

CLASSIFICAÇÃO DE FÊMEAS DE *STOMOXYS CALCITRANS* (L.) (DIPTERA: MUSCIDAE), DE ACORDO COM A IDADE FISIOLÓGICA

RAYMUNDO NONATO MORAES BENIGNO, MARIA LUIZA MAUÉS GARCIA *
& RUBENS PINTO DE MELLO **

Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 66000 Belém, PA, Brasil

*Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal Fluminense, 24220 Niterói, RJ, Brasil

**Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851 Itaguaí, RJ, Brasil

Classification of female of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae), according to the physiological age – *With the purpose of making easier the determination of the physiological age of *Stomoxys calcitrans* population, a classification based on the oocitary development and number of ovipositions was proposed. Female were reared under laboratory conditions, in individual cages and maintained in the presence of male for copulation. On the proper time, ovary and oviduct were removed and the stage of development was observed. Adult female were classified as: 1 – New emerged female, 2 – Young nuliparous female, 3 – Old nuliparous female, 4 – Uniparous female, 5 – Two or three ovipositions times female, and 6 – Multiparous female.*

Key words: classification – physiological age – oocitary development – *Stomoxys calcitrans*

A possibilidade de determinar a idade fisiológica de fêmeas de *Stomoxys calcitrans*, com base no número de resíduos foliculares (corpo amarelo) localizados nos ovários de fêmeas ovipositantes foi levantada por Kuzina (1942). Estas estruturas, segundo Detinova (1962), são formadas pela agregação de remanescentes dos trofócitos e células epiteliais em degeneração proveniente da câmara folicular do ovo. Estes resíduos, a cada oviposição, acumulam-se nos pedicelos terminais dos ovaríolos, adquirindo coloração mais intensa.

O objetivo deste estudo é verificar a variação na intensidade e localização dos resíduos foliculares de acordo com o número de posturas efetuadas, sob controle, possibilitando a classificação de fêmeas de *S. calcitrans* em classes de maneira que possa ser aplicada com facilidade às fêmeas capturadas no campo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os insetos utilizados eram provenientes da colônia mantida no laboratório de Entomologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em estufa climatizada à temperatura de 27°C e umidade relativa de 70-80% e luz fluo-

rescente permanente. Diariamente os adultos, machos e fêmeas, eram alimentados com sangue de bovino citratado (0,38% citrato de sódio) embebido em gaze contida em placa de Petri. No quarto dia após a emergência, ocasião em que ainda não havia ocorrido a oviposição, 12 casais eram separados e transferidos para gaiolas confeccionadas de caixas plásticas com capacidade para um litro, sendo uma para cada casal, permanecendo sob as mesmas condições da colônia de origem. Diariamente, por ocasião da troca de alimento, era verificada a existência de postura, que as fêmeas efetuavam na mesma gaze que servia de suporte para o alimento.

As fêmeas que atingiam o número de postura pré-estabelecido, eram anestesiadas com clorofórmio e, com auxílio de alfinetes entomológicos, fixadas em placa de Petri adrede preparada com parafina sólida, onde eram dissecadas em microscópio estereoscópio. Uma pequena incisão na região mediana do primeiro e segundo esternito abdominais era feita com um microbisturi; em seguida completava-se a abertura com o auxílio de duas pinças entomológicas, tendo havido sempre o cuidado de colocar gotas do líquido de Pampel (Formalina – 6 partes; ácido acético glacial – 4 partes; etanol à 95% – 15 partes e água – 30 partes), para evitar o ressecamento das estruturas internas. Em seguida retiravam-se os ovários e ovidutos, que eram colocados sobre lâmina com gota de

líquido de Pampel. Parte dos ovariolos era colocada entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio para que fosse verificado o aspecto do resíduo e do saco folicular.

Para a determinação do número de posturas, foi considerado o intervalo entre oviposições igual ou superior à 24 horas.

RESULTADOS

O desenvolvimento oocitário acompanhando toda a oogênese, foi dividido arbitrariamente em seis estágios por Scholl (1980), caracterizado, como pode ser observado na figura, da seguinte forma:

Estágio 0 – Na fase inicial deste estágio (0i) o folículo não se encontra separado do germário (GE) e o epitélio folicular (EF) não está completamente diferenciado. Na fase final do oócito, começa a se organizar e contrair, adquirindo a forma de oito (Of).

Estágio 1 – Inicialmente o folículo está totalmente separado do germário; apresenta forma esférica e epitélio claramente diferenciado (1i). No final do estágio, o folículo se encontra distintamente separado do germário, tem uma forma ovalada e o núcleo do oócito (NO) difere do núcleo das células nutritivas (NCN), pelo tamanho reduzido e coloração mais escura (1f).

Estágio 2 – Na fase inicial deste estágio (2i) começa haver deposição de grânulos de gema (DG) no citoplasma do oócito (início da oogenia); na fase inicial (2f) este depósito ocupa aproximadamente 25% do volume folicular.

Estágio 3 – O núcleo do oócito é coberto pela gema, que ocupa 25% (3i) à 75% (3f) do volume folicular. Durante este estágio desaparece o epitélio sobre as células nutritivas e o folículo se torna alongado.

Estágio 4 – As células nutritivas ocupam mais de 25%; oócito atingindo quase o tamanho máximo, bastante frágil, rompendo-se facilmente durante a dissecação.

Estágio 5 – O cório endurecido, com o oócito completamente formado, caracterizado pela presença de fenda de eclosão (FE). Remanescentes das células nutritivas (RCN), localizados

anteriormente ao oócito formando grumos amarelos, nitidamente separados do oócito.

Com base nesta divisão e nas alterações morfo-fisiológicas surgidas no decorrer do desenvolvimento dos adultos, procurou-se estabelecer a classificação das fêmeas de *S. calcitrans*, como se segue:

1. *Fêmeas não ovipositantes* – As fêmeas que ainda não iniciaram a postura foram separadas em:

1.1 – Recém emergidas – Os ovários envolvidos por uma rede de traqueias difusas; folículo primário no estágio 0.

1.2 – Não ovipositantes inicial – Folículo primário nos estágios 1 e 2.

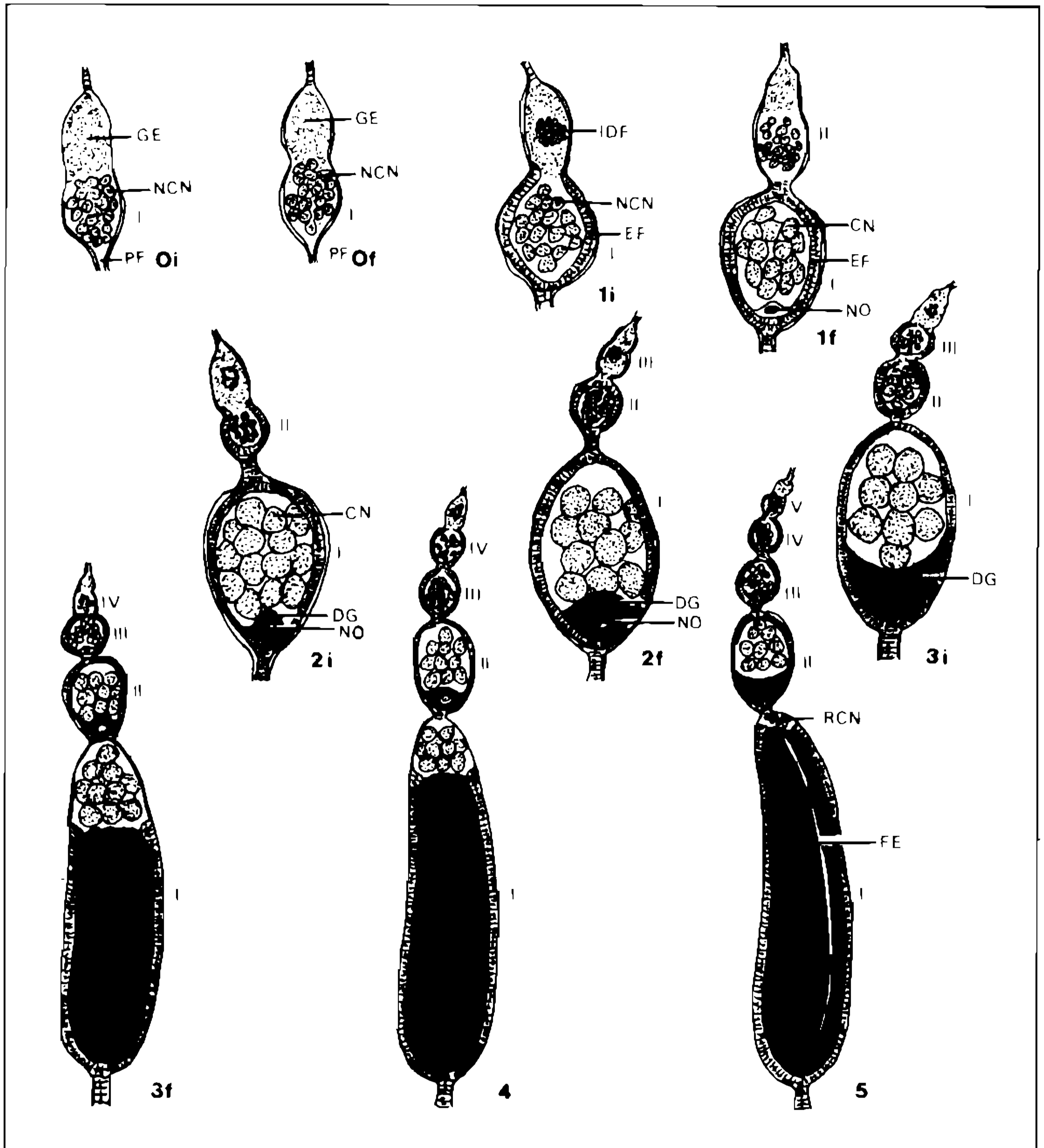
1.3 – Não ovipositantes final – Folículo primário nos estágios 3, 4 e 5.

2. *Fêmeas ovipositantes* – As fêmeas que já iniciaram a postura foram separadas em:

2.1 – Fêmeas que realizaram uma postura – Foi verificado, com auxílio do estereomicroscópio, que em ovário de fêmeas que haviam ovipositado uma vez, não era observado resíduo folicular perceptível, qualquer que fosse o estágio de desenvolvimento do oócito primário. No entanto o saco folicular, que é indicativo de oviposição recente, era facilmente reconhecido, desde que o oócito primário não tivesse ultrapassado o estágio 3 de desenvolvimento.

As preparações examinadas ao microscópio óptico permitiram a visualização de uma estrutura formada de pequenos grumos, geralmente de cor amarela brilhante, localizada logo abaixo do oócito primário. Essa estrutura foi identificada como o resíduo folicular; em alguns casos houve certo grau de dificuldade em localizá-lo na sua individualidade, em consequência, principalmente, do oócito primário já ter atingido a fase final de maturação. No final do saco folicular não foi constatada a presença de qualquer vestígio de estrutura de resíduo folicular.

2.2 – Fêmeas que realizaram duas posturas – Foi observado utilizando o estereomicroscópio que os ovários apresentavam resíduo folicular pouco nítido, independente do estágio de desenvolvimento do oócito primário.



Estágios 0, 1, 2, 3, 4 e 5 de desenvolvimento folicular de ovaríolo de fêmea de *Stomoxys calcitrans* (L.). GE - germário; NCN - núcleo das células nutritivas; PF - pedículo folicular; IDF - início de desenvolvimento folicular; EF - epitélio folicular; CN - células nutritivas; NO - núcleo do oócito; DG - depósito da gema; RCN - remanescente das células nutritivas; FE - fenda de eclosão; i - fase inicial do estágio de desenvolvimento folicular; f - fase final do estágio de desenvolvimento folicular; I, II, III, IV e V - folículos em seqüência de desenvolvimento.

Com auxílio do microscópio óptico, o exame de preparações do folículo ovariano, permitiu detectar o resíduo folicular abaixo do oócito em desenvolvimento e outro resíduo no final do saco folicular; quando não havia saco folicular o resíduo era encontrado somente abaixo do oócito. O volume do resíduo folicular localizado no final do saco folicular era tão pe-

queno, que algumas vezes foi necessário a utilização de aumento de 40x para constatar sua presença.

2.3 - Fêmeas que realizaram três posturas - O aspecto estereomicroscópico dos ovários de fêmeas que realizaram três posturas era semelhante ao de fêmeas que haviam ovipositado

duas vezes, tendo havido porém, um pequeno aumento do volume do resíduo folicular localizado no final do saco folicular.

2.4 – Fêmeas que realizaram quatro posturas – Estas apresentam o mesmo aspecto das que realizaram duas ou três posturas, tendo sido observado porém, presença de resíduos foliculares bastante diferenciados, que se situavam abaixo do oócito primário em desenvolvimento e no final do saco folicular.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Anderson (1964), verificou em *Musca domestica* que o grupo de fêmeas com uma postura era difícil identificar se havia ovipositado, devido à pequena quantidade de resíduo folicular presente na base do oócito. Em *S. calcitrans* esta dificuldade também foi encontrada por Scholl (1980) que observou presença de resíduos foliculares apenas em ovários corados por vermelho neutro. No presente trabalho, quando eram encontradas fêmeas nestas condições, teve-se o cuidado de examinar maior número de ovariolos, tendo sido, também, feita a associação com a presença de restos de células do epitélio folicular, proveniente do ovo eliminado.

Com as fêmeas que realizaram duas ou três posturas foi verificado ser difícil separá-las dada a semelhança no aspecto dos ovários, bem como o volume do resíduo folicular localizado no final do saco folicular, reduzidos em ambas. Deste modo tornou-se difícil estabelecer uma característica que fosse possível de ser aplicada às fêmeas capturadas no campo.

O ovário das fêmeas que realizaram quatro posturas apresentaram resíduo folicular nítido, o que não está em concordância com os resultados de Charlwood & Lopes (1980) que ao proporem a classificação etária para fêmeas de *S. calcitrans*, utilizaram como caráter principal de identificação da classe-idade de fêmeas ovipositantes jovens, o de resíduo folicular discreto, onde estão incluídas fêmeas com até quatro posturas.

Nos trabalhos existentes na literatura sobre a classificação etária de fêmeas de *S. calcitrans*, os de Kuzina (1950), Scholl (1980) e Sutherland (1980) distinguiram isoladamente apenas as fêmeas “uniparous” dentre as que haviam ovipositado. O primeiro considerou a cor e localização do resíduo folicular; o segundo o

aspecto dos ovários corados e não corados e o terceiro somente a localização dos resíduos foliculares. No presente trabalho, além do aspecto, cor e localização do resíduo folicular, considerou-se também, o aspecto do saco folicular.

Nas fêmeas após a segunda postura, o resíduo folicular da primeira postura, que estava localizado abaixo do ovo recentemente eliminado, passa a se localizar no final do saco folicular e, abaixo do oócito em desenvolvimento, forma-se novo resíduo. Esta observação já havia sido feita por Kuzina (1942) e Lineva (1953), tendo o primeiro na ocasião, levantado a hipótese destas estruturas se acumularem nas oviposições subseqüentes.

Alguns autores conseguiram distinguir ciclos gonadotróficos em dípteros ciclorrafos criados em laboratório, como Miller & Treece (1968) e Vogt et al. (1974) que distinguiram fêmeas com uma, duas e três posturas de *Musca autumnalis* e *Lucilia cuprina*, respectivamente; Tyndale-Biscoe & Hughes (1968), Thomas (1972) e Kuramochi & Nishijima (1984), fêmeas com uma e duas posturas de *Musca vetustissima*, tabanídeos e *Haematobia irritans*, respectivamente. Já outros autores como Schmidt (1972) e Charlwood & Lopes (1980) preferiram agrupar as fêmeas de *H. irritans* e *S. calcitrans*, respectivamente, em classes-idade.

Em razão dos resultados apresentados, as fêmeas de *S. calcitrans* podem ser agrupadas nas seguintes classes-idade:

1 – Fêmeas recém emergidas – ovários envolvidos por uma rede difusa de traqueias; folículo primário no estágio 0.

2 – Fêmeas não ovipositante inicial – folículo primário nos estágios 1 e 2.

3 – Fêmeas não ovipositante final – folículo primário nos estágios 3, 4 e 5.

4 – Fêmeas com uma postura – resíduo folicular imperceptível, mas com presença de saco folicular (indicando oviposição recente); quando diferenciado microscopicamente, o resíduo folicular está localizado logo abaixo do oócito em desenvolvimento e geralmente é de cor amarela brilhante e final do saco folicular sem qualquer vestígio de resíduo folicular; pedicelo ovaríolar com células remanescentes do epitélio folicular do ovo.

5 – Fêmeas com 2 a 3 posturas – resíduo folicular pouco nítido. Quando o saco folicular está presente, existe resíduo abaixo do folículo em desenvolvimento e no final do saco folicular. Na ausência do saco folicular, os resíduos estão localizados abaixo do oócito.

6 – Fêmeas com mais de 3 posturas – da quarta postura em diante o resíduo se torna nítido, localizado à semelhança do descrito para a classe anterior; nas fêmeas ovipositantes final também podem ser encontrados resíduos foliculares no oviduto lateral e comum.

As fêmeas ovipositantes foram separadas das não ovipositantes pela presença de resíduo folicular e de saco folicular.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. R., 1964. Method for distinguishing nulliparous from parous flies and for estimating the ages of *Fannia canicularis* and some other Cycloraphous diptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 57: 226-236.
- CHARLWOOD, J. D. & LOPES, J., 1980. The age-structure and biting behaviour of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) from Manaus, Brazil. *Bull. Entomol. Res.*, 70: 549-555.
- DETINOVA, T. S., 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monograph Ser. WHO*, 47, 216 pp.
- KURAMOCHI, K. & NISHIJIMA, Y., 1984. Studies on the reproductive biology of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). I. The ovarian development of the flies collected from the field. *Appl. Ento. Zool.*, 19: 331-3340.
- KUZINA, O. S., 1942. On the gonadotrophic relationships in horse-flies (*Stomoxys calcitrans* and *Haematobia stimulans*). *Med. Parazitol.*, 11: 70-78.
- KUZINA, O. S., 1950. Comparative parasitological and ecological observations on horse-flies (*Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, and *Lyperosia irritans*) p. 139-165. In *Ectoparasites: Fauna, Biology and Pratical Importance*. Moscow Publishing House of the Moscow Society of Naturalists, 2ª ed.
- MILLER, T. A. & TREECE, R. E., 1968. Gonadotrophic cycles in the face fly, *Musca autumnalis*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 61: 690-696.
- SCHMITD, C. D., 1972. Classification of the physiological development of laboratory-reared female horn flies, *Haematobia irritans*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 65: 695-701.
- SCHOLL, P. J., 1980. A technique for physiologically age-grading female stable flies, *Stomoxys calcitrans* (L.). *Nebr. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.*, 298: 28 p.
- SUTHERLAND, B., 1980. Physiological age determination in female *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (Diptera: Muscidae). *Onderst. J. Vet. Res.*, 47: 83-88.
- THOMAS, A. W., 1972. Physiological age structure of adult Tabanid populations (Diptera: Tabanidae) in Alberta, Canadá. *J. med. Ent.*, 9: 295-300.
- TYNDALE-BISCOE, M. & HUGHES, R. D., 1968. Changes in the female reproductive system as age indicators in the bushfly *Musca vetustissima* Walker. *Bull. Entomol. Res.*, 59: 129-141.
- VOGT, W. G., WOODBURN, T. L. & TYNDALE-BISCOE, M., 1974. A method of age determination in *Lucilia cuprina* (Wied.) (Diptera, Calliphoridae) using cyclic changes in the female reproductive system. *Bull. Entomol. Res.*, 64: 365-370.