. M. & ISHIHATA, G. K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) no Brasil. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **15**(3):170-4, Jul./Set. ,1984.
- GILLOTT, C. Arthropoda-Insecta In: **Reproductive Biology of Invertebrates**, K. G. ADIYODI & R. G. ADIYODI (eds.). John Wiley and Sons, Chichester, V. III p. 320-471, 1988.

- 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. Fly-Organism Associations with systematic list of fly species. In: Greenberg, B. **Flies and Disease**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, V. I, p. 192-478, 1971.
- GREENBERG, B. & POVOLNÝ, D. Bionomics of Flies. In: GREENBERG, B. **Flies and Disease**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, V. I, p. 56-77, 1971.
- 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.
- HAGGARD, C. M. & GAMBOA, G. J. Seasonal variation in body size and reproductive condition of a paper wasp, *Polistes metricus* (Hymenoptera: Vespidae). **Can. Ent.** **112**: 239-48, 1980.
- HAMES, B. D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B. D. & RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins**. IRL Press, Oxford 2nd p. 1-147, 1990.
- HECKER, H. & MOLOO, S. K. Quantitative morphological changes of the uterine gland cells in relation to physiological events during a pregnancy cycle in *Glossina morsitans morsitans*. **J. Insect Physiol.** **29**(8):651- 8, 1983.
- HOFFMANN, J.A. , REICHHART, JM. & HETRU, C. Innate immunity in higher insects. **Curr. Opin. Immunol.** **8**: 8-13, 1996.

- IMBIRIBA, A. , S. , IZUTANI, D. , T. , MILHORETO, I. ,T. & LUZ, E. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera, Calliphoridae). **Arq. Biol. Tecnol.** **20**: 35-9, 1977.
- JAMES, M. T. **The Flies That Cause Myiasis in Man**. United States Department of Agriculture. Miscellaneous Publications n°. 631 p. 1-169 Washington, D. C. September 1947.
- 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.
- KAULENAS, M. S. **Insect accessory reproductive structures**. Springer-Verlag, Berlin, 224p. 1992.
- KETTLE, D. S. **Medical and Veterinary Entomology**. John Wiley & Sons, New York, 658p. 1984.
- KITAJIMA, E. W. & LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica**. NAP/MEPA, Esalq, USP. Piracicaba, São Paulo, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-5, 1970.
- 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.
- LENOBLE, B. J. & DENLINGER, D. L. The milk gland of the sheep ked *Melophagus ovinus*: a comparison with *Glossina*. **J. Insect Physiol.** **28**(2): 165-72, 1982.
- LEOPOLD, R. A. Accessory reproductive gland involvement with the sperm-egg interation 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.
- 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. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. **Revta. bras. Ent.** **32**(3/4): 383-92, 1988.
- LOCOCO, D. & HUEBNER, E. The ultrastructure of the female accessory gland, the cement gland, in the insect *Rhodnius prolixus*. **Tissue & Cell** **12**(3):557-80, 1980.
- LOPES, H. L. On the female holotypes of some american species described by Francis Walker and J. Macquart (Diptera, Sarcophagidae, Calliphoridae). **Rev. Brasil. Biol.** **33**(4): 535-50, 1974.
- MA, W. C. & DENLINGER, D. L. Secretory discharge and microflora of milk gland in Tsetse flies. **Nature** **247**:301-3, 1974.
- 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.
- MARCHINI, D. , MARRI, L. , ROSETTO, M. , MANETTI, A. G. O. & DALLAI, R. Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **240**:657-63, 1997.
- MARRI, L., DALLAI, R. & MARCHINI, D. The novel antibacterial peptide ceratotoxin A alters permeability of the inner and outer membrane of *Escherichia coli* K-12. **Current Microbiology** **33**:40-3, 1996.
- 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.
- MINITAB for windows, 1994. Minitab reference manual, Release 10.1, Minitab Inc., 3081 Enterprise Drive State College, PA 16801-3008.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Ann. Rev. Entomo.** **19**: 61-80, 1974.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. **Annls Soc. ent. Fr. (N. S.)**. **27**(2):123-8, 1991.
- POSTLETHWAIT, J. H., SAUL, S. H. & POSTLETHWAIT, J. A. The antibacterial immune response of the medfly, *Ceratitis capitata*. **J. Insect Physiol.** **34**(2): 91-96, 1988.
- POVOLNÝ, D. Synanthropy. In: GREENBERG, B. **Flies and Disease** Princeton University Press, New Jersey V. I, p. 17-54, 1971.

- ROSETTO, M., DE FILIPPIS, T., MANETTI, A. G. O., MARCHINI, D., BALDARI, C. T. & DALLAI, R. The genes encoding the antibacterial sex-specific peptides ceratotoxins are clustered in the genome of the medfly *Ceratitis capitata*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** **27**(12): 1039-46, 1997.
- SANTAROSA, P. L. & AVANCINI, R. ,M. , P. Desenvolvimento ovariano da mosca sarcosaprófaga *Pattonella intermutans* (Diptera: Sarcophagidae), um provável indicador forense. **Anais do V Congresso interno de iniciação científica – Unicamp**, p. 36. 17/11 a 21/11 de 1997.
- SAS Institute. 1992. SAS user's guide: statistics. SAS Institute, Cary, NC.
- SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Sociedade Brasileira de Microscopia Rio de Janeiro p. 1-17, 1998.
- SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Sociedade Brasileira de Microscopia Rio de Janeiro p. 1-17, 1998.
- SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. McGraw-Hill Book Company, New York, 667p. 1935.
- TERRANOVA, A. C. & LEOPOLD, R. A. Soluble acid phosphatases from the posterior reproductive system of the female housefly, *Musca domestica*. **J. Insect Physiol.** **19**:1129-45, 1973.
- TIRONE, G. & AVANCINI, R. M. P. Development of sexual accessory glands of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) during oogenesis. **Int. J. Insect Morphol. Embryol.** (1): 1-7, 1997.
- 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.

WIGGLESWORTH, V. B. **The Principles of Insect Physiology**. Methuen, London, & Co LTD, 741p. 1967.

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

ZUMPT, F. **Myiasis in Man And Animals in The Old World**. Butterworths, London, 1965.