

## DESENVOLVIMENTO DAS GÔNADAS DE *DERMATOBIA HOMINIS* (DIPTERA : CUTEREBRIDAE)

EDY DE LELLO, ELISA AP. GREGÓRIO & LUIS A. TOLEDO

*O trabalho descreve o desenvolvimento das gônadas do berne (D. hominis) durante o período pupal. As pupas desenvolvidas de larvas com peso superior a 650 mg, deram imagos fêmeas, enquanto que as desenvolvidas daquelas pesando entre 500 e 650 mg deram macho, tendo havido um erro ao redor de 5%. Até o oitavo dia de pupação os testículos crescem mais que os ovários; a partir daí diminui o desenvolvimento, parando de crescer entre o vigésimo e vigésimo quinto dias. A espermatogênese inicia por volta do sétimo dia de pupa quando é grande o número de espermátocitos. No décimo dia alguns testículos apresentam considerável número de espermátides e os espermatozóides começam a aparecer por volta do vigésimo dia. A espermiogênese desenvolve-se sem interrupção e ao final da pupação quase toda loja testicular está repleta de espermatozóides. Os machos começam a nascer dois dias antes das fêmeas. Nessas, os ovaríolos aparecem formados por volta do oitavo dia de pupa; os folículos se individualizam por volta do vigésimo dia de pupa onde se distingue os trofócitos com núcleos politênicos e citoplasmas bem basófilos, enquanto o ovócito tem citoplasma mais acidófilo e núcleo com cromatina bastante frouxa. A vitelogênese tem início ao redor do vigésimo quinto dia de pupa e se completa ao nascimento da imago. A ligação das gônadas com suas respectivas estruturas somáticas acontece ao redor do décimo terceiro dia de pupação.*

A diferenciação sexual em *Dermatobia hominis* começa a ser notada nas larvas com peso superior a 400 mg. Nas larvas consideradas "maduras", com peso superior a 500 mg as gônadas que se desenvolverão em testículos, têm a forma ligeiramente ovóide, de cor branca homogênea, medindo cerca de 350 a 300  $\mu$ m; ao corte apresentam-se envoltas por túnica externa sob a qual existe uma camada de células de núcleos oblongos; internamente misturam-se núcleos grandes arredondados (goniais), e ovóides (somáticos). Aquelas que se desenvolverão em ovário são ligeiramente maiores de forma elipsóide medindo ao redor de 500  $\mu$ m de eixo maior por 300  $\mu$ m de eixo menor, apresentando um sulco em seu terço superior que separa a gônada em duas zonas distintas. Ao corte mostra-se revestida por delicada túnica externa, sob a qual se ajeitam células de núcleos oblongos; esses mesmos tipos celulares constituem o sulco que é oblíquo ao eixo maior e que divide a gônada nas zonas distal e proximal. A zona distal apresenta vacúolos periféricos e núcleos picnóticos e é preenchida por células de núcleos ovóides pequenos. A zona proximal, que compreende dois terços da gônada, apresenta vacuolização em sua volta e núcleos picnóticos em sua base. No interior existem núcleos oblongos, ovóides (somáticos) e os grandes arredondados com cerca de 10  $\mu$ m de diâmetro que são os germinativos (Lello, Toledo & Gregório, 1984).

Com tais características a *D. hominis* chega ao final de sua fase larval e entra no seu estado de pupa.

O período pupal (pré-pupa e pupa) desenvolve-se dentro da terra e dura cerca de 30 a 35 dias à temperatura de 24 a 25°C e 70% de umidade relativa (Banegas, Mourier & Graham, 1967).

Neste trabalho descreveremos o desenvolvimento das gônadas nesse período.

### MATERIAL E MÉTODOS

Larvas do 3º instar foram obtidas por extração manual, de gado naturalmente infestado no campo. No laboratório eram pesadas e separadas em dois grupos: as com peso superior a 650 mg (o peso máximo foi ao redor de 900 mg) e aquelas pesando entre 500 e 650 mg. Tais grupos eram colocados separadamente, em caixas de plástico de 24 x 17 x 9 cm, contendo uma camada de 5 a 7 cm de terra úmida, onde penetravam para pupar.

Três dias após, a terra era peneirada, e as larvas que não conseguiam pupar eram descartadas. As que pupavam, apresentavam a cutícula de cor vinho escuro a preta, e endurecida. A partir dessa idade até o nascimento da imago foram dissecadas diariamente. Por causa da dureza da cutícula, para dissecá-las, retirava-se as placas dorsais com cuidado, e auxílio de uma lâmina de bisturi. Em seguida eram presas com alfinete entomológico em placa de dissecção, e umedecidas com solução fisiológica. Para facilitar a localização e visualização das gônadas gotejava-se sobre a pupa assim preparada, azul de metileno a 1 : 10.000.

Uma vez localizadas, as gônadas eram desenhadas no local, com auxílio de câmara clara.

Para o estudo histológico, as gônadas foram fixadas em líquido de Bouin alcoólico, incluídas em parafina e os cortes corados pelos métodos de HE, PAS, Feulgen e VMP. Algumas gônadas foram fixadas em etanol-acético 3 : 1, picadas e posteriormente esmagadas em orceína láctico-acética.

## RESULTADOS

**Período de pré-pupa (criptocéfala) – do terceiro ao quinto dia:** embora a cutícula externa apresente-se endurecida de cor vinho escura a preta, a pré-pupa é um pouco mole à apalpação. Uma tênue membrana separa as vísceras do envoltório pré-pupal. Os órgãos são muito semelhantes aos das larvas maduras. Descartando a camada superior do tecido gorduroso, separando os intestinos e seguindo os dois ramos laterais secundários das traquéias que partem dos principais, encontra-se facilmente as gônadas.

Naquelas que se desenvolveram de larvas pesando abaixo de 650 mg, o aspecto da gônada é o de uma esfera medindo cerca de 400 a 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro, um pouco maior que as células do tecido gorduroso, presas ainda ao cordão que circunda o ramo da traquéia. Esse tipo de gônada se desenvolverá em testículo (Fig. 1).

Naquelas desenvolvidas de larvas com peso superior a 650 mg, o tamanho da gônada é o mesmo, mas a forma é diferente, um pouco achatada e com um sulco no terço superior e inclinado em relação ao eixo ântero-posterior, formando uma estrutura à guiza de capuz. Essa gônada se desenvolverá em ovário (Fig. 2). No quarto dia o aspecto é semelhante ao do terceiro, havendo espessamento da membrana que envolve a pré-pupa; as gônadas crescem cerca de 100  $\mu\text{m}$ .

No quinto dia, a cutícula externa é bem dura e preta. As células gordurosas são grandes, esbranquiçadas com aspecto espumoso, e a despeito da perda da rigidez mantêm-se unidas constituindo o tecido em forma de fitas. O tubo digestivo começa a ficar mais flácido e transparente. As traquéias tornam-se murchas e flácidas. Os testículos são esféricos esbranquiçados, medindo cerca de 700  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fig. 3). Os ovários são levemente menores medindo cerca de 500 a 600  $\mu\text{m}$  de eixo maior por 300 a 500  $\mu\text{m}$  de eixo menor, evidenciando as duas zonas separadas por um sulco. Às vezes, eles aparecem na forma de rim onde a região que corresponde à medular é extrovertida. Conforme a maneira que a gônada é observada, apresenta um aspecto diferente (Fig. 4).

Um corte longitudinal passando pelo centro da gônada da Fig. 1 mostra um sutil arranjo das células na região basal, determinando uma zona periférica em forma de meia lua, onde se concentram núcleos arredondados envoltos por células ovóides. Este arranjo é o início da formação dos cistos dos testículos. Nessa mesma região existe vacuolização de algumas células grandes. Todo o resto da gônada possui núcleos arredondados grandes, médios e pequenos (Fig. 5).

Um corte central da gônada da Fig. 2, mostra que ela é dividida em duas zonas (distal e proximal), por um arranjo de células de núcleos oblongos; núcleos dessa forma, porém condensados se arranjam internamente sob a delicada túnica que reveste a gônada. No interior, observam-se muitas divisões celulares. Nessa idade encontramos variações nos graus de desenvolvimento do ovário. Essas vão desde apenas picnose dos núcleos e vacuolização das células dos pólos, até maiores rearranjos celulares. Assim, na porção da zona proximal, que limita com a distal, nota-se um arranjo das células em forma de pequenas pilhas paralelas entre si e perpendicularmente ao eixo maior da zona. Novo arranjo celular nessa zona proporciona o aparecimento das regiões central e basal. Na primeira se concentram as células de núcleos grandes goniais às quais se misturam núcleos menores; na basal se arranjam núcleos ovóides. Continuam as vacuolizações em ambas as zonas (Fig. 6).

A partir do quinto dia é clara a individualização dos testículos e ovários. Ao corte, os testículos apresentam-se envoltos por delicada túnica externa. O seu interior é repleto de cistos com células goniais de núcleos redondos envoltas por células somáticas de núcleos ovóides. No ovário, a região basal da zona proximal está muito mais desenvolvida, e individualizada, quando comparada a do terceiro dia. Esse desenvolvimento ocorre tanto na porção inferior como nas laterais dessa zona.

**Período de pupa (fanerocéfala) – do sétimo ao oitavo dia:** nos sétimo e oitavo dias já se encontra a pupa característica, livre do seu envoltório duro, e o corpo segmentado em cabeça, tórax e abdomen. Na cabeça estão os esboços das partes bucais e as elevações onde desenvolverão os olhos compostos. No tórax já estão prontos os esboços dos três pares de patas, do par de asas anteriores e do par de halteres. A cutícula externa é amarelada e fina como papel celofane, deixando ver por transparência no seu interior, glóbulos soltos de células do tecido gorduroso. Esses se desmancham com o simples gotejar de solução fisiológica sobre eles.

O ovário tem a forma de pêra preso à traquéia por um pedúnculo, medindo cerca de 800 por 600  $\mu\text{m}$ , apresentando nitidamente o sulco que o divide em duas zonas (Fig. 7).

O testículo apresenta a forma entre ovóide e arredondada, medindo cerca de 700 a 800  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fig. 8).

Ao microscópio o ovário mostra-se envolto por delicada túnica que se espessa levemente na região mais proximal, correspondente ao pedúnculo observado anatomicamente. Esse pedúnculo mostra ser o resultado do desenvolvimento das células de núcleos ovóides da região basal e lateral da zona proximal, e toma a forma de um cálice, com a porção mais dilatada limitando-se com a região central da gônada. Nesse limite podem aparecer núcleos picnóticos. Na região central tem início a individualização dos ovaríolos com as células de núcleos redondos, grandes e médios se arranjam em colunas de dois ou três núcleos, separados por delicada membrana. Na porção distal dessas colunas o arranjo das células é semelhante à pilha de moedas e na porção proximal estão ainda desorganizadas (Fig. 9).

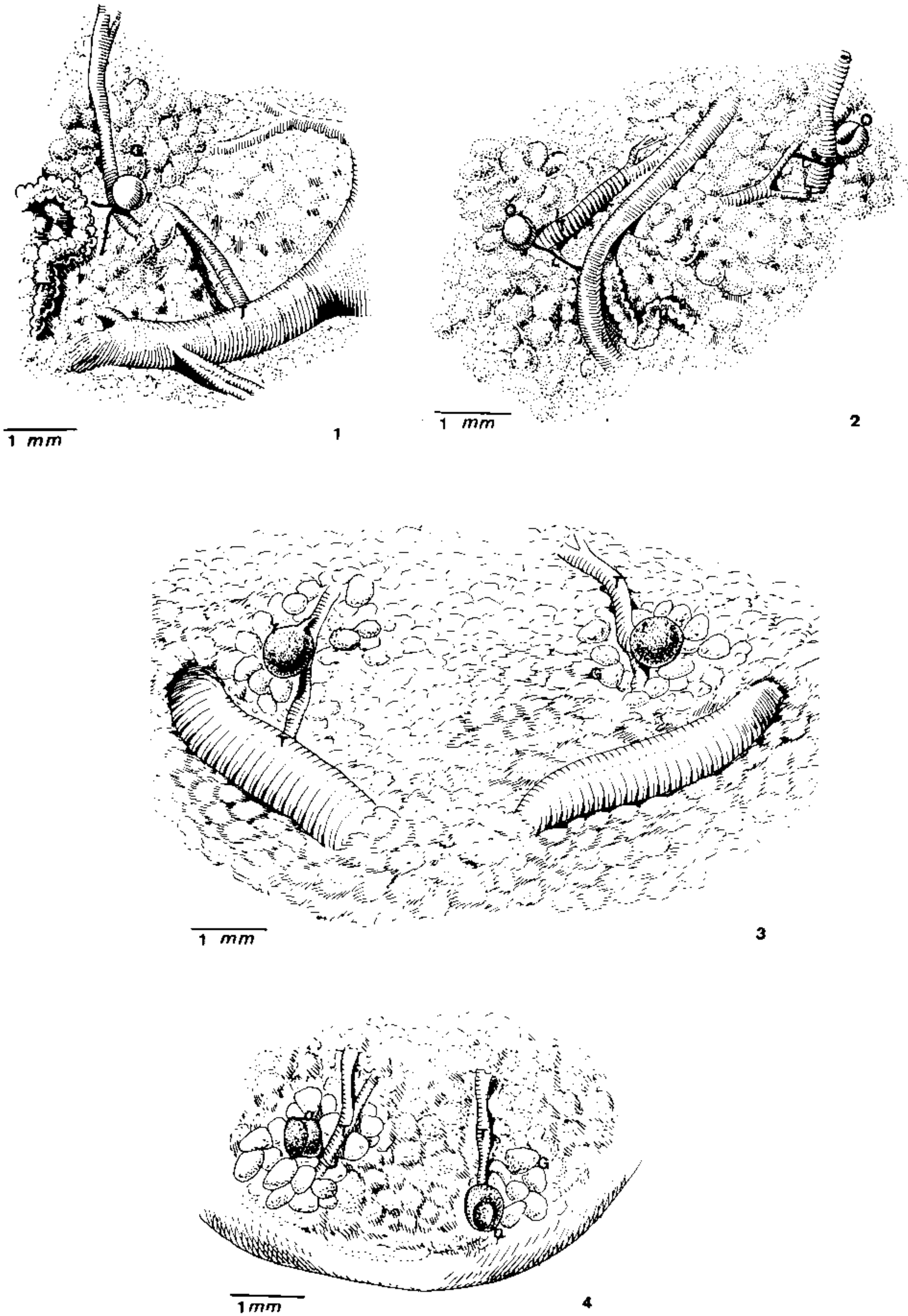


Fig. 1: esquema do testículo direito (t) em pré-pupa de três dias. G = tecido gorduroso; T = traquéia. Fig. 2: esquema dos ovários (O) em pré-pupa de três dias. Fig. 3: esquema dos testículos (t) em pré-pupa de cinco dias. Fig. 4: esquema dos ovários (O) em pré-pupa de cinco dias.

Um corte central do testículo mostra que ele é envolto por delicada cutícula externa, sob a qual se arranja uma camada de células pavimentosas. Todo o testículo está formado por cistos contendo células goniais, de núcleos grandes, claros, redondos envolvidos por células somáticas menores. De um modo geral um terço dos cistos exibem grande atividade divisional (Fig. 10).

No décimo dia a pupa mantém as características externas do oitavo dia. Os ovários continuam se desenvolvendo tomando a forma de figo, com a porção anterior mais larga e já em processo de achatamento, e a porção posterior em forma de pedúnculo alargado. Na porção anterior, pode-se ver por transparência delicados filamentos que correspondem aos ovaríolos em formação.

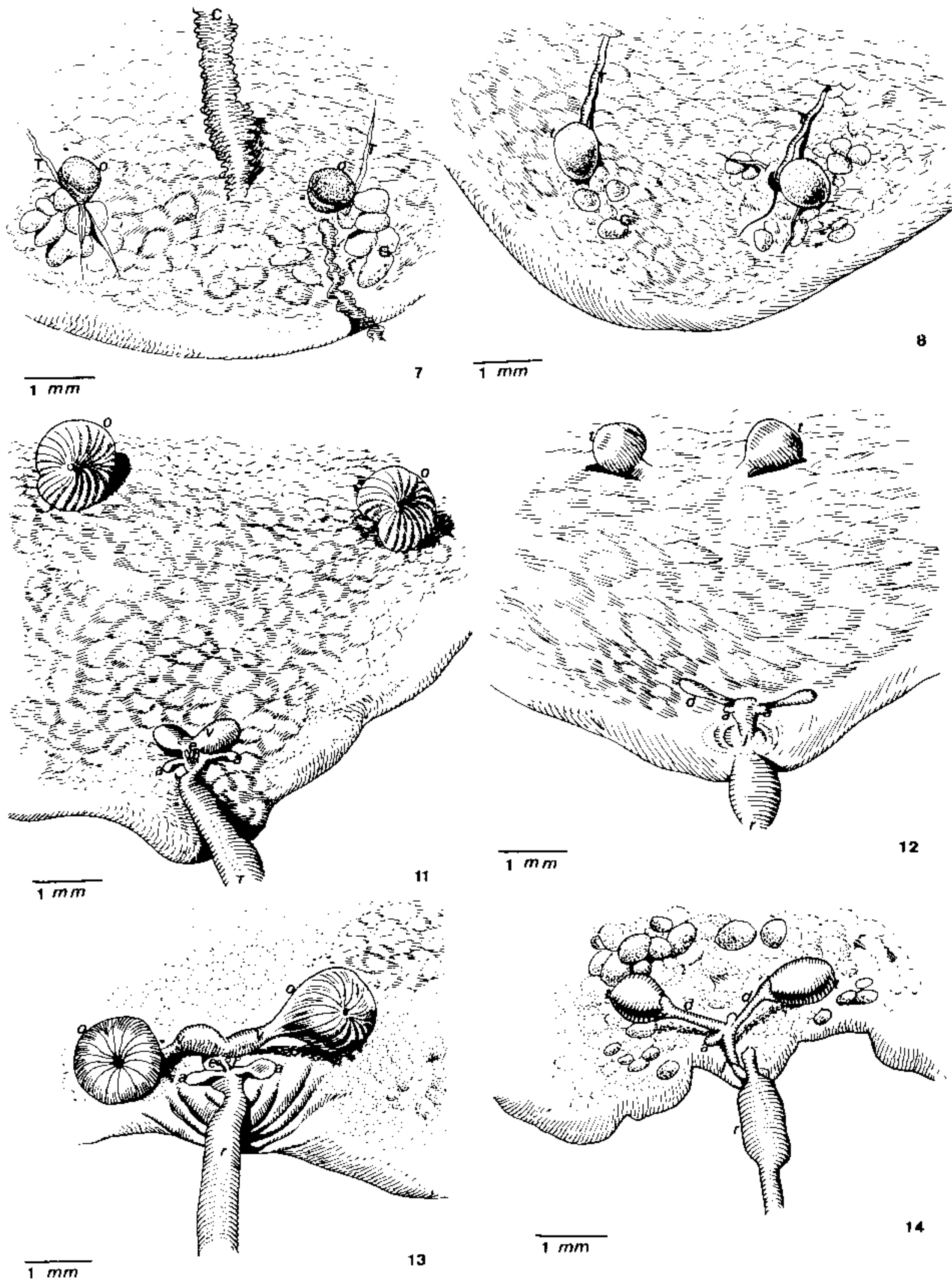


Fig. 7: esquema dos ovários (O) de uma pupa de oito dias. T = traquéia; G = tecido gorduroso; C = vaso dorsal. Fig. 8: esquema dos testículos (t) de uma pupa de 8 dias. Fig. 11: esquema dos ovários (O) e anexos em desenvolvimento de uma pupa com 13 dias; a = glândulas anexas; e = espermateca; v = oviduto. Fig. 12: esquema dos testículos (t) e anexos em desenvolvimento de uma pupa com 13 dias; a = glândulas anexas; d = canal deferente. Fig. 13: esquema dos ovários (O) e anexos em pupa de 12 dias; a = glândulas anexas; e = espermateca; r = reto; v = ovidutos. Fig. 14: esquema dos testículos (t) em anexos em pupa de 13 dias; a = glândulas anexas; d = canal deferente; j = canal ejaculador; r = reto.

Os testículos aparecem como duas esferas claras com pedúnculo que se aprofunda para o interior do abdômen. Eles contrastam com os glóbulos de gordura que são opacos, leitosos.

A partir do décimo primeiro dia observa-se o desenvolvimento da porção somática do aparelho reprodutor. Assim, desde o décimo primeiro ao décimo quarto dia encontra-se esboços, nas pupas fêmeas, da vagina, ovidutos, glândulas anexas e espermateca, e nas pupas macho, esboços dos canais deferentes, ejaculador e glândulas anexas. Esses esboços crescem a partir do disco imaginal na porção posterior do corpo, em direção às gônadas (Figs. 11 e 12). Existe, entretanto, uma variação no desenvolvimento, e por isso em algumas pupas, nesse mesmo período, já se estabeleceu a ligação entre essa porção somática e as respectivas gônadas (Figs. 13 e 14). Os ovários podem aparecer na forma de cogumelo, medindo cerca de  $700\mu\text{m}$  de diâ-

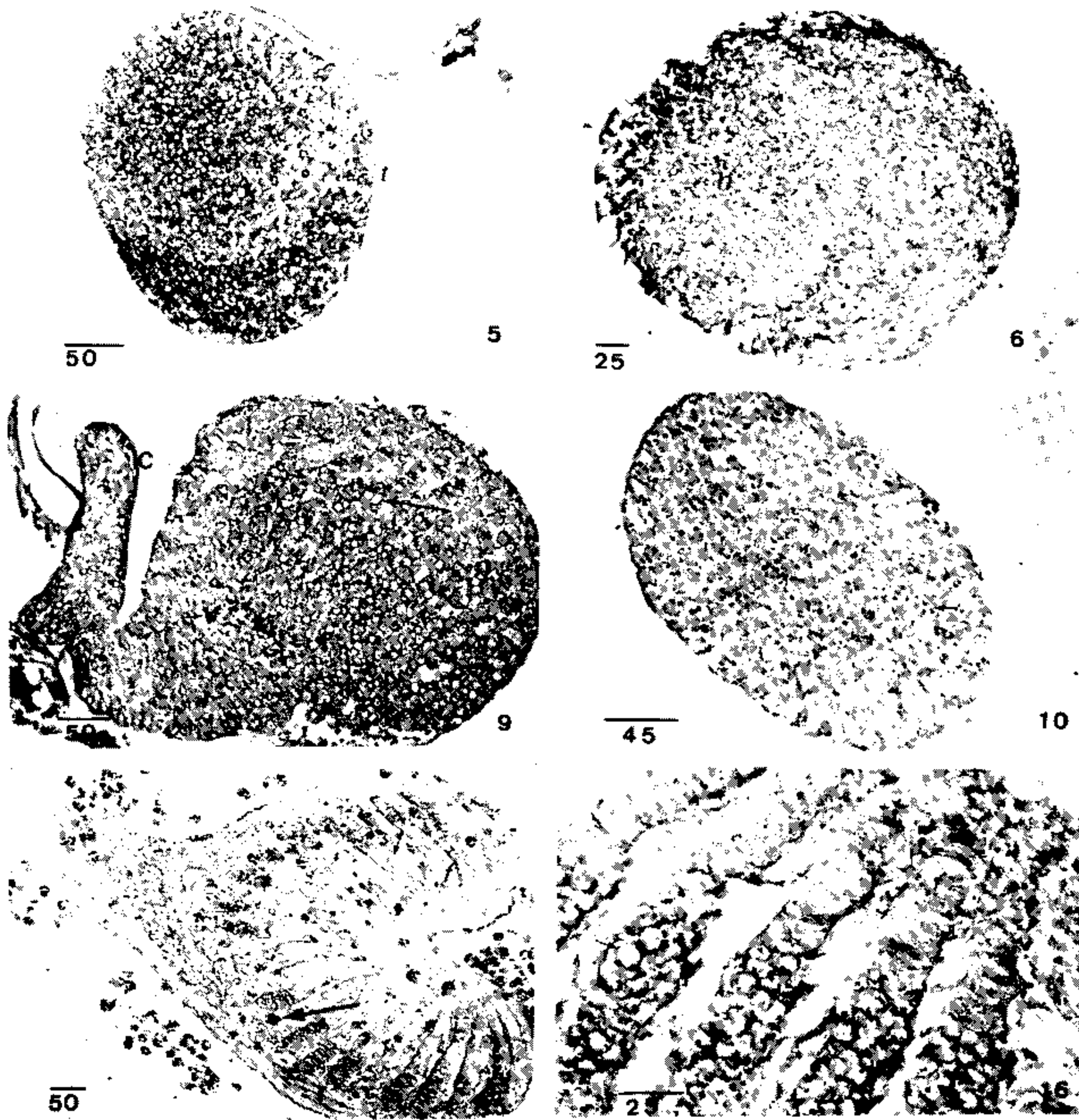


Fig. 5: corte longitudinal passando pelo centro do testículo (t) de uma pré-pupa de 3 dias. Fig. 6: corte de topo e central em ovário de pré-pupa de 3 dias; h = zona distal; x = região central da zona proximal; y = região basal da zona proximal. Fig. 9: corte longitudinal passando pelo centro do ovário de uma pupa de oito dias. C = cordão celular sólido; seta curta = núcleos picnóticos; seta longa = células goniais nos ovaríolos; f = filamento terminal. Fig. 10: corte longitudinal de testículo em pupa de oito dias. Seta aponta núcleos em divisão nos cistos. Fig. 15: corte longitudinal e central de ovário de pupa com 15 dias; f = filamento terminal; seta curta = células goniais nos ovaríolos; seta longa = massas cromófilas (fagócitos). Fig. 16: pormenor, em corte longitudinal da porção anterior dos ovaríolos de pupa com 15 dias. Seta indica célula gonial; f = filamento terminal. Escalas em micrômetros.

metro, e com ovidutos muito débeis, se desmanchando ao menor contato, ou bem caracterizados, em forma de figo, medindo 1,5 mm de eixo transversal, em sua porção superior, que é mais alargada. Nestes aparecem ainda, bem evidentes, as duas glândulas anexas e a espermateca. Histologicamente o ovário é envolto por uma membrana amorfa, sob a qual permanece uma camada de células pavimentosas. O pedúnculo, é constituído por dois tipos de células: um com núcleos pequenos e picnóticos e outro de núcleos médios, frouxos e arredondados, exibindo atividade mitótica. Na porção mediana do mesmo, misturam-se núcleos grandes, frouxos e arredondados, núcleos pequenos e picnóticos e núcleos médios, também frouxos. Cada ovaríolo bem individualizado, mostra em sua porção apical, células que se arranjam como pilhas de moedas, formando o filamento terminal. Abaixo deste, na chamada zona germinativa as gônias e as células ovóides se misturam, sendo intensa a atividade divisional.

Nos machos, os testículos podem aparecer como duas esferas translúcidas medindo cerca de  $800\mu\text{m}$  de diâmetro, ou de forma ovóide medindo ao redor de  $850\mu\text{m}$  de eixo maior por  $700\mu\text{m}$  de eixo menor, com canais deferentes, glândulas anexas e canal ejaculador.

Histologicamente os testículos não diferem muito daqueles de dez dias.

Ao redor do décimo quinto dia, os ovários, já apresentam uma depressão em sua região apical onde se encontram células em picnose e onde aparecem massas coradas de tamanhos diversos, acidófilas, com porções basófilas, e PAS positivas. Os ovaríolos exibem duas zonas bem individualizadas: a dos filamentos

terminais, e as zonas germinativas. Sua porção mais proximal, se confunde com a região basal do ovário, onde as células se arranjam para formar os pedicelos e o cálice. À medida que prossegue o desenvolvimento, fica mais evidente a individualização dos ovaríolos e suas zonas, enquanto a porção apical do ovário se atrofia, formando uma depressão, e a basal desenvolve o cálice. Entre os ovaríolos, e na região de seus futuros pedicelos, aumentam as massas coradas (Figs. 15 e 16).

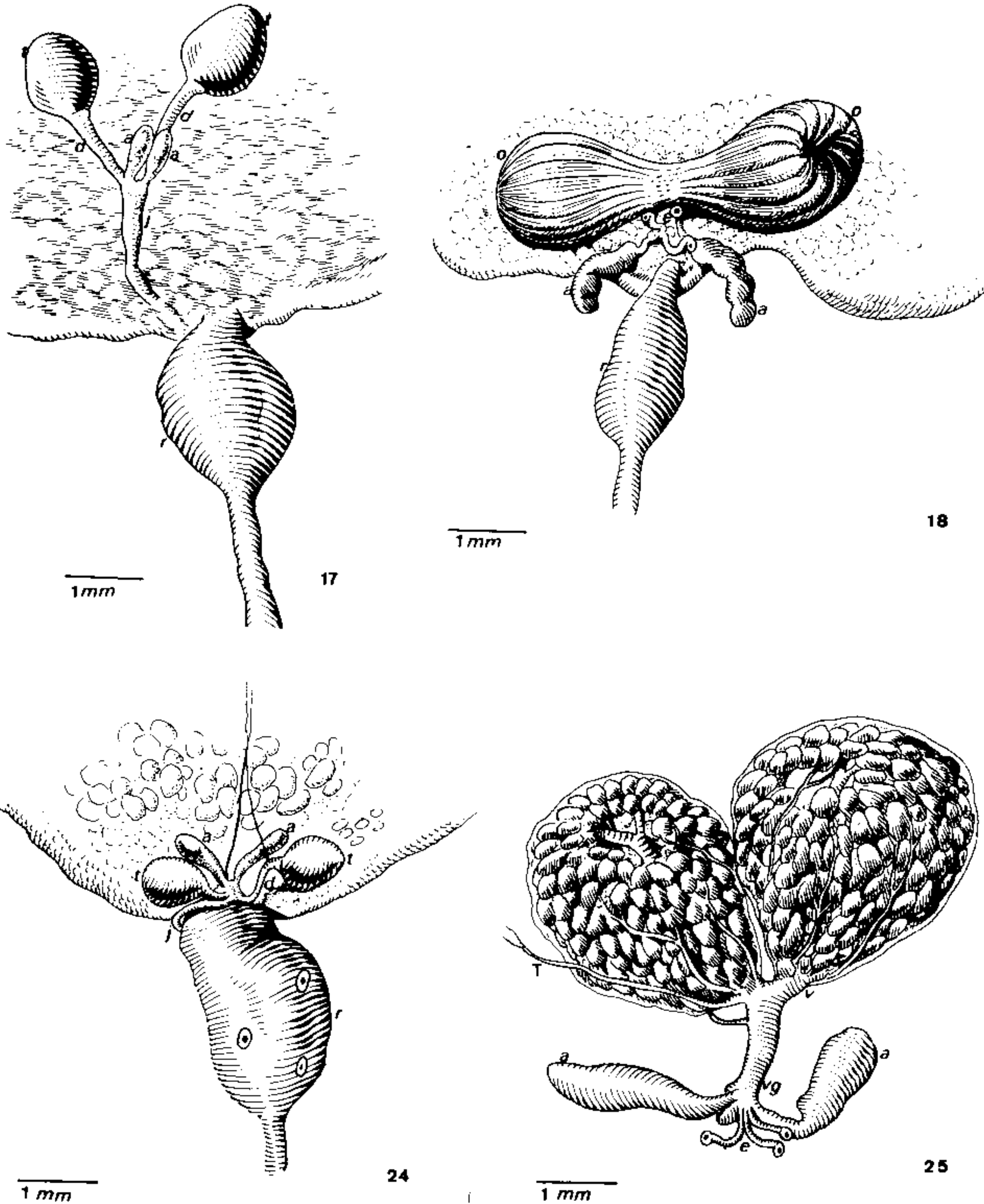


Fig. 17: esquema dos testículos (t) e anexos em pupa de vinte dias; a = glândulas anexas; d = canal deferente; j = canal ejaculador; r = reto. Fig. 18: esquema dos ovários (O) e anexos em pupa de 20 dias. a = glândulas anexas; e = espermateca, r = reto. Fig. 24: esquema dos testículos (t) e anexos em pupa de vinte e sete dias; a = glândulas anexas; d = canal deferente; j = canal ejaculador; r = reto. Fig. 25: esquema dos ovários e anexos em pupa de vinte e sete dias; a = glândulas anexas; e = espermateca; T = traquéia; v = oviduto; vg = vagina.

Depois do décimo quinto até o vigésimo dia, observam-se diferenças anatômicas nas pupas. De um modo geral ao redor do décimo nono dia elas têm olhos alaranjados ou cor de tijolo.

Os testículos crescem menos que os ovários. Tomam a forma de raquete e seu tamanho varia de 0,7 a 0,9 mm a 1,0 por 1,5 mm; deles partem os canais deferentes, estreitos e não muito longos que desembocam no canal ejaculador. Este é longo e muitas vezes tortuoso. Para desembocar no pênis ele faz uma volta por trás do reto em sua porção bem posterior. Na altura em que os canais deferentes desembocam no canal ejaculador, existe uma pequena dilatação deste último. Nessa mesma porção desembocam duas glândulas acessórias, com forma de pequena raquete (Fig. 17).

Enquanto isso, os ovários, cada vez mais, tomam a forma de figo, envoltos por delicada membrana que deixa ver por transparência, os ovaríolos. Seu tamanho varia desde 1 até 2 mm de eixo longitudinal, pela mesma medida do eixo transversal que passa pela porção superior mais dilatada. Cada ovário se continua

por um pequeno e largo oviduto lateral que se une com seu homólogo para dar o oviduto comum, continuando pela vagina a qual se abre na porção posterior do abdomen. Na região mediana desembocam duas glândulas anexas em forma de fita larga, e a espermateca, como três delicadas expansões em cujas extremidades existe uma dilatação revestida internamente por quitina (Fig. 18). Nessa fase os ovaríolos possuem três porções características: a apical, com o filamento terminal, a germinativa, logo abaixo onde se desenvolvem os folículos, e o pedicelo que se continua pelo cálice (Fig. 19). Por volta do vigésimo dia, os folículos aparecem como ninhos de núcleos redondos e claros, envoltos, por células achatadas. Cada folículo é separado do seguinte por um epitélio interfolicular. As células que preenchem os espaços interovariolares se separam, diminuem de número e aumentam as massas coradas.

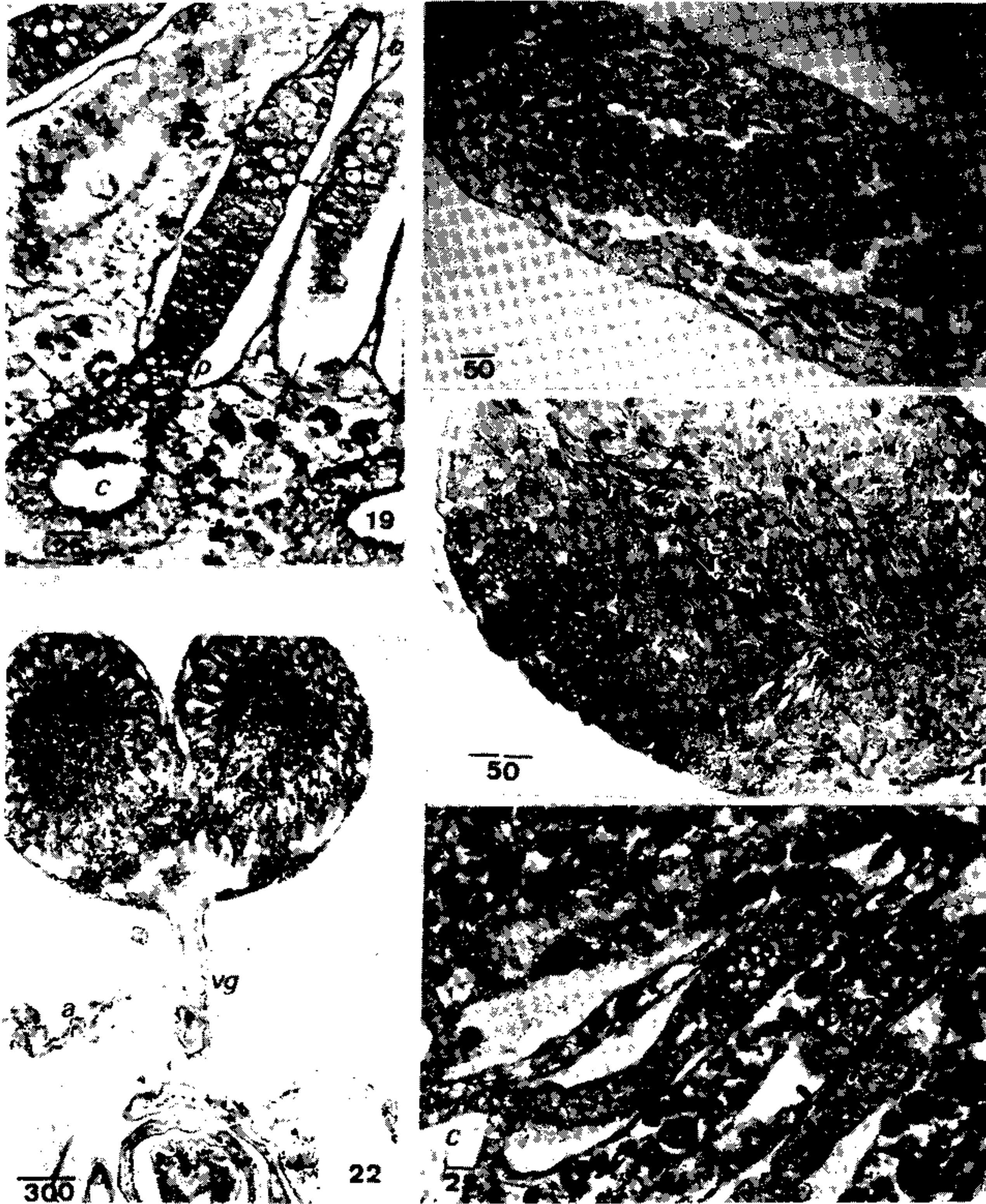


Fig. 19: corte longitudinal em ovário de pupa de dezoito dias, destacando um ovaríolo; c = cálice; f = filamento terminal; seta curta = célula gonial no germário; seta longa = fagócitos. Fig. 20: corte longitudinal de testículo de pupa com vinte e um dias; z = espermatozoides. Fig. 21: corte longitudinal de testículo em pupa de vinte e quatro dias; z = espermatozoides. Fig. 22: corte longitudinal passando pelos ovários e anexos de uma pupa com vinte e um dias; a = glândulas anexas; vg = vagina. Fig. 23: pormenor do ovário da figura anterior, onde um ovaríolo é visto quase integralmente; c = cálice; p = pedicelo; seta curta = germário; seta longa = fagócitos. Escalas em micrômetros.

Os testículos nessa mesma idade apresentam cerca de 30% de seu volume repleto de espermatozoides, enquanto que em grande parte dos cistos restantes continua a espermiogênese e uns poucos ainda têm células em divisão (Fig. 20).

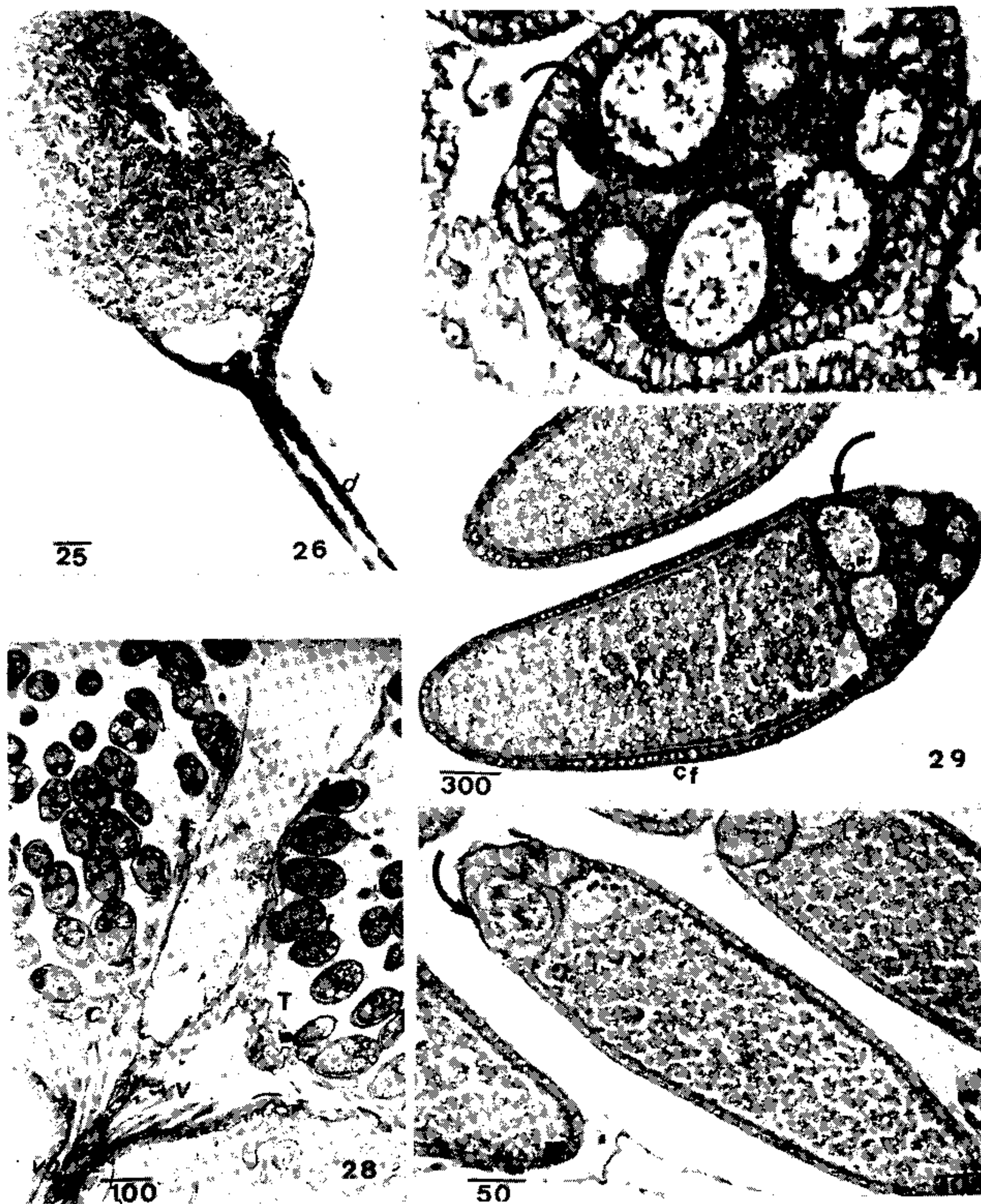


Fig. 26: corte longitudinal de testículos (t) em pupa de vinte e seis dias; d = canal deferente; z = espermatozóides. Fig. 27: corte transversal de um folículo em ovário de pupa de trinta dias; cf = células foliculares; seta menor = núcleo do ovócito; seta maior = núcleo de um trofócito. Fig. 28: corte mostrando parcialmente as porções basais dos ovários de uma pupa de trinta dias; c = cálice; f = folículos; T = traquéias; v = oviduto; vg = vagina. Fig. 29: corte em folículo do ovário de uma pupa com trinta e dois dias; cf = células foliculares; v = vitelo; seta maior = núcleo de trofócito; seta menor = núcleo de ovócito. Fig. 30: corte em folículo do ovário de uma pupa com trinta e quatro dias; seta indica núcleo de um trofócito em degeneração; v = vitelo. Escalas em micrômetros.

No vigésimo segundo dia, além dos olhos cor de tijolo escuro, a pupa mostra um sombreado no tórax esboçando as riscas escuras que aparecerão na imago; o resto do corpo continua amarelo-claro. Por volta do vigésimo terceiro dia o tórax apresenta-se escurecido, pela presença dos pêlos que estão crescendo; as asas e em algumas, os tergitos abdominais aparecem escurecidos também. Toda a pupa é envolta por uma membrana final, transparente.

Esse desenvolvimento não é rígido, e por vezes encontra-se no vigésimo quinto dia, pupas ainda com o abdomen claro, enquanto outras no vigésimo quarto dia os possuem totalmente escurecidos. Internamente essas pupas apresentam as células do corpo gorduroso na forma de glóbulos soltos e opacos. O reto vai acumulando em seu interior uma substância branco-leitosa, muito semelhante à gordura das pupas com quinze dias de idade.

Anatomicamente o aparelho reprodutor masculino durante esse período permanece praticamente inalterado. Ao microscópio o testículo em geral apresenta-se repleto de espermatozóides, havendo ainda cistos com espermátocitos e espermátides (Fig. 21).

Nessa fase, os ovários, medem de 2,0 a 2,5 mm. As glândulas acessórias, com 2 mm de comprimento por 0,5 a 0,8 mm de largura, apresentam um brusco estreitamento à guiza de canal antes de desembocar na vagina, na mesma altura de onde parte a spermateca. Na porção apical de cada ovário, a depressão obser-



vada anatomicamente mostra um aglomerado de material granuloso; de tamanho, forma e coloração diferentes; esse mesmo material apresenta-se em quantidade considerável na região basal do ovário, separando os ovaríolos e as ramificações do cálice (Fig. 22). Nos ovaríolos, revestidos por células pavimentosas, o filamento terminal está em involução, enquanto se destacam, a câmara germinativa e folículos. Na porção proximal do ovaríolo, o pedicelo é formado por células cúbicas de núcleos condensados. Cada ovaríolo é revestido por uma membrana que possui núcleos pequenos e pavimentosos; outra membrana contém o material granuloso interovariolar. Entre essas duas membranas existe um material homogêneo floculento (Fig. 23). As glândulas anexas possuem revestimento simples de células prismáticas sobre as quais repousa uma membrana quitinosa. Nessas células o citoplasma basal é basófilo enquanto que o apical é acidófilo.

A partir do vigésimo sétimo dia, todas as pupas têm o corpo com as características do adulto, estando envoltas ainda pela membrana pupal. Internamente o corpo gorduroso apresenta-se na forma de glóbulos de tamanhos variados, alguns opacos e outros transparentes como aparecem no adulto. O reto continua cada vez mais dilatado, cheio de substância esbranquiçada.

Os testículos não aumentam seu tamanho, ao contrário sofrem ligeira diminuição. As suas glândulas acessórias e demais porções somáticas continuam inalteradas (Fig. 24).

Os ovários aumentam principalmente em largura, os folículos fazem saliência em sua parede forçando a delicada membrana que a constitui. Muita ramificação traqueal de fino calibre, envolve e penetra por todo o ovário. São com esses mesmos aspectos que eles se apresentam ao nascimento da imago (Fig. 25).

Histologicamente os testículos estão repletos de espermatozóides, ou com poucos cistos ainda em espermatogênese. Na porção basal do mesmo, a parede apresenta algumas células mais altas em continuidade com uma estrutura semelhante à taça a qual por sua vez, se continua pelo canal deferente (Fig. 26). O canal ejaculador é envolto por uma camada muscular e revestido internamente por epitélio cilíndrico alto, deixando uma luz muito pequena.

Entre o vigésimo e o trigésimo dia os ovários apresentam os folículos bem caracterizados, envolvidos pelas células foliculares, que são cúbicas; na porção apical de cada folículo encontram-se trofócitos, com núcleos politênicos; na região basal, de tamanho menor, encontra-se o ovócito (Fig. 27). Nos folículos mais basais de cada ovaríolo, a vitelogênese já iniciou e os ovócitos crescem armazenando substâncias em seu citoplasma. No limite entre os trofócitos e o ovócito, aparece um conjunto de três a quatro pequenas células, denominadas "border cells", por King (1970). Nessa fase não aparecem mais as massas coradas entre os ovaríolos; nessa região existe apenas ramos traqueais (Figs. 27 e 28). No trigésimo segundo dia começam a degenerar os trofócitos enquanto o ovócito continua crescendo (Fig. 29). Pouco antes do nascimento, o folículo mostra os trofócitos se degenerando, o ovócito toma a forma oblonga acumulando mais vitelo (Fig. 30).

Em média, o período de pupa enquanto durou o experimento foi de trinta a quarenta dias.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Da mesma maneira que fizemos ao discutir a diferenciação das gônadas nas larvas (Lello, Toledo & Gregório, 1984) compararemos nossos resultados com outros três gêneros de Diptera: a *Hipoderma bovis* e *Hipoderma lineatum*, a *Calliphora erythrocephala*, e a *Drosophila melanogaster*.

**Desenvolvimento do ovário:** o ovário de uma pré-pupa de três dias tem o desenvolvimento equivalente ao de uma larva de *Hipoderma*, no início do terceiro instar. Entretanto é muito parecido com o ovário de *Drosophila* com 2 horas de pré-pupa e com a da *Calliphora* também nesse período de pupa criptocéfala. Vale lembrar que o período de pré-pupa em *Drosophila* é de 12 horas, em *Calliphora* um dia em *Dermatobia* cinco a seis dias.

Nessa fase, em *Calliphora*, segundo Leloup (1974) o ovário apresenta duas zonas somáticas, uma interna e outra externa e uma zona germinativa que é interna. Considera zona somática interna, aquela formada pelas células de núcleos oblongos que são as primeiras a se disporem de maneira tal a dividir a gônada em zona distal e proximal. Segundo esse autor ainda, essas células serão as que se arranjarão de maneira a formar os filamentos terminais dos ovaríolos. A zona somática externa é constituída pelas células que ocupam a zona distal e as que ocupam a região basal da zona proximal. As primeiras terão dois destinos distintos: as mais apicais tornar-se-ão picnóticas e desaparecerão, as demais se infiltrarão na região mediana da zona proximal e possibilitarão o aparecimento dos ovaríolos, tomando-se, algumas, as responsáveis pela rede celular que reveste cada ovaríolo. As células da região basal da zona proximal, também terão dois destinos: umas sofrerão picnose e desaparecerão para permitir a formação de cavidade do cálice ovariano e outras formarão o cálice e parte da rede que separa os ovaríolos. Das somáticas internas, algumas participarão na formação do pedicelo e outras na formação da região média dos ovaríolos, juntamente com as células germinativas.

Em *Drosophila*, segundo King (1970), o ovário da pré-pupa de 2 horas, é elipsóide com uma população celular que pode ser dividida em apical, basal e central; as duas primeiras possuem células somáticas pequenas enquanto na última predominam as germinativas, grandes. Desse momento em diante começa a diferenciação dos ovaríolos com o aparecimento dos filamentos terminais por empilhamento de células centrais. À medida em que prossegue o desenvolvimento, há infiltração de células apicais em direção às centrais e o aparecimento de uma membrana (túnica própria) na interface separando essas células dos filamentos ter-

minais. King (1970) sugere que a túnica própria é secretada pelas células apicais, como uma resposta delas às células dos filamentos terminais, reconhecendo-as como diferentes.

Segundo Boulard (1967), em *Hipoderma* são as células apicais que se arranjarão para formar os filamentos terminais dos ovaríolos. Conforme sua observação, antes de se formarem os ovaríolos aparece uma membrana secretada pelas células apicais, separando a zona apical da basal. Depois essa membrana começa a formar pregas enquanto células da zona apical penetram entre essas pregas, e outras se empilham sobre elas para formar os filamentos terminais.

Nossas observações em *Dermatobia* são concordantes com os achados em *Calliphora* e *Drosophila*, seja pela diferenciação das diferentes zonas citadas seja pelo crescimento da gônada. Não temos condições para afirmar quais são as células que secretam a membrana que reveste cada ovaríolo, mas verificamos que as células oblongas que primeiramente dividem o ovário nas zonas distal e proximal dão a impressão de que estão se movimentando da periferia para o interior da gônada e nesse ponto de migração também penetra parte da membrana amorfa que envolve o ovário.

A fase de pupa propriamente dita, chamada de "ninf-fanerocefala" por Leloup (1974), inicia-se após o sétimo dia de pupação em *Dermatobia*, após um dia em *Calliphora* e após 13 horas em *Drosophila*.

A correlação do desenvolvimento nessas moscas pode ser feita entre o ovário de uma pupa de *Dermatobia* no oitavo dia após a pupação com o de *Calliphora* no segundo dia após pupação (Leloup, 1974) e com o de *Drosophila* após 24 horas de pupação (King, 1970). Para *Hipoderma* (Boulard, 1967) tal desenvolvimento é encontrado no meio do 3º instar da larva.

Nessa idade é observada picnose das células mais apicais da zona proximal que vão desaparecer, e picnose das células na região que limita a porção basal dos ovaríolos em formação; essas células somáticas tendem a desaparecer para permitir o aparecimento da cavidade do cálice. Os ovaríolos estão em franca formação pelo arranjo das células da região central do ovário (Fig. 9). É nesse período que disparam grande número de mitoses em toda a gônada, proporcionando seu notável crescimento. Em seguida, o ovário adquire sua forma definitiva, com a individualização dos ovaríolos e suas zonas já descritas, sendo que o que mais chama a atenção é o aparecimento entre eles das massas cromófilas. Essas granulações vêm sendo discutidas por alguns autores. Assim Geigy (1931) e Aboim (1945) referem a existência, no ovário de *Drosophila melanogaster*, de "algumas gotas de albumina idênticas àquelas que se encontram nas células do corpo gorduroso". De fato, também tivemos essa impressão examinando nosso material (veja Figs. 15 e 19) e a mesma observação é feita por Leloup (1970) em *Calliphora*.

Nesse momento, isto é, a partir do décimo dia de pupa, em diante, é acelerado o fenômeno da metamorfose, pois as células do corpo gorduroso se soltam do tecido, que formava uma rede, e facilmente se desmancham; o tubo digestivo torna-se fino e amolecido. Massas cromófilas também aparecem nesse corpo gorduroso. Seriam então essas massas fragmentos de células gordurosas?

Entretanto observando a evolução dessas massas ou esférulas, verifica-se que elas vão aparecendo também na região do ovário onde se formarão o cálice e à medida que elas vão aumentando em número, as células das respectivas regiões vão desaparecendo. Por outro lado observando-se melhor pode-se perceber que essas esférulas são contidas em uma membrana e no seu interior existe um "núcleo" que é irregular, de tamanho variado e muitas vezes parece estar fragmentado. Podemos supor que essas massas ou glóbulos, representam fagócitos cujos tamanho e aspecto dependerão da quantidade de material fagocitado e do estado de digestão.

Vejamos o que diz a literatura a respeito da origem dos fagócitos.

Em 1910, Perez descreveu em *Calliphora erythrocephala* a existência de fagócitos leucocitários, desempenhando papel importante na metamorfose. Nas primeiras horas da metamorfose eles atacam alguns músculos, e em seguida englobam seus fragmentos; como conseqüência os fagócitos se transformam em "esférulas de grânulos", termo este que Perez diz ter traduzido literalmente de uma citação de Weismann (1864). Essas "esférulas de grânulos", se infiltram em seguida, por movimento amebóide para dentro dos mais variados órgãos. Perez ainda conclui que, no momento em que elas penetram em órgãos imaginiais (hipoderme em particular, músculos, papilas retais, bainhas do ovo, dobras do papo ou do intestino posterior), sua função é a de trazer substâncias nutritivas aos tecidos em proliferação; ao contrário, no momento em que a infiltração ocorre em órgãos larvais (glândulas salivares, traquéias, etc.), as esferas provocam sua separação seguida de fagocitose.

Segundo Leloup (1974), as "esférulas de grânulos" nos ovários da *Calliphora* têm um papel trófico, porém ele não exclui a possibilidade de uma intervenção fagocitária.

King (1970) descreveu em pupa de *Drosophila* de 36 horas (correspondente mais ou menos ao décimo primeiro dia de *Dermatobia*) a existência de células amebóides, fagocitárias, no espaço entre o ovaríolo e a bainha epitelial e chamou-as de "células do lúmen". Além dessas, outros fagócitos maiores aparecem na cavidade extraovariolar por volta da 39ª hora de pupa.

Em *Dermatobia*, observamos que as esférulas de grânulos começam a aparecer por volta do décimo primeiro dia de pupação, quando os ovários estão se juntando aos condutos genitais excretores, dado esse que coincide, com as observações de Leloup (1974) para *Calliphora*, e de King (1970) para *Drosophila*, aumentam em número durante o desenvolvimento e desaparecem por volta do vigésimo quinto dia, quando tem início a vitelogênese. Portanto a impressão que tivemos é de que tomam parte ativa na "construção"

da gônada definitiva. Dessa maneira nosso ponto de vista sobre elas é um pouco diferente do de Leloup (1974). Cremos que elas desempenham principalmente papel fagocitário e ocasionalmente trófico.

Depois do estabelecimento dos ovaríolos o evento mais importante é seu próprio desenvolvimento.

De uma maneira bem sumária, o que acontece em *Drosophila*, observada ao M.E. segundo King (1970) é o seguinte:

1º) No final da pré-pupa e início da pupa (que ocorre 24 horas após o início da pupação) as ovogônias encontram-se na porção superior dos ovaríolos. Elas se dividem até que, uma das células filhas continua se comportando como a célula mãe enquanto a outra se diferencia no cistoblasto; este, através de quatro citocineses incompletas, forma um aglomerado de dezesseis células intercomunicantes denominadas cistocistos. Essa porção apical do ovaríolo é denominada germário e por volta da 36ª hora de pupa, das dezesseis células existentes, duas denominadas pró-oócitos são distinguidas das outras catorze pela morfologia nuclear; elas apresentam complexo sinaptonêmico. O germário é envolto por uma bainha de células epiteliais. Por volta da 39ª hora (pouco mais de um terço do período pupal) "brota" o primeiro folículo, representado pelas dezesseis células interconectadas, envoltas por uma camada de células baixas, foliculares; nesse folículo apenas uma célula continua como pró-oócito. Ao completar as 48 horas todo o ovaríolo contém o cisto germarial e dois folículos. Nas 48 horas seguintes (última metade do período pupal) outros folículos são produzidos de modo que ao nascer a mosca, cada ovaríolo tem ao redor de três a seis folículos, todos em fase de pré-vitelogênese.

2º) A vitelogênese inicia-se no primeiro e se completa no segundo dia de adulto.

Em *Calliphora* (cujo período pupal é de dez dias), Leloup (1974) diz que a formação do germário começa ao redor do quarto dia de pupa (pouco mais de um terço do período pupal) em uma descrição semelhante a de King (1970) para *Drosophila*. No sexto dia refere que tem início a ovogênese, com as divisões das ovogônias até a produção das dezesseis células que constituirão o folículo. Refere ainda ter encontrado em pupa de oito dias, entre as dezesseis células de um folículo junto ao pedicelo, duas com características pré-meióticas, também descritas por Naville (1932). Essas afirmações entretanto não são ilustradas em seu trabalho. Quanto aos limites celulares entre os elementos de um mesmo folículo, Leloup diz que não consegue distingui-los porém não confirma e nem nega a existência das pontes celulares. A organização completa do folículo em *Calliphora* ocorre um pouco antes do nascimento da imago e a vitelogênese também como em *Drosophila* ocorre na fase adulta (Naville, 1932; Leloup, 1974).

Em *Hipoderma*, a partir do meio do 3º instar larval pode-se distinguir no ápice de cada ovaríolo, um germário onde se esboçam os folículos. Ao final do 3º instar o ovário já apresenta as características de um ovário meroístico bem diferenciado, com uma centena de ovaríolos, cada um com oito a dez folículos separados uns dos outros por um conjunto de células interfoliculares de origem mesodérmica. As ovogônias, que no início da formação dos ovaríolos conseguiram localizar-se sob o filamento terminal constituirão as células mães dos futuros ovócitos. Em seguida cada ovogônia tendo sofrido três divisões sucessivas origina oito pequenas células filhas idênticas à original. Envoltas por algumas células parietais constituem pequenos folículos dentro de um germário. No fim do 3º instar larval todos os folículos estão no mesmo estágio evolutivo. Cada um apresenta sete trofócitos e um ovócito, este sempre em posição basal. Os trofócitos são mais volumosos, núcleo rico em cromatina e citoplasma abundante em RNA. O ovócito é muito menor, com núcleo opticamente vazio. Não há traço de nucléolo nem da rede cromatínica. O citoplasma é pobre em RNA. Durante a pupação conclui a evolução dos folículos, ocorrendo a vitelogênese e a maturação dos ovócitos. No meio desse período as células foliculares e interfoliculares secretam o córion e o pedúnculo do ovo. Assim, desde o primeiro dia de imago a fêmea está apta à postura (Boulard, 1967).

Em *Dermatobia*, observamos que o germário começa a se desenvolver a partir do décimo dia de pupação; os folículos a partir do décimo sétimo, quando um conjunto de células de núcleos grandes e claros vão sendo separados por feixes de células menores. Algumas dessas células vão se tornando cúbicas e envolvem as células de núcleos grandes, transformando-se nas células foliculares. A partir do vigésimo terceiro dia contamos dentro dos folículos cerca de oito células, sendo uma menor, geralmente na porção inferior do folículo e outras sete com núcleos em politenização, sendo que desses, os dois mais próximos à célula inferior são maiores que os demais. Os citoplasmas dessas células são fortemente basófilos e se coram intensamente pela pironina demonstrando que possuem grande quantidade de RNA.

Confrontando nossas observações em *Dermatobia*, quanto à característica dos folículos, com os demais autores, percebe-se que são concordantes com Boulard (1967), que descreve o desenvolvimento em *Hipoderma*, mas são discordantes de King (1970) e Leloup (1974) que descrevem o desenvolvimento em *Drosophila* e *Calliphora* respectivamente. Acreditamos que o trabalho de King seja bastante cuidadoso e de todos nós o mais completo, pois utilizou inclusive a microscopia eletrônica. Podemos até aqui afirmar que cada folículo apresenta sete trofócitos e um ovócito, resultado de três divisões sucessivas e diferenciação a partir de uma oogônia. Nada impede que em trabalho posterior, utilizando a microscopia eletrônica e aperfeiçoando a técnica, reformulemos nossas observações.

Também no que diz respeito à vitelogênese, vê-se que enquanto ela se inicia após o nascimento em *Drosophila* e *Calliphora*, em *Hipoderma*, o fenômeno ocorre desde o início da pupação, e em *Dermatobia*, nos últimos dias de pupa.

**Desenvolvimento dos testículos:** a evolução morfológica dessa gônada acontece de maneira bem mais simples que a dos ovários. Cada testículo possui apenas uma loja cheia de cistos espermatogoniais.

Nos primeiros dias após a pupação ou seja, no período de pré-pupa, eles são levemente maiores que os ovários demonstrando seu desenvolvimento precoce. Por volta do sétimo dia essa diferença ainda persiste. A partir do oitavo dia o ovário acelera seu crescimento e por volta do décimo dia o tamanho das gônadas se iguala. Desse período até o final da pupação o ovário cresce fantasticamente enquanto o testículo o faz lentamente, chegando ao momento do nascimento da imago com as dimensões semelhantes às que apresentava por volta do vigésimo dia de pupa; nesse período, o ovário triplica seu tamanho.

O desenvolvimento precoce do testículo observado em *Dermatobia* é mais acentuado em *Drosophila* (Cooper, 1950), *Calliphora* (Leloup, 1974) e *Hipoderma* (Boulard, 1967).

A espermatogênese em *Dermatobia* também é precoce quando comparada à ovogênese. Assim no quinto dia de pupa existem dois tipos de células goniais, as espermatogônias e os espermatócitos. Por volta do sétimo dia é grande o número de espermatócitos. Embora o desenvolvimento não seja idêntico nos diferentes espécimes estudados verificamos que a meiose deve-se iniciar a partir do sétimo dia de pupa prosseguindo gradativamente, chegando ao máximo por volta do décimo quarto dia.

Em pupas de vinte dias já existem espermatozóides, o que faz supor que a espermiogênese deve ter começado pouco antes desse período. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Leloup (1974) para *Calliphora* e Boulard (1967) para *Hipoderma*, nas quais a espermatogênese tem início nos primeiros dias de pupa, para chegar ao máximo na metade do período pupal, época em que se inicia a espermiogênese.

## SUMMARY

Gonadal development of *Dermatobia hominis* during pupal period is described. Pupae developing from larvae weighing above 650 mg turned into female flies whereas the ones from larvae weighing between 500 and 600 mg turned into males (with plus or minus 5% of error). Up to the 8th day of pupation the testes are larger than the ovaries; from that time on they decrease their speed of development and stop growing between the 20th and 25th day. The spermatogenesis starts around the 7th day when there are numerous spermatocytes. On the 10th day, the majority of testes show many spermatides; spermatozoides appear around the 20th day. The spermiogenesis continues up to the end of the pupal phase, when the whole testes is packed with spermatozoides. Males begin to emerge two days before females. Ovarioles are formed around the 8th day; on the 20th day follicles are individualized surrounded by follicular cells and containing nurse cells with polytene nuclei and basophilic cytoplasm plus the smaller single ovocyte with acidophilic cytoplasm and loose nucleus. The vitelogenesis starts around the 25th day, and is complete at the time of the emergence of the imago. Connection of gonads with their somatic structures is accomplished around the 13th day of pupation.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOIM, A.N., 1945. Développement embryonnaire et post-embryonnaire des gonades normales et agamétiques de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Suisse Zool.*, 52 (3) :53-154.
- BANEGAS, A.D.; MOURIER, H. & GRAHAM, O.H., 1967. Laboratory colonization of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). *An. Entomol. Soc. Amer.*, 60 (3) :511-514.
- BOULARD, C.H., 1967. Étude du développement post-embryonnaire des gonades d'*Hipoderma* (Diptera: Oestridae). Thèse du Doctorat 3ème cycle, l'Université de Paris.
- COOPER, K.W., 1950. Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In Demerec, M. ed. "Biology of *Drosophila*": 1-61, New York.
- GEIGY, R., 1931. Action de l'ultra-violet sur le pôle germinal dans l'oeuf de *Drosophila melanogaster* (castration et mutabilité). *Rev. Suisse Zool.*, 38 (10) :187-288.
- KING, R.G., 1970. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, 227 pp.
- LELLO, E.; TOLEDO, L.A. & GREGÓRIO, E.A., 1984. Diferenciação morfológica das gônadas em larvas de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 (2) :211-219.
- LELOUP, A.M., 1974. Morphogênese des gonades chez *Calliphora erythrocephala*. Étude descriptive. *La Cellule*, 70 (1) :52-93.
- NAVILLE, A., 1932. Les bases cytologiques de la théorie du "crossing-over". Étude sur la spermatogénèse et l'ovogénèse des Calliphorinac. *Zeitschr. F. Zellforsch.*, 16 :440-470.
- PEREZ, C., 1910. Recherches histologiques sur la metamorphose des muscides, *Calliphora erythrocephala*. *Arch. Zool. Exp. et Gen.*, 5 :1-274.
- WEISMANN, 1864. In Perez, 1910 – citação textual apenas.