
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE ZOOLOGIA (DOUTORADO)

Guilherme Gomes

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (F.) (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE): METABOLISMO ENERGÉTICO, TERMORREGULAÇÃO E
NEUROFISIOLOGIA.



Rio Claro-SP
2012

Guilherme Gomes

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (F.) (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE): METABOLISMO ENERGÉTICO, TERMORREGULAÇÃO E
NEUROFISIOLOGIA.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Área de Concentração - Zoologia).

Orientador: Claudio José Von Zuben

Rio Claro-SP
2012

595.701 Gomes, Guilherme
G633a Aspectos fisiológicos de *Chrysomya megacephala* (F.)
(Diptera: Calliphoridae): metabolismo energético,
termorregulação e neurofisiologia / Guilherme Gomes. - Rio
Claro : [s.n.], 2012
167 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Claudio José Von Zuben

1. Inseto - Fisiologia. 2. Neurociência. 3. Entomologia
forense. 4. Mosca-varejeira. 5. Drogas. 6. Fotoperíodo. I.
Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico a minha família.....

AGRADECIMENTOS

O principal agradecimento que gostaria de fazer, é na verdade fruto do acaso, ou talvez não, mas como disse *Carl Sagan*, diante da vastidão do espaço e da intensidade do tempo é um imenso prazer partilhar este planeta e esta época com todos vocês. Além disto, o mais bonito da vida é poder aprender e sempre inovar, pois *cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, isto porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso* (Charles Chaplin).

Desta forma inicio os agradecimentos a pessoa que confiou no meu trabalho e abriu as portas para explorar um novo mundo de metodologias e conceitos, ou seja, mantendo uma de minhas metas acesa, a de sempre estar aprendendo. Assim, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben, o qual confiou e aceitou o desafio. Agradeço pela paciência, confiança, conselhos e amizade. Agradeço aos pesquisadores colegas de laboratório, pelas conversas, diversões e discussões (Adriana, Cris, Débora, Fernando, Fernanda, Guima, Gustavo, Jussara, Larissa, Leo, Manuel, Marina, Matheus, Thiago, Rafael, Richard, Rodrigo, e tantos outros presentes no Jacarezário da UNESP).

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado, e pelos equipamentos obtidos através do processo 98/09939-6, modalidade Jovem Pesquisador (JP) do Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben.

Agradeço também as minhas quatro turmas de alunos das disciplinas de Fisiologia Animal e Fisiologia Humana da UNESP, que estiveram acompanhando desde o ano de 2009 até o presente semestre o desenvolvimento da minha tese. Peço desculpas pela falta de tempo para maiores auxílios, mas agradeço imensamente pelo aprendizado que tive com todos vocês nestes três anos e meio de contato.

Agradeço enormemente ao pessoal do Instituto de Física da USP de São Carlos (IFSC-USP), por toda a ajuda e desenvolvimento dos experimentos. Principalmente ao Prof. Dr. Roland Köberle, pela disposição, pela permissão da utilização dos equipamentos, pelas conversas, idéias, conselhos e ajuda na análise dos dados, muito obrigado! Não poderia esquecer e agradecer aos técnicos Lírio e Ivanilda, a toda paciência e dedicação de ambos. A Ivanilda pela várias horas de montagem, tentativas de aquisição dos dados, conversas e risadas no ambiente de trabalho, o que tornou o ambiente extremamente agradável. Ao Lírio pelas conversas, idéias e risadas que demos juntos. Muito obrigado a todos que estiveram presentes nas minhas visitas ao DipteraLab, não poderia de deixar de agradecer também, ao Prof. Dr. Jan Frans Willem Slaets e ao Prof. Dr. Reynaldo Daniel Pinto, pelas conversas idéias e diferentes projetos realizados.

Queria agradecer também aos professores de fisiologia da UNESP de Rio Claro, Prof. Dr. Augusto Shinya Abe, Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto e ao Prof. Dr. Denis Otávio Vieira de Andrade. Ao Prof. Dr. Augusto Shinya Abe pelas conversas durante o desenvolvimento do trabalho, e durante os poucos intervalos de diversão, porém inesquecíveis nos churracos. Ao Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto pelas discussões de dados metabólicos, discussões estas extremamente úteis e construtivas na análise de meus dados, além da companhia durante as aulas nestes anos durante a divisão das disciplinas, aprendi muito com sua proximidade. Ao Prof. Dr. Denis Otávio Vieira de Andrade por toda ajuda em diversos pontos da minha tese, pelas dicas na metodologia e conversas durante a discussão de dados, além do empréstimo do espaço e equipamentos para que fosse possível a realização dos testes das hipóteses, não posso de deixar de agradecer também a proximidade durante as aulas que dividimos o conteúdo. Denis, muito obrigado!

Agradeço à todos os professores do departamento de Zoologia da UNESP, pelas conversas no corredor, no café ou na secretaria. Aos funcionários do Departamento de Zoologia (Adriana, Cristina, Fernando e Jaime) e do Jacarezário (Carlos e Joniel), pelo auxílio na minha pesquisa, sem os quais os trabalhos e as aulas seriam bem mais complicados.

Vela lembrar que *o valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis* (Fernando Pessoa). Assim, agradeço à todos amigos pela agradável convivência e ajuda neste momento da minha vida, alguns mais próximos, e mesmo aos distantes, os quais sinto muita saudade. Ao Ivan e Sunao, um agradecimento especial durante estes anos, pelas conversas, risadas, dificuldades e vitórias conquistadas. Além das idéias e projetos realizados e outros que futuramente iremos realizar.

Um agradecimento todo especial a Lye Otani, pela pessoa que é, pela ajuda e compreensão em diversos momentos em todos estes anos de convívio, mesmo que na maioria das vezes a distância. Linda, muito obrigado!

Por último, mas a quem eu realmente dedico e agradeço pela minha vida, minha família - aos meus irmãos Biel (Gabriel) e Leo (Leonardo), e à MEUS PAIS (Antonio e Ivete) que sem dúvida nenhuma me deram e me ensinaram que o maior legado e tesouro de uma pessoa é o estudo, ou seja, a educação. A minha cunhada Iracema e minha afilhada lindinha Laís, por tudo que passamos, conversas e diversão. Ao meu irmão Leonardo gostaria de deixar uma dedicação especial, por tudo que ocorreu e passamos, o qual é amigo de pesquisa, uma pessoa admirável e excelente pesquisador. Agradeço também pelos conselhos, desenvolvimento e eterna proximidade.

A vida é maravilhosa e "*Viver é desenhar sem borracha.*" (Millor Fernandes). Nunca desista dos sonhos e sonhe alto, "*Não se espante com a altura do vôo. Quanto mais alto, mais longe do perigo. Quanto mais você se eleva, mais tempo há de reconhecer uma pane. É quando se está próximo do solo que se deve desconfiar*" (Santos Dumont).

Each fine print that cause, gained an enemy. To be popular is indispensable to be mediocre. Oscar Wilde

Assim.... Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana. Carl Jung

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E METODOLOGIA GERAL	
Resumo	4
Introdução geral	5
Objetivo	14
Material e Métodos	16
Referências Bibliográficas	28
 CAPÍTULO 2: ESTUDO DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>CHRYSOMYA MEGACEPHALA</i> (F.) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) NAS DIFERENTES FASES DE SEU CICLO DE VIDA E SOBRE INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS (FOTOPERÍODO E DROGAS)	
Resumo	38
Introdução	38
Material e Método	41
Resultados e Discussão	47
Conclusões	64
Referências Bibliográficas	65
 CAPÍTULO 3: PERFIL DA TEMPERATURA CORPÓREA E TERMORREGULAÇÃO DE <i>CHRYSOMYA MEGACEPHALA</i> (F.) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE).	
Resumo	74
Introdução	75
Material e Método	80
Resultados e Discussão	85
Conclusões	105
Referências Bibliográficas	106
 CAPÍTULO 4: NEUROFISIOLOGIA DO SISTEMA VISUAL DE <i>CHRYSOMYA MEGACEPHALA</i> (F.) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E SUSBTÂNCIAS QUÍMICAS NA RESPOSTA DO NEURÔNIO H1	
Resumo	113
Introdução	114
Material e Método	122
Resultados e Discussão	129
Conclusões	139
Referências Bibliográficas	140
 CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO GERAL	
Discussão e considerações finais	150
Conclusões	155
Referências Bibliográficas	157
 APÊNDICE A: GRÁFICOS DA VARIAÇÃO DO METABOLISMO ESPECÍFICO, ABSOLUTO E MASSA AO LONGO DO CICLO COMPLETO DE DESENVOLVIMENTO DE <i>C. MEGACEPHALA</i>, NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	
	161

RESUMO

Chrysomya megacephala (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) foi introduzida no Brasil há algumas décadas atrás, e é uma espécie de mosca-varejeira de considerável importância médico-sanitária por ser veiculadora de enteropatógenos, poder causar miíases secundárias, e também ter grande importância em estudos forenses por auxiliar na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em cadáveres, além de ter importância agrícola, como polinizadora. Desta forma, diversos trabalhos utilizam esta espécie como modelo de estudo, avaliando suas características biológicas e processos ecológicos envolvidos. Porém, poucos estudos analisaram processos fisiológicos nas diferentes fases da vida deste inseto. O estudo desses processos é fundamental para auxiliar na compreensão da biologia e comportamento da espécie, o que facilitaria a elaboração de desenhos experimentais em trabalhos envolvendo *C. megacephala*, além de fornecer embasamento para a proposição de métodos de controle para esta espécie. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos de alguns processos fisiológicos de *C. megacephala*, sob a influência de diferentes tratamentos nas diferentes fases de seu ciclo de vida, focando em três áreas de estudo da fisiologia: metabolismo energético, termorregulação e neurofisiologia sensorial. Os resultados do presente estudo mostraram que existe uma grande alteração no metabolismo ao longo dos diferentes estágios do ciclo de vida de *C. megacephala*, sendo que o estágio larval apresenta o maior consumo de O₂, que é refletido na grande quantidade de calor dissipado durante este estágio. O ciclo de atividade dos adultos de *C. megacephala* é influenciado pelo fotoperíodo e temperatura do ambiente, sendo que esta espécie utiliza comportamentos de termorregulação quando ocorre aumento da temperatura ambiental ou alterações na presença e ausência de luz. Já a presença de drogas gerou respostas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*, listadas a seguir: (a) aumentou (tratamento Citalopram) ou reduziu (tratamento Diazepam) o ganho de massa por tempo; (b) reduziu o metabolismo nos primeiros instares larvais na presença das duas drogas; (c) o metabolismo e mortalidade dos adultos foram alterados em relação ao controle-dieta; (d) aumentou a temperatura do conjunto agregado larval+substrato alimentar; (e) não modificou a atividade ao longo do dia; (f) reduziu a taxa de disparos do neurônio H1 nos adultos mais jovens; (g) e no tratamento Diazepam, foi observado o maior atraso na resposta dos primeiros spikes. A alteração do fotoperíodo também gerou respostas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*: (a) redução (tratamento Claro) ou aumento (tratamento Escuro) do ganho de massa durante o desenvolvimento larval; (b) não alterou o metabolismo nos primeiros instares larvais, gerou grandes alterações no metabolismo dos adultos em repouso e durante atividades espontâneas; (c) o ciclo de atividade foi drasticamente alterado, e consequentemente a temperatura de porções do corpo ao longo do dia; (d) ambos os tratamentos reduziram as taxas de disparo neurais; (e) o intervalo entre os spikes desses tratamentos foi maior nas moscas mais jovens e a primeira resposta do tratamento Escuro tendeu a ser maior que a observada nos outros tratamentos.

Palavras chave: Moscas-varejeiras, Fisiologia de insetos, Metabolismo Energético, Termorregulação e Neurofisiologia Sensorial.

ABSTRACT

Chrysomya megacephala (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) was introduced into Brazil a few decades ago, and has medical, criminal and also agricultural importance, because this species presents a secondary role in pollination, however, it is of great importance for public health, as a vehicle for pathogens, or as causative agent of secondary myiasis, and for forensic studies by helping to estimate the postmortem interval (PMI) of corpses. Thus, this species is used as a model in several studies, which aim to observe biological and ecological aspects of its life cycle. However, few studies have addressed physiological processes in different life stages of this insect. Studies of such processes are essential to understand biological and behavioral aspects of species, which, in this case, could contribute to provide bases for proposing efficient methods of control for this species. In this context, the objective of this research was to study the metabolism, thermoregulation and neural-physiology of *C. megacephala*, under the influence of different treatments at different stages of its life cycle. The results of this study showed that there was a major change in metabolism during different stages of the life cycle of *C. megacephala*, and the consumption of O₂ was higher during the larval stage, which was reflected by the large amount of heat dissipated during this stage. The activity cycle of adults of *C. megacephala* is influenced by photoperiod and environment temperature: according to an increase of the ambient temperature or the presence and absence of light, the individuals exhibited thermoregulatory behaviors to adjust their body temperature with the environmental stimuli. The presence and the type of drugs used at the different stages of the life cycle of *C. megacephala* also affected the physiological response of this species: (a) increased (Citalopram treatment) or decreased (Diazepam treatment) mass gain per time; (b) both drugs reduced the metabolism in the early larval instars; (c) the metabolism and adult mortality have changed compared to control-diet, (d) the temperature of the larval aggregated+food substrate increased; (e) did not have change in the activity throughout the day; (f) reduced the rate of firing of the neuron H1 in younger adults, and flies treated with Diazepam presented the largest delay in the response of the first spikes. The variation of the photoperiod also affected the physiological responses at the different stages of the life cycle of *C. megacephala*: (a) flies raised at 100% of light gained less weight during the larval periods, while those raised at 100% of dark gained more weight; (b) no differences in the metabolism of the early larval instars were found; (c) major changes were caused in the metabolism of adults at rest and during spontaneous activity; (d) the activity cycle was dramatically altered and consequently the temperature of body parts throughout the day; (e) both treatments reduced neuronal firing rates, and the interval between the spikes of these treatments was higher in younger flies and the first response in 100% dark treatment was slightly higher than that observed in other treatments.

Key words: Blowfly, Insect physiology, Energetic metabolic, Thermoregulation and sensory neurophysiology.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E METODOLOGIA GERAL

RESUMO

Chrysomya megacephala (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) foi introduzida há cerca de 30 anos atrás no Brasil e é de considerável importância agrícola, como agente polinizador, também apresentando importância médico-sanitária por ser veiculadora de enteropatógenos, poder causar miíases secundárias, além de ter grande importância em estudos forenses por auxiliar na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em cadáveres. Desta forma, diversos trabalhos utilizam esta espécie como modelo de estudo, avaliando características biológicas e morfológicas da mesma e processos ecológicos envolvidos. Porém, poucos estudos analisaram processos fisiológicos nas diferentes fases da vida deste inseto. O estudo desses processos é fundamental para auxiliar na compreensão da biologia e comportamento da espécie, o que facilitaria a elaboração de desenhos experimentais em trabalhos envolvendo *C. megacephala*, além de fornecer embasamento para a proposição de métodos de controle para esta espécie. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos de alguns processos fisiológicos de *C. megacephala*, sob a influência de diferentes tratamentos nas diferentes fases de seu ciclo de vida, focando em três áreas de estudo da fisiologia: metabolismo energético (Capítulo 2), termorregulação (Capítulo 3) e neurofisiologia sensorial (Capítulo 4). Os resultados do presente estudo mostraram que existe uma grande alteração no metabolismo ao longo dos diferentes estágios do ciclo de vida de *C. megacephala*, sendo que o estágio larval apresenta o maior consumo de O₂, que é refletido na grande quantidade de calor dissipado durante este estágio. O ciclo de atividade dos adultos de *C. megacephala* é influenciado pelo fotoperíodo e temperatura do ambiente, sendo que esta espécie utiliza comportamentos de termorregulação quando ocorre aumento da temperatura ambiental ou alterações na presença e ausência de luz. Já a presença de drogas gerou respostas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*: aumentou (sob o efeito de Citalopram) ou reduziu (sob o efeito de Diazepam) o ganho de massa por tempo; reduziu o metabolismo nos primeiros íntares larvais na presença das duas drogas; o metabolismo e mortalidade dos adultos foram alterados em relação ao controle-dieta; aumentou a temperatura do conjunto agregado larval+substrato alimentar; não modificou a atividade ao longo do dia, reduziu a taxa de disparos do neurônio H1 nos adultos mais jovens, e no tratamento Diazepam foi observado o maior atraso na resposta dos primeiros spikes. A alteração do fotoperíodo também gerou respostas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*: redução (tratamento Claro) ou aumento (tratamento Escuro) do ganho de massa durante o desenvolvimento larval; não alterou o metabolismo nos primeiros instares larvais, gerou grandes alterações no metabolismo dos adultos em repouso e durante atividades espontâneas;

o ciclo de atividade foi drasticamente alterado, e consequentemente, a temperatura de porções do corpo ao longo do dia. Ambos os tratamentos (Claro e Escuro) reduziram as taxas de disparo neurais, sendo que o intervalo entre os spikes desses tratamentos foi maior nas moscas mais jovens e a primeira resposta do tratamento Escuro tendeu a ser maior que a observada nos outros tratamentos.

Palavras chave: Mosca-varejeira, fisiologia, metabolismo energético, termorregulação e neurofisiologia.

INTRODUÇÃO GERAL

Os dípteros em geral despertam grande interesse nos estudos científicos devido ao grande número de espécies descritas, fácil manutenção sob condições experimentais, rápida produção de grande número de descendentes, importância agrícola por atuarem como agentes polinizadores (ANDERSON *et al.*, 1982; SULAIMAN *et al.*, 1988, 1989), ou por causarem danos econômicos à agricultura, além do interesse como vetores de doenças, tendo, desta forma, importância médico/veterinária (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983; FURLANETTO *et al.* 1984; PESSOA & MARTINS, 1988; MARCONDES, 2001; STONEHOUSE *et al.*, 2004).

Alguns dípteros podem ser de interesse forense (GUIMARÃES *et al.*, 1978; PESSOA & MARTINS, 1988; CATTS & GOFF, 1992; MARCONDES, 2001; STONEHOUSE *et al.*, 2004), como as moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), que têm grande importância médico-sanitária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (FURLANETTO *et al.* 1984), podendo causar miíases nos animais e em humanos (GUIMARÃES *et al.*, 1983; ZUMPT, 1965), além de serem de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (GOMES *et al.*, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1996; WELLS & GREENBERG, 1992).

Alguns aspectos da biologia e ecologia da mosca-varejeira *Chrysomya megacephala*

Em outras regiões do mundo, *C. megacephala* é mais conhecida como “mosca de latrina do oriente” (*oriental latrine fly*), sendo que o adulto deste díptero apresenta uma coloração azul-verde metálica em seu tórax e abdômen e tem grande quantidade de omatídeos presentes na cabeça, que compõem os olhos compostos na tonalidade vermelha (OLIVEIRA-COSTA, 2003; CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008; GOMES, 2010)

Esta espécie pertence à família Calliphoridae (com mais de 1.000 espécies e cerca de 150 gêneros reconhecidos), a qual se caracteriza por uma coloração metálica do corpo, aristas das antenas plumosas na extremidade distal, e duas (raramente três) cerdas notopleurais (CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008; TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011).

O espiráculo mesotorácico (anterior) de adultos de *C. megacephala* é acastanhado; as larvas desta espécie não apresentam tubérculo, mas possuem esclerito oral parcialmente pigmentado com uma mancha branca escura. Já os adultos apresentam dimorfismo sexual, que pode ser observado na região da cabeça (olhos holópticos nos machos e dicópticos nas fêmeas) e nos omatídeos que apresentam simetria nas fêmeas e nos machos fora da área de distribuição original, são assimétricos (OLIVEIRA-COSTA, 2003; CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008; SUKONTASON & CHAIWONG, 2008).

Esta espécie apresenta grande diversidade ecológica, ocupando diferentes habitats (ZUMPT, 1965), tendo o estágio larval associado ao processo de decomposição de matéria orgânica (NUORTEVA, 1977), sendo frequentemente encontrada em lixos urbanos, fezes, carcaças, fossas, etc. (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1978; BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984).

Regiões mais quentes e úmidas tendem a favorecerem o desenvolvimento deste inseto e sua abundância (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 1996; VÉLEZ & WOLFF, 2008). Desde os anos 1970, a ocorrência de *C. megacephala* estendeu-se a diferentes áreas do mundo, invadindo novos territórios da Nova Zelândia e África (WILLIAMS & VILLET, 2006), juntamente com a América do Sul, Central e do Norte (IMBIRIBA *et al.*, 1977; GUIMARÃES *et al.*, 1978), provavelmente por meio de navios. *Chrysomya megacephala* era encontrada principalmente no Oriente e na região da Australásia, podendo também ser encontrada no Japão e na região Paleártica (RICHARD & SHEARER, 1997). Assim, as moscas da família Calliphoridae apresentam atualmente distribuição praticamente mundial.

Aspectos do ciclo de vida de *C. megacephala*

Chrysomya megacephala é um inseto com desenvolvimento holometábolo, apresentando quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011). O tempo de vida varia em torno de um mês a dois meses, desde estágio de ovo até adulto (GABRE *et al.*, 2005; BARROS-CORDEIRO & PUJOL-LUZ, 2010).

A fase larval é dividida em três instares mais a fase de pré-pupa, sendo dado o nome de farado ao indivíduo em processo de transição entre os instares (MCALPINE *et al.* 1981; ERZINÇLIOĞLU, 1985; QUEIROZ *et al.*, 1997). De acordo com Hinton (1946), Fraenkel & Bhaskaran (1973) e Costa *et al.* (2006), os estágios do desenvolvimento pós-embriônico podem ser definidos de acordo com mudanças na morfologia e fisiologia dos imaturos, em relação à duração (tempo) do desenvolvimento do inseto.

As fêmeas têm preferência por ovipor em condições de baixa intensidade luminosa (GREENBERG, 1990). Os ovos de *C. megacephala* levam aproximadamente 12 horas para desenvolver em uma temperatura de 26 °C, enquanto a larva demora em torno de cinco dias para empupar, e a pupa em torno de cinco dias até a emergência do adulto (GABRE *et al.*, 2005; BARROS-CORDEIRO & PUJOL-LUZ, 2010). A sobrevivência, o ganho de massa e consequentemente o tamanho dos indivíduos, são bastante influenciados pela temperatura em que os mesmos se desenvolveram (REIGADA & GODOY, 2006). Depois de completar todos os estágios de desenvolvimento, o ciclo de vida do adulto de *C. megacephala* consiste de aproximadamente um mês (GABRE *et al.*, 2005), podendo se estender um pouco mais dependendo das condições e variáveis às quais os adultos estão expostos.

Os fatores envolvidos na reprodução e taxa de sobrevivência de *C. megacephala* estão intimamente relacionados com aspectos do desenvolvimento larval, período este considerado como o mais crítico durante a vida deste inseto (LEVOT *et al.*, 1979). A quantidade de alimento assimilado pelas larvas é importante para determinar a sua sobrevivência até o adulto e capacidade de reprodução (SLASNKY & SCRIBER, 1985; VONZUBEN, 1995). Além disso, a competição interespecífica pelo substrato alimentar, como a existente por exemplo, entre *C. megacephala* e *C. albiceps*, é outro fator que pode influenciar na reprodução e sobrevivência. Quando existe este tipo de competição larval, as taxas de desenvolvimento e incremento de massa são alteradas, interferindo no tamanho dos seus adultos resultantes, além da possível predação que pode ocorrer pelas larvas de *C. albiceps*, e até canibalismo, no caso desta última (FARIA *et al.*, 1999).

Assim, as fases do ciclo de vida de *C. megacephala* apresentam diferenças morfológicas, anatômicas, comportamentais, e consequentemente, na captura de informações do ambiente, ou seja, sensoriais. Os sentidos nos animais são os meios através dos quais os seres vivos percebem e reconhecem outros organismos, informações do próprio corpo e do ambiente que os cerca, e consistem na aquisição, interpretação, seleção e organização das informações obtidas pelos sentidos.

Alguns aspectos sensoriais dos insetos

Os insetos, assim como todos os animais, possuem múltiplos canais sensoriais que extraem a informação do meio externo e a convertem em respostas comportamentais e memória (HOMBERG, 2005). A maioria dos neurônios nos insetos são monopolares, ou seja, possuem uma única projeção no corpo celular; já as células periféricas são bipolares, recebendo estímulos do ambiente e transmitindo para um gânglio central. Algumas células multipolares que possuem muitas ramificações ocorrem nos gânglios do sistema nervoso, recebendo inúmeras informações oriundas do ambiente, informações estas que são transmitidas por neurônios bipolares (CHAPMAN, 1998).

Assim, a compreensão de como a informação é transmitida e processada entre os diferentes sistemas sensoriais dos animais é de extrema importância, e na maioria deles, a visão merece especial atenção, sendo que seu processamento é bastante complexo (CALVERT, 2001; EGELHAAF *et al.*, 2004). Os insetos, particularmente os dípteros, possuem um sistema visual bastante elaborado, constituído por um par de olhos compostos cobrindo a maior parte da cabeça e geralmente três ocelos posicionados na porção superior da mesma (CHAPMAN, 1998, RUPPERT & BARNES, 2005; STAVENGA, 2004). Os olhos compostos apresentam milhares de omatídeos, os quais são formados por um aparato dióptrico, com lentes e células fotorreceptoras, que recebem a informação do ambiente e induzem sinais elétricos neurais. Pela grande quantidade de omatídeos, o processamento desta informação obtida pelo estímulo luminoso é complexo e necessita de uma grande eficiência e rápida resposta comportamental e motora dos insetos, pois a visão influencia o voo, o equilíbrio e a procura por alimento (CHAPMAN, 1998; STAVENGA, 2004).

Os insetos em geral fazem um uso eficiente da informação visual, por exemplo, durante o comportamento de acasalamento (LAND & COLLET, 1974; WAGNER, 1986; BOEDDEKER *et al.*, 2003; BOEDDEKER & EGELHAAF, 2003) e também na localização espacial, no caso específico de abelhas (ESCH & BURNS, 1996; SRINIVASAN *et al.*, 2000; ESCH *et al.*, 2001). Esta extraordinária capacidade é possível mesmo com a presença de um pequeno número de neurônios presentes no cérebro dos insetos, os quais processam as imagens da retina de uma forma surpreendentemente rápida (EGELHAAF *et al.*, 2004).

Alguns animais-modelo que vêm sendo utilizados em estudos do sistema visual são insetos da ordem Diptera, família Calliphoridae (STEVENINCK *et al.*, 1997; STRONG *et al.*, 1998; STAVENGA, 2004; GUIDO *et al.*, 2006). Nestes dípteros, a informação é captada pelos omatídeos e suas células fotorreceptoras, sendo a mesma transmitida a neurônios que a

recebem de forma integrada (CHAPMAN, 1998; STAVENGA, 2004). Estes neurônios são ativados por diferentes tipos de estímulos visuais. No caso destes dípteros, um dos principais neurônios utilizados nos estudos é o H1, que se encontra na placa lobular logo atrás dos fotorreceptores e corresponde à região do córtex, em primatas (STAVENGA, 2004).

Por ser um sentido que serve como guia para comportamentos, em praticamente todos os animais, o processamento da informação visual e interpretação pelo cérebro apresentam grande complexidade devido à flutuação dos padrões da imagem quando o animal se movimenta no ambiente, ou seja, existe uma entrada de informação espaço-temporal complexa (EGELHAAF *et al.*, 2004).

Desta forma, o estudo da neurofisiologia destes dípteros pode auxiliar bastante na compreensão da complexidade do sistema nervoso em insetos, caracterizando assim, a importância dessas moscas também é reconhecida em estudos envolvendo as neurociências, além de outros fatores já considerados anteriormente neste trabalho.

Metabolismo energético

O metabolismo é o conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos (RANDALL *et al.*, 2000). Estas reações são responsáveis pelos processos de síntese e degradação dos nutrientes na célula e constituem a base da vida, permitindo o crescimento e reprodução das células, mantendo as suas estruturas e adequando respostas às alterações ambientais (RANDALL *et al.*, 2000). Assim, fatores bióticos e abióticos podem causar grandes variações no metabolismo dos animais.

A principal forma de obtenção de energia pelos animais ocorre pela oxidação dos alimentos; assim, a quantidade de oxigênio que eles consomem pode ser utilizada como medida do metabolismo energético (RANDALL *et al.*, 2000; SCHMIDT-NIELSEN, 2002). A forma de obtenção do oxigênio do meio em que o animal faz parte varia enormemente entre diferentes espécies, sendo que os órgãos respiratórios apresentam estruturas totalmente distintas (brânquias, pele, pulmão, traqueia e órgãos acessórios [mucosas em geral, boca, ânus, etc.]) (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000; SCHMIDT-NIELSEN, 2002; RUPPERT & BARNES, 2005). Entre estes órgãos, a maioria associa a respiração com mecanismos de circulação sanguínea. No entanto, os insetos são os únicos animais terrestres que não associam a respiração com a circulação, pois desenvolveram uma estrutura formada por traqueias que permite o contato do meio aéreo diretamente com cada célula metabólica (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000; SCHMIDT-NIELSEN, 2002; RUPPERT & BARNES, 2005).

Esta estrutura é formada por pequenos tubos (traqueias) que se dividem e atingem cada célula do corpo do animal e pequenos orifícios (espiráculos) na superfície do exoesqueleto, os quais podem ser abertos ou fechados por influência de fatores como temperatura e umidade (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000; SCHMIDT-NIELSEN, 2002; RUPPERT & BARNES, 2005). Durante a aquisição de dados sobre taxas metabólicas, vários autores vêm observando para diferentes ordens de insetos, a presença de surtos na liberação de CO₂; isto se deve à abertura dos espiráculos após longo período de fechamento dos mesmos, o que gera grandes benefícios na economia de água para os indivíduos. Este processo é chamado de respiração descontínua ou cíclica, e é observado nos insetos (PUNT *et al.*, 1957; LIGHTON, 1988; RANDALL *et al.*, 2000; SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

A maioria dos estudos de obtenção de taxas metabólicas realizados com dípteros, avaliaram alterações na taxa metabólica em adultos, por meio de consumo de O₂ e produção de CO₂, durante alterações de temperatura, como por exemplo, o realizado em *Drosophila melanogaster* por Berrigan & Partridge (1997). Já Yurkiewicz & Smyth (1966) observaram que a taxa metabólica durante o voo da mosca-varejeira *Phaenicia sericata* dobra de valor quando a temperatura sobe de 15 °C para 30 °C. Outros estudos avaliaram as alterações no metabolismo em momentos prévios ao voo: Bartholomew & Lighton (1986) observaram um aumento na taxa metabólica durante o aquecimento do tórax das moscas *Pantophthalmus tabaninus*, o qual irá melhorar e permitir uma maior eficiência na alta frequência de contrações musculares durante o deslocamento que irá ocorrer.

Resumidamente, diversos trabalhos já foram realizados observando detalhes nas diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, como por exemplo: estudos de morfologia larval (ISHIJIMA, 1967; QUEIROZ & CARVALHO, 1987), avaliação de taxas de incremento de massa durante o desenvolvimento sob influência de alterações na temperatura (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 1996; VÉLEZ & WOLFF, 2008), tabelas de vida e duração dos diferentes estágios (WELLS & KURAHASHI, 1994; GABRE *et al.*, 2005), influência de substâncias químicas na taxa de incremento de massa durante o desenvolvimento (CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; SADLER *et al.*, 1997; BOUREL *et al.*, 2001; O'BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004), influência da densidade/competição/predação durante o desenvolvimento larval (VON ZUBEN, 1995; ROSA *et al.*, 2006), processos de dispersão larval pós-alimentar (GOMES *et al.*, 2006), etc.

Como se pode perceber, a maior parte dos trabalhos envolve aspectos morfológicos, biológicos ou ecológicos de diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, e

poucos trabalhos procuram compreender alguns aspectos fisiológicos, como o metabolismo energético da espécie, e a compreensão de aspectos da fisiologia da mesma seria de extrema importância, auxiliando na compreensão de todos os estudos que vierem a utilizar este díptero como sistema modelo. O estudo do metabolismo energético desse díptero poderia auxiliar na compreensão dos processos e fases da vida em que estes animais sofrem maiores alterações fisiológicas, informação esta que pode ser útil no controle desta espécie praga, na compreensão e previsão de fatores envolvidos na aplicação do estudo de insetos na ciência forense, e também informações que poderiam contribuir na compreensão de aspectos da biologia e fisiologia dessa espécie.

Por este motivo, um dos objetivos deste trabalho é estudar aspectos do metabolismo energético de *C. megacephala*, sendo que o metabolismo energético representa a soma de todas as reações químicas que estão ocorrendo no corpo do animal em um determinado período; assim, diversos fatores agem de forma sinérgica e podem alterar o metabolismo de um animal em estudo (RANDALL *et al.*, 2000).

Fatores do ambiente e influência sobre insetos: Temperatura.

O meio ambiente apresenta flutuações sazonais de diversos fatores abióticos, os quais influenciam todos os seres vivos, sendo derivados de aspectos físicos, químicos ou físico-químicos do próprio meio, tais como a luz, a temperatura, correntes de convecção, pH, entre outros (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000). Dentre estas variáveis, a temperatura tem grande importância, pois as reações e processos bioquímicos sofrem grande influência da mesma e desta forma, diversos animais gastam tempo e energia procurando regular a temperatura corpórea mantendo-a dentro de limites, os quais podem fornecer maior eficiência em processos fisiológicos permitindo a sobrevivência da espécie (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000).

Para os insetos, nenhuma outra variável ambiental é mais importante que a temperatura (HEINRICH, 1993), a qual pode agir alterando a atividade de um indivíduo ou aumentando em mais de 10 °C a temperatura corpórea em apenas alguns segundos, como pode ser observado durante a atividade de voo de moscas (BARTHOLOMEW & LIGHTON, 1986; CHAPPELL & MORGAN, 1987; MORGAN & HEINRICH, 1987). Desta forma, a influência da temperatura sobre os insetos é muito mais rigorosa e ativa que a observada em qualquer outro animal (HEINRICH, 1974, 1993).

Assim sendo, o estudo do controle da temperatura nos insetos se torna bastante interessante, pois esses artrópodes tiveram que desenvolver mecanismos de adaptação térmica e de termorregulação para a sobrevivência durante as variações sazonais de temperatura do ambiente (T°_{amb}) e durante as súbitas variações na temperatura corpórea (T°_{corp}) quando entram em atividade (HEINRICH, 1993). No entanto, a grande maioria dos insetos possui massa corpórea menor que 500mg, ou seja, a razão superfície/volume corpóreo é bem maior que a maioria dos outros animais, e conseqüentemente, não são capazes de manter a temperatura corpórea, pois sofrem grandes trocas de calor com o ambiente (CHAPMAN, 1998).

Diversos estudos já foram realizados na avaliação de processos de termorregulação e de adaptações térmicas utilizando-se dípteros; dentre eles, as espécies mais estudadas são as moscas de fruta do gênero *Drosophila sp.* Com esse drosofilídeo já foram realizados inúmeros trabalhos observando-se os efeitos da T°_{corp} sobre o envelhecimento (MAYNARD-SMITH, 1963), longevidade (HOSGOOD & PARSONS, 1968; MURPHY *et al.*, 1983), estratégias bioquímicas na adaptação térmica (MORRISON & MILKMAN, 1978; ALAHOTUS, 1983; CZAJKA & LEE, 1990), produção de ovos (CLAVEL & CLAVEL, 1969), acasalamento (SCHNEBEL & GROSSFIELD, 1984) e distribuição ecológica (PARSONS, 1978; KIMURA, 1988).

Alguns mecanismos de adaptação térmica e termorregulação já foram descritos para várias espécies de insetos (HEINRICH, 1993), e no caso das moscas, podem ser citados mecanismos como: a utilização de correntes de convecção próximas ao tórax reduzindo a temperatura desta região do corpo durante o voo (HEINRICH, 1993); adaptações ao frio em diversas espécies de dípteros (LITTELWOOD, 1966; KEVAN, 1972; BYERS, 1983; KOSHIMA, 1994;); alterações anatômicas na disposição de vasos de hemolinfa facilitando o resfriamento e condução do calor (MORGAN *et al.*, 1985); alteração na abertura e fechamento de espiráculos quando a T°_{amb} aumenta ou diminui, respectivamente, facilitando o resfriamento ou manutenção da T°_{corp} (EDNEY & BARRAS, 1962). A termorregulação dos insetos propiciou a conquista de diversos ambientes (como por exemplo, desertos, florestas tropicais e ambiente Ártico).

Este comportamento de termorregulação tem sido objeto de investigação há muitos anos (HEINRICH, 1993). Além de fatores endógenos, outros fatores influenciam a termorregulação nos animais, tais como o tamanho corpóreo, a pilosidade, a cor, tipo de nidificação, utilização de evaporação da água sobre o corpo, entre outros. Nos insetos, o aumento endotérmico da temperatura corpórea acima da temperatura ambiente é produzido pelos músculos torácicos de voo (HEINRICH, 1980a, 1993; ROBERTS & HARRISON, 1998). A

termogênese em insetos, obtida fisiologicamente, ocorre durante diversos tipos de atividades, como voo, deslocamento, canto, aquecimento pré-voo, defesa contra predadores, incubação da cria, forrageamento e durante a ontogenia da espécie, dentre outras (HEINRICH, 1981).

Assim, esse trabalho também teve como objetivo avaliar o perfil térmico, adaptações térmicas e processos de termorregulação nas diferentes fases da vida de *C. megacephala* em distintos cenários, visando dois tipos de enfoque: na biologia da espécie e na importância forense.

Importância forense da espécie

As moscas-varejeiras, como *C. megacephala*, têm grande importância médico-sanitária (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983; FURLANETTO *et al.* 1984), além de serem de fundamental importância em entomologia forense (WELLS & GREENBERG, 1992; VON ZUBEN *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2003).

Dentre estas espécies, *C. megacephala* apresenta uma grande importância nos estudos forenses, por ser uma das espécies mais abundantes e que primeiro chegam aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978) e também por se alimentar dos mesmos durante seu estágio larval, podendo assim indicar o intervalo pós-morte (IPM), que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo (CATTS & GOFF, 1992), dado de extrema importância nas investigações criminais.

Na ciência forense, diversos são os relatos de casos de mortes de pessoas por utilização de drogas lícitas ou não (CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994; NEUTEL & PATTEN, 1997; ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003), o que tem dificultado a investigação por parte dos peritos, devido à ação destas drogas na decomposição do corpo e no ritmo de desenvolvimento das larvas de insetos necrófagos (CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; SADLER *et al.*, 1997; BOUREL *et al.*, 2001; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos já foram realizados observando detalhes nas diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, como por exemplo:

Estágio larval - estudos de morfologia larval (ISHIJIMA, 1967; QUEIROZ & CARVALHO, 1987), avaliação de taxas de incremento de massa durante o desenvolvimento sob influência de alterações na temperatura (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 1996; VÉLEZ & WOLFF, 2008), tabelas de vida e duração dos diferentes estágios (GABRE *et al.*, 2005; WELLS & KURAHASHI, 1994), influência de substâncias químicas na taxa de incremento de massa durante o

desenvolvimento (CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; SADLER *et al.*, 1997; BOUREL *et al.*, 2001; O'BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004), influência da densidade/competição/predação durante o desenvolvimento larval (ULLYETT, 1950; GODOY *et al.*, 1995; VON ZUBEN, 1995; GODOY *et al.*, 1996; ROSA *et al.*, 2006), além de processos de dispersão larval pós-alimentar (GOMES *et al.*, 2006);

Estágio adulto – análises aerodinâmicas e neurofisiológicas do voo durante respostas a estímulos visuais (LAND & COLLET, 1974; BUELTHOFF *et al.*, 1980; HAUSEN, 1982; WEHRHAHN *et al.*, 1982; WAGNER, 1985; DICKINSON *et al.*, 1999; FRYE, 2001; BORST & HAAG, 2002; FERNANDES *et al.*, 2010), dentre outros.

Como se pode perceber, a maior parte dos trabalhos envolve aspectos morfológicos, biológicos ou ecológicos de diferentes fases do desenvolvimento, e poucos trabalhos procuram compreender alguns aspectos fisiológicos de *C. megacephala*. Pelo exposto, a compreensão de tópicos relacionados à fisiologia desta espécie seria de extrema importância, auxiliando na melhor compreensão de aspectos comportamentais e da biologia que vierem a ser considerados, em estudos futuros com esta espécie.

OBJETIVO

O objetivo básico deste trabalho foi procurar dar contribuição a um melhor conhecimento de alguns processos fisiológicos de *C. megacephala*, sob a influência de diferentes tratamentos nas diferentes fases de seu ciclo de vida, focando em três áreas de estudo da fisiologia: metabolismo energético, termorregulação e neurofisiologia sensorial.

A motivação e a justificativa para este tipo de escolha são as seguintes:

- Os dípteros que foram utilizados neste trabalho têm importância na entomologia forense e são considerados como pragas do ponto vista médico/sanitário/veterinário, sendo dessa forma necessários trabalhos que procurem compreender melhor sua biologia/fisiologia e auxiliar no seu controle.
- A compreensão de alguns aspectos fisiológicos de *C. megacephala* pode trazer contribuições ao meio científico, acarretando em grandes benefícios para as áreas em que o estudo deste díptero é importante. Assim, os estudos de aspectos fisiológicos podem ajudar na elaboração, de uma forma mais detalhada, de desenhos experimentais e na compreensão de processos ou respostas comportamentais/ecológicas/biológicas já estudadas ou que virão a ser estudadas com esta espécie.

A análise do metabolismo energético das diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala* em diferentes substratos alimentares, com a presença ou não de substâncias químicas [*Diazepam* e *Citalopram*], e sob a influência de variações no fotoperíodo, teve por objetivo esclarecer os seguintes aspectos:

- se o metabolismo é alterado e em caso positivo, em que taxa isto ocorre no decorrer do desenvolvimento ontogenético da espécie;
- se a presença de diferentes substâncias alteram o padrão de desenvolvimento larval e o metabolismo, e em caso positivo, se ocorre aumento ou diminuição do ganho de massa e consumo de oxigênio por tempo, sob o efeito de diferentes drogas;
- se alterações no fotoperíodo poderiam causar alterações no padrão de desenvolvimento e no metabolismo, ou seja, se indivíduos de *C. megacephala* expostos à presença/ausência luz durante seu desenvolvimento se diferenciariam de indivíduos com fotoperíodo de 12 horas;

As análises do perfil térmico e de aspectos da termorregulação também foram realizadas, considerando-as diferentes fases de desenvolvimento deste díptero, observando-se alterações da temperatura no ambiente em que o indivíduo estava presente, no conjunto de indivíduos e em porções do corpo dos indivíduos. Esta investigação foi fundamental para se predizer:

- se existe um perfil térmico nas diferentes fases ontogenéticas do desenvolvimento de *C. megacephala* e se ocorrem processos termorregulatórios nas diferentes fases e nos diferentes tratamentos, além dos já descritos na literatura;
- se as larvas durante o desenvolvimento sob a influência dos diferentes tratamentos (*fotoperíodo*, *substrato alimentar*, *substâncias químicas*), poderiam apresentar um perfil térmico do agregado diferente para cada caso, podendo este perfil estar relacionado com o metabolismo, uma vez que a taxa de conversão e utilização da energia durante processos fisiológicos geraria dissipação de calor;
- se aspectos do perfil térmico e processos de termorregulação existentes no estágio de larva e de adulto se diferenciam nos diferentes tratamentos;
- como os adultos poderiam termorregular, tendo em vista a grande produção de calor quando os mesmos estão em atividade de voo, comparando esta atividade e o repouso em diferentes tratamentos (temperatura ambiente, fotoperíodo e alterações no desenvolvimento devido à influência de substâncias químicas durante a fase larval);
- se ocorrem alterações no perfil térmico e termorregulação ao longo do dia nos diferentes tratamentos;

- se estes aspectos do perfil térmico em laboratório são parecidos aos observados em ambiente natural;

Por último, aspectos da neurofisiologia sensorial foram investigados em adultos de *C. megacephala*, considerando os diferentes tratamentos sob o aspecto quantitativo, qualitativo e temporal, sendo fundamental para se prever se:

- os indivíduos nos estágios larvais sob a influência dos diferentes tratamentos (alteração no fotoperíodo e presença de drogas) desenvolveram adultos com algum tipo de alteração na percepção sensorial, e nesse caso, com alterações visuais na percepção de estímulos de movimentação horizontais;

- os indivíduos com diferentes idades desenvolvidos com ausência total de luz ou com presença constante de luz, apresentaram alterações na resposta aos estímulos;

- a presença de substâncias químicas alterando o desenvolvimento do indivíduo durante estágios anteriores de seu ciclo, poderia acarretar em alterações na percepção do ambiente em estágio posterior de seu ciclo de vida;

MATERIAL E MÉTODOS

Para atender os objetivos do presente projeto de pesquisa, foram necessárias três metodologias distintas, envolvendo as três subáreas da fisiologia: metabolismo energético, temperatura/termorregulação e neurofisiologia sensorial. Desta forma, foram consideradas as três etapas seguintes:

1. Realização de experimentos para coleta de dados:

➤ Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais, para obtenção de ovos e gerações;

➤ Ovos separados para determinação do consumo de oxigênio.

➤ Formação das densidades larvais nos diferentes tratamentos (controle, presença/ausência de drogas [*Diazepam* e *Citalopram*] e alterações no fotoperíodo [*fotoperíodos de 0h, 12h e 24h*]) de acordo com cada metodologia;

➤ Separação de larvas para determinação do consumo de oxigênio, variação no ganho de massa no decorrer do desenvolvimento larval, termografia e utilização de sensores de temperatura para obtenção do padrão térmico nos diferentes tratamentos;

➤ Pupas geradas nos diferentes tratamentos foram separadas para determinação do consumo de oxigênio;

➤ Adultos obtidos foram separados para determinação do consumo de oxigênio, padrão térmico/termorregulação de diferentes porções do corpo (cabeça, tórax, abdome) de acordo com a atividade, tratamento e variação de temperatura, por meio de termografias;

2. Análise dos dados obtidos procurando compará-los entre si, por meio de testes estatísticos e análises gráficas;

3. Análise e síntese dos diferentes resultados obtidos nas metodologias, procurando-se observar padrões e respostas relacionados à biologia, ecologia, fisiologia e comportamento de *C. megacephala*.

Protocolos experimentais

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento proteico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para oviposição das fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F₁. Somente a geração F₂ foi utilizada nos experimentos, por ser progênie de uma que teve todo o seu desenvolvimento sob condições experimentais.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval, nas diferentes metodologias e tratamentos, foram utilizados: meio artificial à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982) e carne moída bovina, com o objetivo de comparar com os resultados obtidos na dieta oligídica descrita anteriormente. Em alguns tratamentos, houve a presença de substâncias químicas (ansiolítico [Diazepam] e antidepressivo [Citalopram]), com o intuito de posterior aplicação forense; e também tratamentos com alterações no fotoperíodo (fotoperíodos de 0h, 12h e 24h).

As substâncias químicas que foram utilizadas têm atuação no sistema nervoso. Utilizou-se Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ[®] 5mg - comprimidos – Novaquímica Laboratórios S/A) e Citalopram (comprimidos de 20mg –

Alcytam[®], laboratório Torrent). Cabe aqui salientar mais uma vez que estudos sobre o efeito destas substâncias em insetos são escassos.

Todos os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos na presença de drogas tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento destas larvas de dípteros.

No caso do ansiolítico (Diazepam), foi colocada na dieta artificial uma concentração correspondente a DL50 (intravenosa) de coelho, ou seja, 9 mg/Kg [73,6mg de Diazepam em 125g de dieta] (NIOSH, 2004), e no caso do antidepressivo Citalopram, foi utilizada a dose de 18mg/kg [8,3mg de Diazepam em 125g de dieta], observada em overdoses com humanos (JONASSON & SALDEEN, 2002; WORM *et. al.*,1998).

Foi utilizada apenas a dose letal de cada uma das drogas na dieta artificial, sendo que no controle, não foi adicionado nada além dos componentes da dieta de LEAL *et al.* (1982).

Início dos experimentos

Os ovos foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os mesmos foram separados e iniciou-se a coleta de dados considerando as diferentes metodologias contidas neste projeto. Foram obtidas informações durante todas as fases do ciclo de vida de *C. megacephala*. As metodologias foram três: Metabolismo Energético, Temperatura/Termorregulação e Neurofisiologia Sensorial.

Metabolismo energético (Capítulo 2)

O estudo do metabolismo energético foi realizado por meio de um sistema automatizado de respirometria intermitentemente fechada (LIGHTON, 1993), utilizando-se taxas de consumo de oxigênio (VO₂) de todos os estágios do desenvolvimento de *C. megacephala*, ou seja, ovo, larva, pupa e adulto. Cada estágio do desenvolvimento foi acondicionado em seringas hermeticamente fechadas e de volume adequado ao seu tamanho e número de indivíduos (variando de 5 a 15mL, dependendo o tamanho dos indivíduos no estágio do ciclo de vida deste díptero). Foram realizadas pelo menos três repetições dos experimentos para cada tratamento, nos diferentes estágios de vida. Foram realizados três conjuntos de experimentos, procurando avaliar alterações no metabolismo energético nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*:

1. Presença de drogas no substrato de desenvolvimento alimentar;
2. Alteração no fotoperíodo durante todas as fases do ciclo de vida;
3. Alteração na qualidade do substrato alimentar larval

A respirometria fechada foi escolhida baseada em algumas considerações. Nem sempre é possível obter condições de fluxo mínimo necessário para manter as leituras do sensor dentro de sua acuidade e precisão, apesar da grande sensibilidade dos sensores contemporâneos; nessas circunstâncias, a respirometria aberta não pode ser empregada. A limitação básica se encontra na amplitude do sinal a ser obtido, que é dada pela relação entre o fluxo de entrada e o consumo de oxigênio do animal, sendo então a limitação em decorrência de consumos baixos. Desse modo, os animais muito pequenos, ou em condições de depressão metabólica, estivação são os exemplos básicos de situações nas quais a técnica aberta poderá estar impossibilitada de ser empregada. Nessas situações, pode-se empregar a técnica fechada ou a técnica intermitente (LIGHTON, 1993).

A massa de cada indivíduo referente a cada estágio do desenvolvimento e o conjunto (seringa mais substratos e indivíduo do estágio) foi obtida em intervalos de tempo (6 horas) desde o início (ovo) até o final do intervalo de experimentação (adulto), em cada tratamento. Foram também considerados valores necessários para avaliação de alterações na porcentagem de O₂ e possíveis correlações com os dados que foram obtidos de VO₂.

Utilizou-se o programa DATACAN V (Sable Systems), um controlador múltiplo de fluxo (Multiplexer TR-RM8, Sable Systems), o qual foi programado para intercalar períodos de 90 minutos, nos quais as câmaras eram ventiladas com ar exterior, de forma a renovar o ar contido nos respirômetros (fase aberta), com períodos de 15 minutos [ovo, larva e adulto] e 20 minutos [pupa] (fase fechada), na qual o ar contido nos respirômetros era reciclado através de um analisador de oxigênio (Sable Systems, PA-1B). O fluxo de ar nas seringas foi de 50ml/min.

A queda na concentração fracional de O₂ registrada durante a fase fechada foi utilizada para o cálculo do VO₂. Deste modo, o sistema permitiu que fosse coletada uma medição de VO₂ para cada seringa em diferentes tempos, dependendo da fase de desenvolvimento (ovo – 1h, larva – 1,5h, pupa – 1,67h e adulto 1,25h). A queda na concentração de O₂ foi via de regra, linear e a inclinação da regressão foi utilizada para o cálculo do VO₂ (taxa de aquisição de dados de um Hertz), sendo aceitos para análise os resultados de r^2 superiores a 0,8.

Alguns detalhes dos materiais e métodos foram distintos para cada estágio do desenvolvimento.

Estágios do desenvolvimento de *C. megacephala*.

Ovo: período de desenvolvimento embrionário.

Os ovos foram depositados pelas fêmeas (F_1) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os mesmos foram separados e as massas de ovos pesadas e colocadas em seringas de 5mL juntamente com 1 grama de dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982), com o objetivo de impedir a desidratação dos ovos durante o período até a eclosão das larvas. O conjunto de ovos em cada seringa tinha uma massa média de 0.0347 ± 0.003 g.

Foram utilizadas sete seringas, sendo que em seis delas, foi obtido o consumo de oxigênio de massas de ovos/dieta, e em uma delas, havia apenas dieta oligídica sem a presença de ovos. Todo o experimento metabólico foi realizado dentro de uma BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 12 horas).

A taxa metabólica dos ovos foi analisada por um período de pelo menos 11 horas, sendo que a partir deste intervalo, larvas de primeiro instar já começaram a aparecer nas seringas. A partir deste momento, foram montadas densidades larvais para início da aquisição de dados do VO_2 do estágio larval.

Larva: período de pós-desenvolvimento embrionário.

Após a eclosão das larvas, estas foram pesadas e separadas em grupos de 20 indivíduos, tendo sido colocadas em contato com 4 gramas do substrato alimentar e acondicionadas em 15mL de seringa mantidas dentro de uma BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$) de acordo com cada tratamento:

1. **Controle Dieta/larvas** – 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Diazepam** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas + 73,6mg de Diazepam.
3. **Citalopram** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas + 8,3mg Citalopram.
4. **Claro** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
5. **Escuro** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.
6. **Dieta** – zero larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
7. **Controle Carne/larvas** - 20 larvas + 4g carne bovina moída - fotoperíodo de 12 horas

Para estes tratamentos, além da obtenção dos dados de VO_2 , foi realizada a coleta de dados de incremento de massa durante o desenvolvimento larval, tendo sido coletados valores de massa individual das larvas para uma amostra aleatória de 10 indivíduos de cada recipiente, que foram lavados e secados antes da pesagem em intervalos de 12 horas, até que se completasse o desenvolvimento larval e os indivíduos procurassem um local para pupação, sendo que a primeira pesagem considerou larvas recém-eclodidas. Com estes dados, foi possível gerar curvas de desenvolvimento larval por meio da massa e poder correlacionar com os dados de VO_2 , que foram calculados posteriormente.

Após a pesagem e identificação (se possível) do instar larval, as larvas tiveram que ser devolvidas às respectivas seringas, pois caso fossem retiradas, a variação na densidade larval (competição intraespecífica) seria muito grande, e poderia causar uma resposta na taxa de desenvolvimento larval, como observado por IRELAND & TURNER (2006) e VON ZUBEN (1995), o que dificultaria a análise dos dados sob a influência dos tratamentos.

A taxa metabólica das larvas foi analisada por um período de pelo menos 4-5 dias (120 horas) dependendo do tratamento, momento a partir do qual algumas pupas já podiam ser observadas dentro da seringa.

Pupa: período de pós-desenvolvimento embrionário.

As pupas obtidas em cada uma das seringas foram coletadas e agrupadas em cinco indivíduos, os quais foram acondicionados em seringas de 15mL e mantidos dentro de uma BOD Eletrolab[®] (temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa $60 \pm 10\%$) de acordo com cada tratamento descrito anteriormente, porém sem a presença de substratos alimentares. Durante o intervalo de aproximadamente 80 horas, foi feita a aquisição de dados da variação de O_2 , para posterior obtenção do VO_2 para cada tratamento. Na medida em que houve a emergência dos adultos, os mesmos foram separados e acondicionados em frascos de acordo com o tratamento e mantidos em BOD Eletrolab[®] (temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa $60 \pm 10\%$), para posterior obtenção das taxas metabólicas deste estágio do ciclo de vida.

Adulto: período de pós-desenvolvimento embrionário

Os adultos obtidos foram separados de acordo com o sexo e acondicionados em seringas de 15mL, com dois indivíduos por seringa, de acordo com tratamentos descritos acima. Realizaram-se medidas pontuais com pelo menos uma repetição, nos seguintes intervalos de vida deste estágio de desenvolvimento: recém emergidos (1-3 dias); 7 dias; 15 dias e 30 dias de vida. Em cada uma das medidas temporais, os adultos foram aclimatados por 30min na BOD Eletrolab[®] (temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa $60 \pm 10\%$) antes de se iniciar a coleta da variação de O_2 em respirometria fechada. Mediu-se esta variação na presença e ausência de luz para os adultos, para posterior avaliação de alterações na atividade e consumo de O_2 .

Avaliação do perfil de temperatura corpórea e termorregulação (Capítulo 3)

O estudo da temperatura/termorregulação foi realizado por meio da utilização de sensores de aquisição de temperatura Tidbit/Onset[®] e câmera com visor infravermelho (Flir

SC-640). Foram realizados três conjuntos de experimentos, procurando avaliar alterações no metabolismo energético nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*:

1. *Presença de drogas no substrato de desenvolvimento alimentar*– **realizado no estágio de larva e adulto;**
2. *Alteração no fotoperíodo durante todas as fases do ciclo de vida*- **realizado no estágio de larva e adulto;**
3. *Alteração na qualidade do substrato alimentar larval*– **realizado apenas no estágio larval;**

A metodologia também variou de acordo com o estágio do desenvolvimento, sendo que neste caso, foram avaliados apenas os estágios larval e adulto, nos diferentes tratamentos.

Larva: período de desenvolvimento larval.

Sensores de aquisição de temperatura Tidbit/Onset®

Após a eclosão a partir das massas de ovos, as larvas foram separadas em densidades de 300 larvas por pote (250 mL)[300 larvas em 125 gramas de dieta – 0,42g/larva], sendo colocado um *Tidbit/Onset®* no centro da massa de substrato alimentar, capturando dados a cada 30 segundos, sendo realizadas duas repetições para cada um dos oito tratamentos. Todo o experimento foi realizado em uma BOD (temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa $60 \pm 10\%$).

Tratamentos realizados no estágio larval:

1. **Controle** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Dieta** – 0 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
3. **Dizepam** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 73,6mg diazepam - fotoperíodo de 12 horas.
4. **Citalopram** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 8,3mg citalopram- fotoperíodo de 12 horas.
5. **Claro** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
6. **Escuro** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.
7. **Carne/larva** - - 300 larvas + 125g carne moída bovina - fotoperíodo de 12 horas
8. **Carne** – 0 larvas + 125g carne moída bovina - fotoperíodo de 12 horas

Após a coleta dos dados de temperatura do conjunto (substrato alimentar + presença/ausência de larvas), foram feitas comparações das temperaturas médias, da diferença da temperatura entre os tratamentos, entre os dias e durante o intervalo de tempo observado.

Câmera com visor infravermelho Flir SC-640

Neste experimento, foi comparada a temperatura superficial do conjunto substrato alimentar/ larvas nos diferentes tratamentos citados acima. Foi feita uma termografia em intervalos de tempo de 12 horas até o início da dispersão larval, com duas repetições para

cada tratamento. Utilizando-se ferramentas de rotina específicas do programa de análise de dados (Thermacam Researcher Pro 2.9), foi delimitada uma área circular que compreendeu o limite do frasco, além de quatro retas que seccionaram em 45° cada área da circunferência. A média de temperatura da área e a variação da temperatura ao longo da reta foram utilizadas para comparação entre os tratamentos.

Adulto: temperatura ambiente e tratamentos

As temperaturas superficiais das diferentes porções do corpo do inseto também foram analisadas neste trabalho, nos diferentes tratamentos ao longo do dia, por meio de uma câmera com visor infravermelho Flir SC-640.

Neste experimento, 50 adultos de cada um dos diferentes tratamentos foram anestesiados e posteriormente colocados dentro de um tubo de PVC de 50 cm, sendo que de um lado deste tubo havia uma tela que permitiria a renovação do ar interno, permitindo as trocas gasosas e de calor entre o meio interno do tubo e externo (BOD). Nessas condições, foram fornecidos água e açúcar *ad libitum* aos insetos. Este tubo foi inserido dentro da BOD, a qual foi fechada com isopor e manteve-se apenas um orifício por onde o visor infravermelho era acoplado ao tubo para registro das termografias. A temperatura variou de acordo com cada experimento realizado.

Foram realizados os seguintes tratamentos na fase adulta:

1. **Controle** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Dizepam** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 73,6mg diazepam - fotoperíodo de 12 horas.
3. **Citalopram** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 8,3mg citalopram- fotoperíodo de 12 horas.
4. **Claro** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
5. **Escuro** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.

Utilizando-se ferramentas de rotina específicas do programa de análise de dados (Thermacam Researcher Pro 2.9), foram delimitadas áreas de interesse sobre as imagens térmicas do inseto, sendo que a média de temperatura da área foi utilizada para comparação entre os tratamentos. As áreas compreendiam três porções do corpo do inseto: cabeça, tórax e abdome. As termografias foram realizadas em intervalos de tempo distintos dependendo da metodologia. Para cálculo da temperatura da superfície, foi considerada emissividade de 0.95. Em média, 15 indivíduos eram avaliados em cada termografia obtida.

O experimento foi dividido em duas metodologias: (1) avaliação dos dados de temperatura nos diferentes tratamentos ao longo do dia; (2) perfil térmico no corpo de *C. megacephala* e de processos de termorregulação que poderiam ser observados, quando variáveis abióticas fossem alteradas (temperatura e fotoperíodo).

As metodologias são descritas a seguir:

Avaliação térmica dos adultos que se desenvolveram nos tratamentos

Neste experimento, foi comparada a temperatura superficial das diferentes porções do corpo do inseto nos diferentes tratamentos ao longo do dia, sendo que os adultos utilizados desenvolveram-se somente em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982), sendo considerados diferentes tratamentos, como descritos anteriormente: controle, diazepam, citalopram, escuro e claro.

Cada tratamento permaneceu aclimatado durante todo o experimento na BOD (temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$). As imagens termográficas foram obtidas durante intervalos de 48 horas na taxa de $0.333 \text{ quadro.min}^{-1}$ (1 imagem a cada 3min), sendo que os animais ficaram 12h aclimatados antes da captura das imagens.

Avaliação térmica e termorregulação dos adultos sob variações de temperatura

Apenas adultos do tratamento controle foram utilizados nesta metodologia, os quais foram aclimatados durante 1h em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C . O perfil térmico das diferentes porções dos indivíduos em atividade e repouso foi obtido de pelo menos 20 indivíduos para cada uma das temperaturas, após a aclimação (2h). As imagens termográficas foram obtidas durante intervalos de 30 minutos na taxa de $1 \text{ quadro.seg}^{-1}$. Nas diferentes temperaturas, foi observada a presença de processos de termorregulação, sendo quantificados e descritos quando foi o caso.

Neurofisiologia sensorial (Capítulo 4)

Os adultos originados e utilizados nos experimentos de metabolismo e temperatura, foram separados e submetidos a métodos de eletrofisiologia, por meio de microeletrodos acoplados no cérebro, para avaliação da transmissão do impulso no neurônio H1 do sistema visual. Para este experimento, contou-se com o apoio do Laboratório Dipterlab (Laboratório de Neurofísica) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de São Carlos, sob coordenação do Prof. Dr. Roland Koberle.

O sistema em análise é formado por milhares de células neurais e os experimentos foram realizados da seguinte forma: a mosca foi dissecada apenas para expor uma parte sensorial de seu sistema nervoso e permitir as medidas *in vivo*. Na placa lobular, situam-se quatro sinapses atrás dos fotorreceptores, além de várias dezenas de neurônios sensíveis a movimentos horizontais e verticais, com a finalidade de controlar a estabilidade do voo da mosca. O neurônio H1 responde a movimentos horizontais, integrando a informação provinda de aproximadamente 10.000 omatídeos presentes nos olhos compostos. O neurônio H1, por gerar impulsos, possibilita fazer registros extracelulares na mosca viva. Para isto, utilizam-se eletrodos de Tungstênio e registram-se os tempos de geração dos pulsos em sincronia com o estímulo, sendo que este último consiste de uma cena visual, que se movimenta rigidamente na direção horizontal. Os estímulos foram gerados por um monitor Tektronix 608 com taxa de refrescamento de 500 Hz.

Os dados e padrões obtidos nos adultos foram comparados entre os diferentes tratamentos e na perspectiva temporal. A aquisição e amostragem dos dados ocorreu em pelo menos três fêmeas adultas desenvolvidas em dieta (LEAL *et al.*, 1982) de cada um dos cinco tratamentos: controle, diazepam, citalopram, claro e escuro.

Foram realizados os seguintes tratamentos na fase adulta:

1. **Controle** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Dizepam** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 73,6mg diazepam - fotoperíodo de 12 horas.
3. **Citalopram** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 8,3mg citalopram- fotoperíodo de 12 horas.
4. **Claro** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
5. **Escuro** – adultos que foram desenvolvidos em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.

Foram também considerados os efeitos de possíveis alterações na idade e exposição nos diferentes tratamentos, ou seja, foram avaliados três grupos etários em cada tratamento: recém-emergido (3-7 dias), 15 dias e 30 dias de vida.

As Figuras 1 e 2 a seguir, mostram um esquema simplificado de toda a metodologia utilizada neste trabalho.

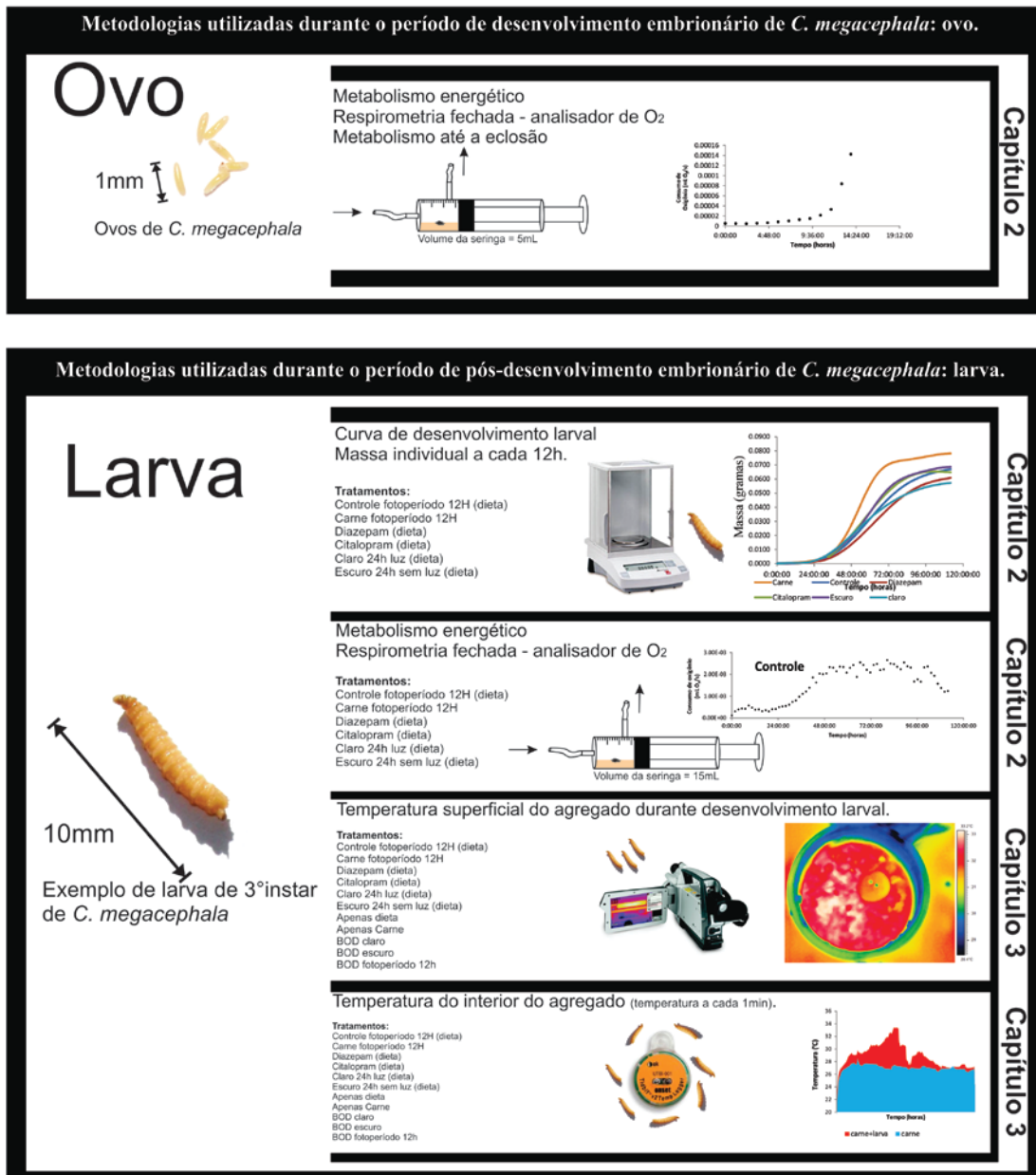


Figura 1. Esquema simplificado de toda metodologia utilizada no trabalho do estágio de ovo até o final do estágio larval.

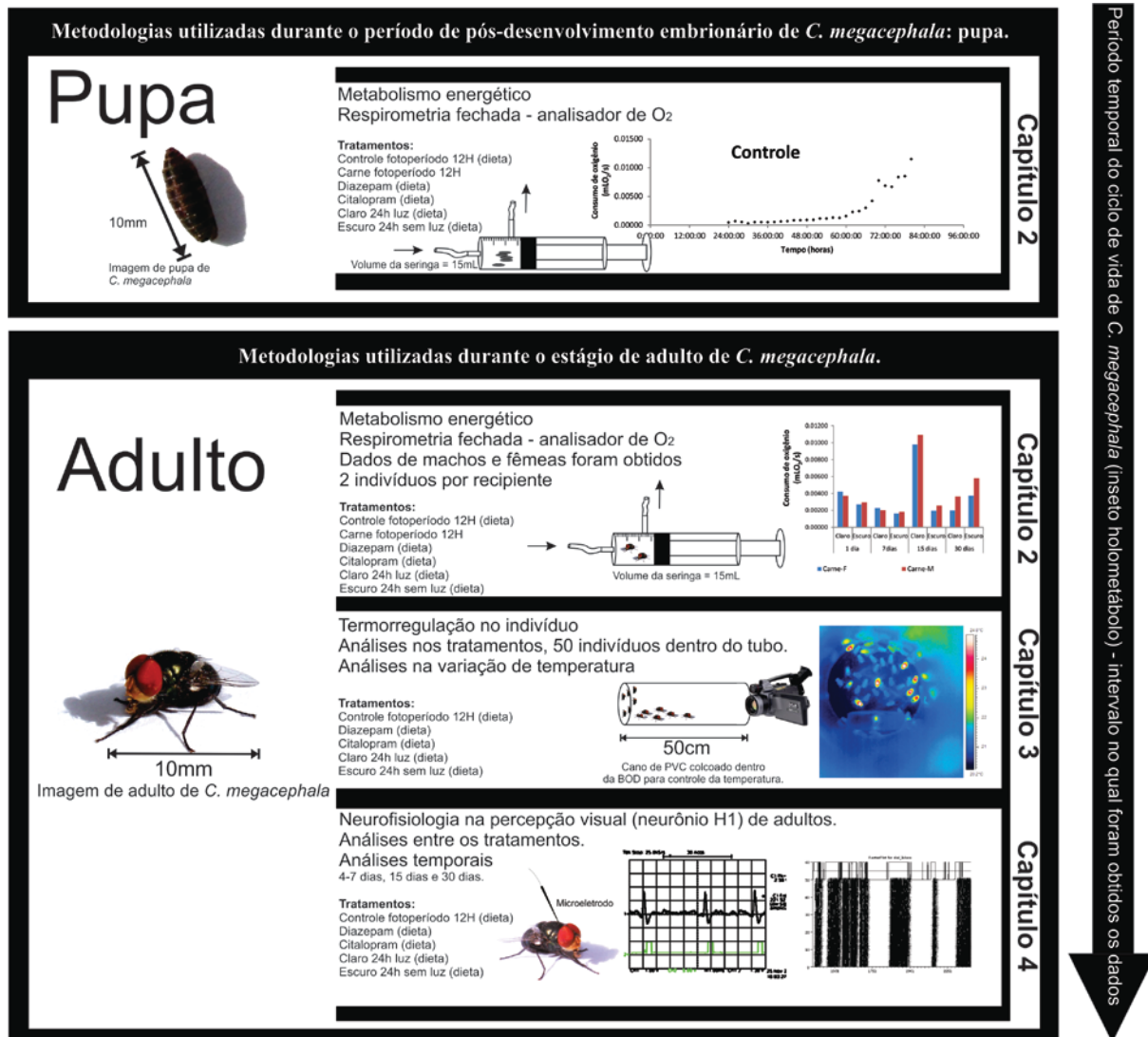


Figura 2. Esquema simplificado de toda metodologia utilizada no trabalho do estágio de pupa até adulto.

Análise dos dados obtidos considerando as diferentes metodologias

Diferentes testes estatísticos e análises descritivas dos dados foram realizados em cada metodologia considerada, sendo utilizados para se testar diferenças entre os tratamentos, considerando as variáveis obtidas em cada um das metodologias, como por exemplo: massa, consumo de oxigênio, temperatura de diferentes porções do corpo, etc. Cada uma das análises está mais detalhadamente descrita nos capítulos seguintes. Utilizou-se nível de significância de 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAHOTUS, S. N.. Heat shock proteins: A new view on temperature compensation. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B:379-387, 1983.
- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- ANDERSON, S.L.; SEDGLEY, M.; SHORT, J.R.T. & ALLWOOD, A.J. 1982. Insect pollination of mango in northern Australian *Mangifera indica*, includes *Apis mellifera*. **Australian Journal of Agricultural Research**, 33(3):541-548.
- BARROS-CORDEIRO, K.B. & PUJOL-LUZ, J. R. . Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, p. 709-717, 2010.
- BARTHOLOMEW, G A, & LIGHTON, J R B. 1986. Endothermy and energy metabolism of a giant tropical fly, *Pantophthalmus tabaninus* Thunberg. **J. Comp. Physiol. B** 156:461-467.
- BAUGARTNER, O. L. & GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. **Journal of Medical Entomology** 21:105-113, 1984.
- BAUMGARTNER, O. L. & GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. **Journal of Medical Entomology** 21:105-113, 1984.
- BERRIGAN, D & PARTRIDGE, L. Influence of temperature and activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A (1997), pp. 1301–1307
- BOEDDEKER N, EGELHAAF M (2003a) Steering a model fly: simulations on visual pursuit in blowflies. **Proc. R. Soc. Lond. B** 270:1971–1978.
- BORST, A.; HAAG, J. Neural networks in the cockpit of the fly. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, v. 188, n. 6, p. 419–437, 2002.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BUELTHOFF, H.; POGGIO, T.; WEHRHAHN, C. 3-d analysis of the flight trajectories of flies (*drosophila melanogaster*). *Zeitschrift Fur Naturforschung C: Journal of Biosciences*, v. 35, n. 9-10, p. 811–815, 1980.
- BYERS, G. W.. The crane fly genus *Chionea* in North America. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 52:59-195, 1983.

- CALVERT GA Crossmodal processing in the human brain: insights from functional neuroimaging studies. **Cereb. Cortex** 11:1110–1123, 2001.
- CARVALHO, B. J. C.; MELLO-PATIU, A. C. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia** 52(3): 390-406, 2008.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 4th edition, Cambridge, p.770, 1998.
- CHAPPELL, M. A., & K. R. MORGAN. Temperature regulation, endothermy, resting metabolism, and flight energetics of tachinid flies (*Nowickia* sp.). **Physio. Zool.** 60:550-559, 1987.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- COSTA, C.; IDE, S. & SIMONKA, C.E.. **Insetos Imaturos. Metamorfose e Identificação**. Holos Editora, Ribeirão Preto, 249p., 2006.
- CRAVEL, J. D., AND M. F. CLAVEL. Influence de la temperature sur le nombre, le pourcentage d' eclosion et la taille des oeufs fondus par *Drosophila melanosaster*. **Ann. Soc. Entomol. Fr.** 5:161-177, 1969.
- CZAJKA, M., AND R. E. LEE, JR. A rapid COLD-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanosaster*. **J. Exp. Biol.** 148:245-254, 1990.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DICKINSON, M. H.; LEHMANN, F. O.; SANE, S. P. Wing rotation and the aerodynamic basis of insect flight. **Science**, v. 284, n. 5422, p. 1954–1960, 1999.
- EDNEY, E. B., AND R. BARRASS. The body temperature of the tse-tse fly, *Glossina morsitans* Westwood (Diptera, Muscidae). **J. Insect Physiol.** 8:469-481, 1962.
- EGELHAAF, M.; GREWE, J.; KARMEIER, K.; KERN, R.; KURTZ, R.; & WARZECHA, AK. Novel Approaches to Visual Information Processing in Insects: Case Studies on Neuronal Computations in the Blowfly. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.

- ERZINÇLIOĞLU, Y.Z. Immature stages of british *Calliphora* and *Cynomya*, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). **Journal of Natural History**, 19:69-96. 1985.
- ESCH HE, BURNS JM (1996) Distance estimation by foraging honeybees. *J. Exp. Biol.* **199**:155–162.
- ESCH, H.E, ZHANG S, SRINIVASAN MV, TAUTZ J (2001) Honeybee dances communicate distances measured by optic flow. **Nature** **411**:581–583.
- FARIA, L.D.B., ORSI, L., TRINCA, L.A. & GODOY, W.A.C. Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*. **Entomol. Exp. Appl.** 90: 149-155, 1999.
- FERNANDES, N. M. **Acuidade visual e codificação neural da mosca *Chrysomya megacephala***. 102 p. Tese (Doutorado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.
- FRAENKEL, G. & BHASKARAN, G. Pupariation and pupation in Cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. **Ann. ent. Soc. Am.**, Washington, 66(2):418-422, 1973.
- FRYE, M. A. & DICKINSON, M. H. Fly flight: a model for the neural control of complex behavior. **Neuron**, v. 32, n. 3, p. 385–388, 2001.
- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA , G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GABRE, R. M.; F. F. ADHAM & H. CHI.. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologica** 27: 179–183, 2005.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, 119: 263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., REIS S. F., VON ZUBEN, C. J. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. **J. Appl. Entomol.**, 120(4): 423-426, 1996.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M. L., BROWN, W. A., OMORI, A. I. & LAPOINTE, D. A. Preliminary observations of effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga*

- ruficollis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of post mortem interval, **J. Forensic Sci.**, 38: 316-322, 1993.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, L. ; ZUBEN, C. J. V. ; GODOY, W. A. C. . A review of post-feeding larval dispersal in blowflies: implications for forensic entomology.. *Naturwissenschaften*, Alemanha, v. 93, p. 207-215, 2006.
- GOMES, L. **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais.** 523p. Editora: Technical Books, ISBN: 9788561368135, 2010.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GUIDO, R. C.; SLAETS, J.F.W.; KOBERLE, R. ; ALMEIDA, L.O.B.; PEREIRA, J.C.. A new technique to construct a wavelet transform matching a specified signal with applications to digital, real time, spike, and overlap pattern recognition.. **Digital Signal Processing**, San Diego, v. 16, n. 1, p. 24-44, 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HAUSEN, K. Motion sensitive interneurons in the optomotor system of the fly. 2. the horizontal cells - receptive-field organization and response characteristics. **Biological Cybernetics**, v. 46, n. 1, p. 67-79, 1982.
- HEINRICH, B. **THE HOT-BLOODED INSECTS.** CAMBRIDGE, MA: HARVARD UNIVERSITY PRESS, 1993.
- HEINRICH, B. Thermoregulation in endothermic insects. **Science** 185:747-756, 1974.
- HINTON, H.E. CONCEALED PHASES IN THE METAMORPHOSIS OF THE INSECTS. **NATURE**, 157(3991):552-553, 1946.
- HOMBERG, U. Multisensory Processing in the Insect Brain. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience.** Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- HOSGOOD SMW & PARSONS PA. Polymorphism in natural populations of *Drosophila* for the ability to withstand temperature shocks. **Experientia** 24: 727-728, 1968.

- 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: 35-39, 1977.
- ISHIJIMA H. Revision of the third stage larvae of synantropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). **Japan J Sanit Zool** 18: 47-100, 1967.
- KEVAN, P. G.. Heliotropism in some Arctic flowers. **Can. Field Nat.** 86:41-44. 1972.
- KIMURA, M. T. Adaptations to temperate climates and evolution of overwintering strategies in the *Drosophila melanogaster* species group. **Evolution** 42: 1288-1297, 1988.
- KOHSHIMA, S. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. **Nature** 30:225-227, 1984.
- LAND, M. F.; COLLETT, T. S. Chasing behavior of houseflies (*Fannia canicularis*) - description and analysis. **Journal of Comparative Physiology**, v. 89, n. 4, p. 331–357, 1974.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LEVOT, G.W., BROWN, K. R., SHIPP, E. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. **Bull. Entomol. Res.**, 69: 469-475, 1979.
- LIGHTON, J. R. B. (1988) Discontinuous CO2 emission in a small insect, the formicine ants *Camponotus vivinus*. **J. Exp. Boil.** 134:363-376.
- LITTLEWOOD, S. C. Temperature threshold for flight of *Trichocera annulata* (Meigen) (Dipt., Trtchoceridae). **Entomol. Mon. Mag.** 102:15-18, 1966.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MAYNARD SMITH, J. Temperature and rate of aging in poikilotherms. **Nature** 199:400-402, 1963.
- MCALPINE JF, PETERSON BV, SHEWELL GE, TESKEY HJ, VOCKEROTH JR, WOOD DM. **Manual of Nearctic Diptera**, Agriculture Canada, vol. I, Monograph 27, Research Branch, Ottawa, 674 pp, 1981.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARRARO, M.V.; MARTINS, C.; MOREIRA, O.I.; CRUZ, M. & SERAFIN, I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4):793-798, 1996.

- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARRARO, M.V.; MARTINS, C.; MOREIRA, O.I.; CRUZ, M. & SERAFIN, I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4):793-798, 1996.
- MORGAN, K. R., AND B. HEINRICH. Temperature regulation in bee and wasp-mimicking syrphid flies. **J. Exp. Biol.** 133:59-71, 1987.
- MORGAN, K. R., T. E. SHELLY, AND L. S. KIMSEY. Body temperature regulation, energy metabolism, and wing loading in light-seeking and shade-seeking robber flies. **J. Comp. Physiol. B** 151:561-570, 1985.
- MORRISON, W. W., AND R. MILKMAN. Modification of heat resistance in *Drosophila* by selection. **Nature** 273 :49-50, 1978.
- MURPHY, P. A., J. T. GIESEL, AND M. N. MANLOVE. Temperature effects on life history variation in *Drosophila simulans*. **Evolution** 37:1181- 1192, 1983.
- NEUTEL, C. I. & PATTEN, S. B. Risk of suicide attempts after benzodiazepine and/or antidepressant use. **AEP**, 7 (8): 568-574, 1997.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- O'BRIEN, C. & B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense – Quando os insetos são vestígios**. Campinas: Millennium, 2003.
- PARSONS, P. A. Boundary conditions for *Drosophila* resource utilization in temperate regions, especially at low temperatures. **Am. Nat.** 112: 1063-1074, 1978.
- PESSÔA, S. B. & MARTINS A. V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara, 11ª edição, Rio de Janeiro, p. 872, 1988.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.

- PUNT, A., PARSEK, W J, & KUCHLEIN, J (1957). Oxygen uptake in insects with cyclic CO₂ release. **Biol. Bull.** 112: 108-119.
- QUEIROZ, M.M.C.; MELLO, R.P. DE & LIMA, M.M. Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) Reared in the Laboratory. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92:187-196, 1997.
- QUEIROZ, S.M.P. & CARVALHO, C.J.B. DE. Chave pictórica e descrição de larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em Vazadouros de Resíduos Sólidos Domésticos em Curitiba, Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 16(2):265-288, 1987.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W. & FRENCH, K. **Fisiologia animal - mecanismos e adaptações**. Rio de Janeiro. : Guanabara. 2000.
- REIGADA, C.; GODOY, W. A. C. Larval density, temperature and biological aspects of *Chrysomya megacephala* (Díptera: Calliphoridae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 4, p. 562-566, 2006.
- RICHARD, W. & SHEARER, D. **Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance**. London: Springer, 1997.
- ROBERTS, S. P. & HARRISON, J. F. Mechanisms of thermoregulation in flying bees. **Amer. Zool.** 38, 492-502, 1998.
- ROSA, G. S., CARVALHO, L. R., REIS, S. F., GODOY, W. A. C. The Dynamics of Intraguild Predation in *Chrysomya albiceps* Wied. (Diptera: Calliphoridae): Interactions between Instars and Species under Different Abundances of Food. **Neot. Ent.** 35: 775-780, 2006.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- SADLER, D. W., FUKU, C., COURTE, F. & POUDEK, D, J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Sci. Int**, 71: 191-197, 1995.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481–485, 1997.
- SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal. adaptação e meio ambiente** - 5.ed. São Paulo : Livraria Santos. 2002.
- SCHNEBEL, E. M., AND J. GROSSFIELD. Mating-temperature range in *Drosophila*. **Evolution** 38: 1296-1307, 1984.
- SLANSKY, JR. F. & M. SCRIBER. **Food consumption and utilization**, 87-163. In: M.G.A. Kerkut & L.J. Gilbert Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 162p, 1985.

- SRINIVASAN MV, ZHANG S, ALTWEIN M, TAUTZ J (2000) Honeybee navigation: nature and calibration of the “odometer.” **Science** 287:851–853.
- STAVENGA, D.G. Modern Optical Tools for Studying Insect Eyes. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- STEVENINCK, R. R. V. ; LEWEN, G D ; STRONG, S. P. ; KOBERLE, R. ; BIALEK, W. . Reproducibility and variability in neural spike trains. . **Science**, Estados Unidos, v. 275, p. 1805-1807, 1997.
- STONEHOUSE, J., MUMFORD, J., POSWAL, A. MAHMOOD, R., MAKHDUM, A. H., CHAUDHARY, Z. M., BALOCH, K. N., MUSTAFA, G. & MCALLISTER, M. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: tephritidae). **Crop Protection**, 23: 293–296, 2004.
- STRONG, S. P. ; KOBERLE, R. ; STEVENINCK, R. R. V. ; BIALEK, W. . Entropy and Information in Neural Spike Trains. **Physical Review Letters**, Estados Unidos, v. 80, p. 197-200, 1998.
- SUKONTASON KL, CHAIWONG T, PIANGJAI S, UPAKUT S, MOOPHAYAK K, SUKONTASON K. OMMATIDIA of blow fly, house fly, and flesh fly: implication of their vision efficiency. **Parasitol Res**; 103(1): 123-31, 2008.
- SULAIMAN, S.; SOHADI, A.R. & JEFFERY, J. Human helminth parasite burdens on cyclorrhaphan flies (Diptera) trapped at an aboriginal settlement in Malaysian. **Bulletin of Entomological Research**, 79(4):625-629, 1989.
- SULAIMAN, S.; SOHADI, A.R.; YUNUS, H. & IBERAHIM, R. 1988. The role of some cyclorrhaphan flies as carriers of human helminthes in Malaysian. **Medical and Veterinary Entomology**, 2(1):1-6, 1988.
- TRIPLEHORN, C. A. & JOHNSON, N. F. **Estudo dos Insetos**. Editora: Cengage Learning. 808p. 2011.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.
- VÉLEZ, M.C. & WOLF, M. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 48:41-47, 2008.
- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)**. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.

- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WAGNER H Flight performance and visual control of the flight of the free-flying housefly (*Musca domestica*). II. Pursuit of targets. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B** 312:553–579, 1986.
- WAGNER, H. **Aspects of the free flight behaviour of houseflies (*Musca domestica*)**. In: GEWECKE, M.; WENDLER, G. (Ed.). Insect locomotion. Berlin, Hamburg: Paul Parey, p. 223–232, 1985.
- WEHRHAHN, C.; POGGIO, T.; BULTHOFF, H. Tracking and chasing in houseflies (*Musca*) - an analysis of 3-d flight trajectories. **Biological Cybernetics**, v. 45, n. 2, p. 123–130, 1982.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WELLS, J.D. & KURAHASHI, H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera:Calliphoridae) development: Rate, variation, and the implications for forensic entomology. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, 45(4):303-309, 1994.
- WELLS, J.D. & KURAHASHI, H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera:Calliphoridae) development: Rate, variation, and the implications for forensic entomology. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, 45(4):303-309, 1994.
- Williams KA, Villet MH. "A new and earlier record of *Chrysomya megacephala* in South Africa, with notes on another exotic species, *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae)", 2006.
- YURKIEWICZ W. J. & SMITH T., JR. Effects of temperature on oxygen consumption and fuel utilization by the sheep blowfly. **J. Insect. Physiol.** 12, 403-408, 1966.
- ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 267 p, 1965.

CAPITULO 2

ESTUDO DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (F.) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) NAS DIFERENTES FASES DE SEU CICLO DE VIDA E SOB INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS (FOTOPERÍODO E DROGAS)

RESUMO

Chrysomya megacephala (Fabricius) é um inseto com desenvolvimento holometábolo que apresenta alterações anatômicas e fisiológicas nos diferentes estágios da sua vida. As alterações no metabolismo energético nunca tinham sido avaliadas nesse díptero. O objetivo deste trabalho foi descrever e avaliar as alterações no consumo de oxigênio ao longo da vida desse inseto, além de alterações que poderiam ocorrer quando houvesse a presença de substâncias químicas, diferentes fotoperíodos e dois diferentes tipos de substrato alimentar. Os perfis da taxa metabólica durante as fases do desenvolvimento foram bastante distintos quando se compara ovo, larva, pupa e adulto. O maior consumo de O₂ foi observado no estágio larval, o qual é o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares em moscas-varejeiras, sendo que a competição por esses recursos é geralmente do tipo exploratória nesses dípteros. Em relação aos tratamentos analisados, foram observadas alterações na massa e nas taxas metabólicas nas diferentes fases da vida desse inseto, quando ocorria a presença de substâncias químicas, alterações no fotoperíodo e no substrato alimentar.

Palavras chave: Moscas-varejeiras, metabolismo energético, entomologia forense, fotoperíodo, drogas.

INTRODUÇÃO

As moscas em geral são insetos com desenvolvimento holometábolo, apresentando quatro estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e imago (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011). A fase larval é dividida em três ínstares, os quais podem ser distinguidos por mudanças morfofisiológicas presentes em cada estágio do desenvolvimento desse inseto (HINTON, 1946; FRAENKEL & BHASKARAN, 1973; MCALPINE *et al.*, 1981; ERZINÇLIOĞLU, 1985; QUEIROZ *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2006).

A mosca-varejeira *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) apresenta grande diversidade ecológica (ZUMPT, 1965; IMBIRIBA *et al.*, 1977; GUIMARÃES *et al.*, 1978) e tem grande importância médico-sanitária (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983; FURLANETTO *et al.* 1984), além de ser de fundamental importância em entomologia forense (WELLS & GREENBERG, 1992; VON ZUBEN *et al.*, 1996; GOMES, 2010).

O estágio larval de *C. megacephala* é associado ao processo de decomposição de matéria orgânica de origem animal (ZUMPT, 1965; NUORTEVA, 1977; GUIMARÃES *et al.*, 1978; BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984; HANSKI, 1987; PESCHKE *et al.*, 1987), e a qualidade

nutricional desse substrato alimentar pode alterar o desenvolvimento larval de moscas-varejeiras, retardando ou acelerando o mesmo, como observado em *Calliphora vomitoria* por IRELAND & TURNER(2006) e em *C. megacephala* por MENDONÇA *et al.* (2009) e PIRES *et al.* (2009).

WIJESUNDARA (1957) foi um dos pioneiros a estudar a duração de estágios imaturos em moscas-varejeiras, especificamente analisando aspectos da biologia larval de *C. megacephala*. LEVOT *et al.* (1979) estudaram a habilidade competitiva investigando algumas características das curvas de crescimento larval, comparando sete espécies de Calliphoridae e uma de Sarcophagidae, e concluíram que *C. megacephala* tem uma das mais altas taxas de assimilação de nutrientes, e foi uma das melhor adaptadas para a pupação com pesos larvais baixos.

Chrysomya megacephala apresenta uma grande importância nos estudos forenses, por ser uma das espécies que primeiro chega aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978; LOPES DE CARVALHO & LINHARES, 2001) e também por utilizá-lo como alimento durante seu estágio larval, possibilitando a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em humanos, que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo, dado de extrema importância nas investigações criminais (SMITH, 1986).

No entanto, o desenvolvimento dos insetos pode ser afetado por diversos fatores bióticos e abióticos no ambiente, alterando o intervalo de duração de cada estágio de desenvolvimento, taxas de fertilidade, sobrevivência, comportamento, etc. Alguns trabalhos procuraram avaliar o efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de alguns insetos, principalmente na alteração do fenômeno da diapausa (TAUBER & KYRIACOU, 2001; SAUNDERS, 2002). No entanto, o principal fator abiótico que vem sendo muito estudado no desenvolvimento de *C. megacephala* é a influência da temperatura (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 1996; FENG, *et al.* 2002a, 2002b; REIGADA & GODOY, 2006; VÉLEZ & WOLFF, 2008), a qual altera drasticamente o tempo de duração dos diferentes estágios larvais, influenciando diretamente nas estimativas dos estudos forenses.

Na ciência forense, além das alterações de temperatura do próprio ambiente, casos de mortes de pessoas por utilização de drogas lícitas ou não, direta ou indiretamente (CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994; ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003) têm dificultado a investigação por parte dos peritos, devido à ação destas drogas na decomposição do corpo e no ritmo de desenvolvimento de larvas de insetos necrófagos

(CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; SADLER *et al.*, 1997; BOUREL *et al.*, 2001; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004).

Suicídios, mortes ou mudanças de comportamento em usuários de benzodiazepínicos (entre eles Diazepam) ou antidepressivos (entre eles Citalopram), têm sido observados em vários estudos (SZARA & LUDFORD, 1980; HALL & ZISOOK, 1981; GARDNER & COWDRY, 1985; DIETCH & JENNINGS 1988; WOODS, *et al.*, 1992; LESTER, 1995; BOND, 1998; BERMAN *et al.* 2005; GOMES, 2006).

Dentre os benzodiazepínicos, PIEN *et al.* (2004) observaram mudanças na morfologia de larvas e pupas e na taxas de desenvolvimento larval em *Calliphora vicina*, utilizando a substância *nordiazepam*. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que Diazepam acelera o desenvolvimento larval em *C. albiceps* e *C. putoria* e GOMES (2006) observou um retardo no tempo de desenvolvimento larval de *C. megacephala* na presença de Diazepam. A estimativa do IPM constitui-se em um dos aspectos mais importantes em estudos de medicina legal (SMITH, 1986), sendo que a não consideração de fatores abióticos e bióticos poderia prejudicar seriamente esta estimativa.

Resumidamente, diversos trabalhos já foram realizados observando detalhes nas diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, como por exemplo: estudos de morfologia larval (ISHIJIMA, 1967; QUEIROZ & CARVALHO, 1987), avaliação de taxas de incremento de massa durante desenvolvimento sobre influência de alterações na temperatura (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 1996; VÉLEZ & WOLFF, 2008), tabelas de vida e duração dos diferentes estágios (WELLS & KURAHASHI, 1994; GABRE *et al.*, 2005), influência de substâncias químicas na taxa de incremento de massa durante o desenvolvimento (CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; BOUREL *et al.*, 2001; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997), influência da densidade/competição/predação durante o desenvolvimento larval (VON ZUBEN, 1995; ROSA *et al.*, 2006), processos de dispersão larval pós-alimentar (GOMES *et al.*, 2006), dentre outros.

Como se pode perceber, a maior parte dos trabalhos envolve aspectos morfológicos, biológicos ou ecológicos de diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, e poucos trabalhos procuram compreender alguns aspectos fisiológicos, como o metabolismo energético de *C. megacephala*. A compreensão de aspectos da fisiologia da espécie seria de extrema importância, podendo servir de embasamento para outras investigações que vierem a utilizar este díptero como sistema modelo. O estudo do metabolismo energético dessa espécie poderia auxiliar na compreensão dos processos e das fases da vida em que estes animais

sofrem maiores alterações fisiológicas, informação esta, que pode ser útil no controle desta espécie praga, na compreensão e previsão de fatores envolvidos com a parte forense, e também informações que poderiam contribuir na compreensão de aspectos da biologia e fisiologia dessa espécie.

Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos do metabolismo energético de *C. megacephala*, sendo que o metabolismo energético representa a soma de todas as reações químicas que estão ocorrendo no corpo do animal em um determinado período. Assim sendo, diversos fatores agem de forma sinérgica e podem alterar o metabolismo de um animal em estudo (RANDALL *et al.*, 2000). Desta forma, o presente estudo testou a influência de diferentes tratamentos (Substratos alimentares / presença de drogas / alterações no fotoperíodo sobre o metabolismo energético) nas diferentes fases da vida de *C. megacephala*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a 27 ± 1 °C, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento proteico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para oviposição das fêmeas fecundadas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F₁. Somente a geração F₂ foi utilizada nos experimentos, por ser progênie de uma que teve todo o seu desenvolvimento sob condições experimentais.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval, nas diferentes metodologias e tratamentos, foram utilizados: meio artificial à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982) e carne bovina moída, objetivando uma comparação com os resultados obtidos na dieta oligídica.

Em alguns tratamentos houve a presença de substâncias químicas (ansiolítico [Diazepam] e antidepressivo [Citalopram]), com o intuito de posterior aplicação forense; foram também considerados tratamentos com alterações no fotoperíodo (fotoperíodos de 0h, 12h e 24h).

As substâncias químicas que foram utilizadas têm atuação no sistema nervoso. Utilizou-se Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ[®] 5mg - comprimidos – Novaquímica Laboratórios S/A) e Citalopram (comprimidos de 20mg – Alcytam[®], laboratório Torrent). Cabe aqui mais uma vez salientar que estudos sobre o efeito dessas substâncias em insetos são escassos.

Todos os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos na presença de drogas tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento larval de moscas-varejeiras.

No caso do ansiolítico (Diazepam), foi colocada na dieta artificial a DL50 (intravenosa) de coelho, ou seja, 9 mg/Kg [73,6mg de Diazepam em 125g de dieta] (NIOSH, 2004), e no caso do antidepressivo Citalopram, foi utilizada a dose de 18mg/kg [8,3mg de Diazepam em 125g de dieta], observada em casos de overdoses em humanos (WORM *et al.*, 1998; JONASSON & SALDEEN, 2002).

Foi utilizada apenas uma dosagem (letal) de cada uma das drogas na dieta artificial, sendo que ao controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

Início dos experimentos e de aplicação das metodologias

Os ovos foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os mesmos foram separados e iniciou-se a aquisição de dados para a avaliação do metabolismo energético.

Metabolismo energético

O estudo do metabolismo energético foi realizado por meio de um sistema automatizado de respirometria intermitentemente fechada, utilizando-se taxas de consumo de oxigênio (VO₂) de todos os estágios do desenvolvimento de *C. megacephala*, ou seja, ovo, larva, pupa e adulto. Cada estágio do desenvolvimento foi acondicionado em seringas hermeticamente fechadas e de volume adequado ao seu tamanho e número de indivíduos (5-15mL). Foram realizadas pelo menos três repetições para cada tratamento, nas diferentes fases da vida.

A massa de cada indivíduo no respectivo estágio do desenvolvimento e o conjunto (seringa mais substratos e indivíduo do estágio) foi obtida em intervalos de tempo desde o início até o final do intervalo de experimentação, em cada tratamento, valores estes

necessários para avaliação de alterações na porcentagem de O₂ e possíveis correlações com os dados que foram obtidos de VO₂.

Utilizou-se o programa DATACAN V (Sable Systems), um controlador múltiplo de fluxo (Multiplexer TR-RM8, Sable Systems), o qual foi programado para intercalar períodos de 90 minutos, nos quais as câmaras eram ventiladas com ar exterior, de forma a renovar o ar contido nos respirômetros (fase aberta), com períodos de 15 minutos [ovo, larva e adulto] e 20 minutos [pupa] (fase fechada), na qual o ar contido nos respirômetros era reciclado através de um analisador de oxigênio (Sable Systems, PA-1B). O fluxo de ar nas seringas foi de 50ml/min.

A queda na concentração fracional de O₂ registrada durante a fase fechada foi utilizada para o cálculo do VO₂. Deste modo, o sistema permitiu que fosse coletada uma medição de VO₂ para cada seringa em diferentes intervalos de tempo, dependendo da fase de desenvolvimento (ovo – 1h, larva – 1,5h, pupa – 1,67h e adulto 1,25h). A queda na concentração de O₂ foi, via de regra, linear e a inclinação da regressão foi utilizada para o cálculo do VO₂ (taxa de aquisição de dados de um Hertz). Em geral, o r² obtido foi superior a 0,8.

Foram realizados três grupos de tratamentos:

1. efeito de substâncias químicas (Controle-Dieta(**CD**), Citalopram(**Cit**) e Diazepam(**Diaz**));
2. efeito de fotoperíodo (Controle-Dieta-12h de fotoperíodo(**CD**), Claro-24h de fotoperíodo(**Cla**) e Escuro-0h de fotoperíodo(**Esc**));
3. efeito de substrato alimentar (Controle-Dieta(**CD**) e Controle-Carne(**CC**)).

Alguns detalhes dos materiais e métodos foram distintos para cada estágio do desenvolvimento.

Estágios do desenvolvimento de *C. megacephala*.

Ovo: período de desenvolvimento embrionário.

Os ovos foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os ovos foram separados, as massas dos mesmos foram pesadas e colocadas em seringas de 5mL juntamente com 1 grama de dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982), o que impediu a desidratação dos ovos durante o período, até a eclosão das larvas. O conjunto de ovos em cada seringa tinha uma massa média de 0,0347±0,003g.

Foram utilizadas sete seringas, sendo que em seis delas foi obtido o consumo de oxigênio de massas de ovos/dieta, e em uma delas, obtido apenas o consumo com dieta oligídica sem a presença de ovos. Todo o experimento metabólico foi realizado dentro de uma BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 12 horas).

A taxa metabólica dos ovos foi analisada por um período de pelo menos 11 horas, após o qual as larvas de primeiro ínstar já começaram a eclodir dentro das seringas. A partir deste momento, foram montadas densidades larvais para início da aquisição de dados do VO_2 do estágio larval.

Larva: período de desenvolvimento pós-embrionário.

Após a eclosão das larvas, as mesmas foram pesadas e separadas em grupos de 20 indivíduos, colocadas em contato com 4 gramas do substrato alimentar e acondicionadas em 15mL de seringa, mantidas dentro de uma BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60\pm 10\%$), de acordo com cada tratamento:

1. **Controle - Dieta** – 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Diazepam** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas + 73,6mg de Diazepam.
3. **Citalopram** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas + 8,3mg Citalopram.
4. **Claro** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
5. **Escuro** - 20 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.
6. **Dieta** – 0 larvas + 4g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
7. **Controle - Carne** - 20 larvas + 4g carne bovina moída - fotoperíodo de 12 horas

Os tratamentos com fotoperíodo de 12h e sem a presença de drogas foram chamados de controle, os quais foram utilizados como modelos de comparação entre os tratamentos, pois não sofreram influência de variação no fotoperíodo e da presença de drogas. Foram dois controles realizados, um com carne bovina moída e outro com dieta (LEAL *et al.*, 1982).

Além da obtenção dos dados de VO_2 , foi realizada a coleta de dados de incremento de massa durante o desenvolvimento larval nos tratamentos citados anteriormente, tendo sido coletados valores de massa das larvas em intervalos de 12 horas, até que se completasse o desenvolvimento larval e as mesmas procurassem um local para pupação, sendo que a primeira pesagem considerou larvas recém-eclodidas. Com estes dados, foi possível gerar curvas de desenvolvimento larval por meio dos valores de massa para poder correlacionar com os dados de VO_2 que foram calculados posteriormente.

Em intervalos de 12 horas, a massa foi individualmente registrada para uma amostra aleatória de 10 larvas de cada recipiente, que foram lavadas e secadas antes da pesagem. Após

a pesagem e possível identificação do ínstar larval, as larvas tiveram que ser devolvidas às respectivas seringas, pois caso fossem retiradas, a variação na densidade larval (competição intraespecífica) seria muito grande, e poderia causar uma resposta na taxa de desenvolvimento larval, como observado por VON ZUBEN (1995) e IRELAND & TURNER (2006), o que dificultaria a análise dos dados sob a influência dos tratamentos.

A taxa metabólica das larvas foi analisada por um período de pelo menos 4-5 dias (120 horas) dependendo do tratamento, momento em que algumas pupas já podiam ser observadas dentro da seringa.

Pupa: período de desenvolvimento pós-embrionário.

As pupas obtidas em cada uma das seringas foram coletadas e agrupadas em 5 indivíduos, os quais foram acondicionados em seringas de 15mL e mantidos dentro de uma BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60\pm 10\%$) de acordo com cada tratamento descrito anteriormente, porém sem a presença de substratos alimentares. Durante o intervalo de aproximadamente 80 horas, foi feita a aquisição da variação de O_2 , para posterior obtenção do VO_2 para cada tratamento. Na medida em que houve a emergência dos adultos, os mesmos foram separados e acondicionados em frascos de acordo com o tratamento e mantidos em BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60\pm 10\%$), para posterior obtenção das taxas metabólicas deste estágio de vida.

Adulto: período de desenvolvimento pós-embrionário

Os adultos obtidos foram separados de acordo com o sexo e acondicionados em seringas de 15mL, dois indivíduos por seringa, de acordo com os tratamentos descritos anteriormente. Realizaram-se medidas pontuais com pelo menos três repetições, nos seguintes intervalos de vida deste estágio: recém-emergidos (1-3 dias); 7 dias; 15 dias e 30 dias de vida. Em cada uma das medidas temporais, os adultos foram aclimatados por 30min na BOD Eletrolab[®] (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60\pm 10\%$) antes de se iniciar a coleta da variação de O_2 em respirometria fechada. Mediu-se esta variação tanto na presença como na ausência de luz, para posterior avaliação de alterações na atividade e consumo de O_2 , ou seja, a presença da luz permitiu a medição de um metabolismo de atividade espontânea, e na ausência da luz, foi obtido o metabolismo de repouso. A diferença entre o metabolismo de atividade espontânea e de repouso foi definida como escopo metabólico.

Taxas de mortalidade foram obtidas nos mesmos dias de coletas de dados do metabolismo (1; 7 dias; 15 dias e 30 dias de vida), sendo realizadas três repetições para cada

tratamento, considerando gaiolas com 25 machos e 25 fêmeas mantidos por toda a sequência de experimentação.

Análise estatística

A análise estatística dos dados de massa coletados no desenvolvimento larval desta mosca foi feita no programa SAS[®]. Análise de variância fatorial (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Bonferroni foram utilizados, comparando as médias de massa dos indivíduos nos diferentes tratamentos realizados. A variável dependente massa foi utilizada nas comparações entre os tratamentos, repetições, tempo e suas interações.

Como houve diferença significativa de massa entre os tratamentos, optou-se por utilizar o metabolismo específico, ou seja, foi dividida a taxa metabólica absoluta ($\mu\text{LO}_2/\text{segundo}$) pela massa (mg) de cada grupo de indivíduos analisado, em cada fase do desenvolvimento. A análise da taxa metabólica para diferentes espécies tem atraído considerável atenção desde KLEIBER (1932), e grande parte dos estudos focou na alometria do tamanho do corpo e da taxa metabólica de repouso (KLEIBER 1932; KITTEL 1937; HEMMINGSEN 1960; BARTHOLOMEW & CASEY, 1978; COELHO & MOORE, 1989; ATANASOV, 2005). Outros estudos mais recentes procuraram analisar a independência da massa em relação à taxa metabólica, sendo que as diferenças na taxa metabólica de repouso permanecem mesmo após a eliminação da influência da massa (DAAN, *et al.*, 1990; KONARZEWSKI & DIAMOND, 1995; VINOGRADOV, 1995). REINHOLD (1999) analisou estas influências para diferentes espécies de insetos, observando independência ou dependência da massa em relação à taxa metabólica em algumas espécies, dependendo do comportamento e da taxa de metabolismo durante atividade. Como o presente trabalho analisou o efeito de diferentes tratamentos nas distintas fases do desenvolvimento de uma espécie, optou-se por utilizar a taxa metabólica específica para comparação entre os tratamentos.

Após o cálculo do metabolismo específico de cada fase e tratamento, foi feita a comparação por meio de análise de variância fatorial (ANOVA) e utilizou-se também teste de comparação múltipla de Bonferroni. Foi utilizado como variável dependente, o metabolismo específico, nas comparações entre os tratamentos, repetições, tempo e suas interações.

Em todos os testes utilizou-se nível global de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada variação na porcentagem de O₂ nas seringas apenas com substrato alimentar e sem a presença de larvas, e desta forma, estas foram desconsiderados da análise geral.

A análise dos dados coletados foi realizada de acordo com os diferentes estágios da vida de *C. megacephala*: ovo, larva, pupa e adulto.

Estágio de ovo

A massa de ovos obtida e utilizada nas seringas para obtenção da amostragem do consumo de O₂ tinha uma média de 34,7±0,3mg. Na Figura 1, é possível visualizar a variação na média da VO₂ durante o intervalo de tempo, até a eclosão das larvas.

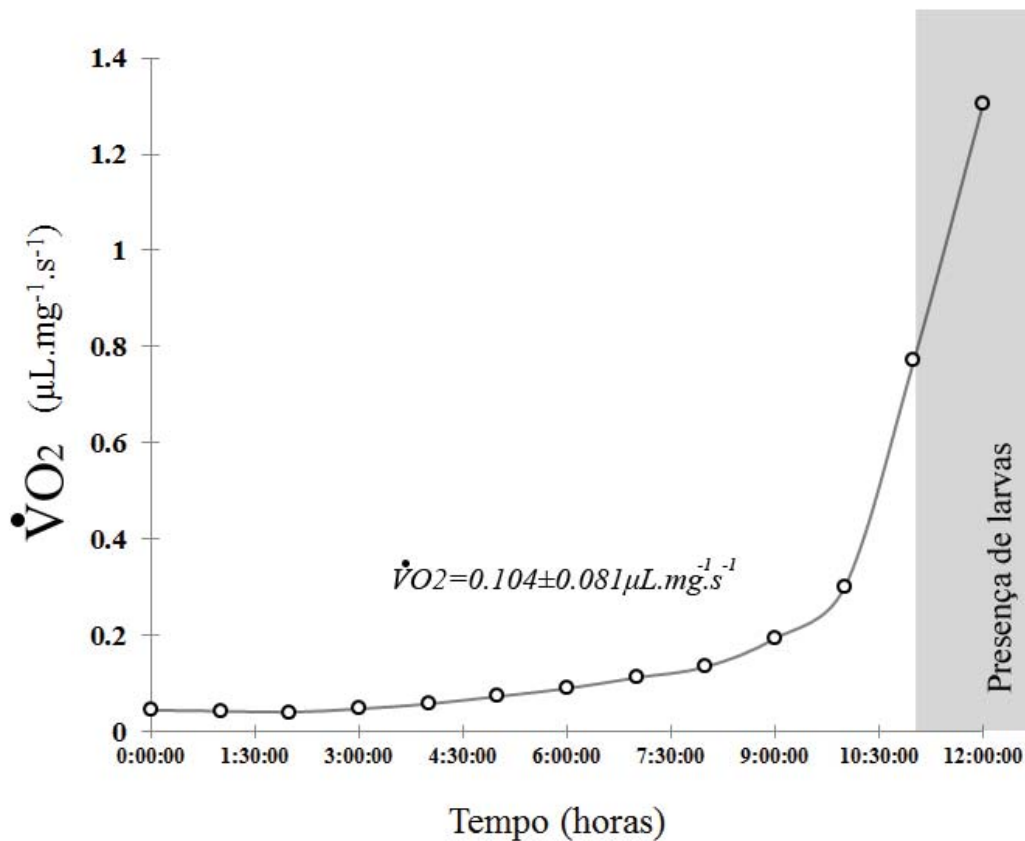


Figura 1. Gráfico mostrando a média ($n=5$ amostras em cada intervalo de hora) na VO₂ ao longo do tempo durante o estágio de ovo de *C. megacephala*.

O aumento no consumo do oxigênio durante este período se deve ao período de desenvolvimento embrionário, no qual diversas mudanças morfológicas e fisiológicas ocorrem em um pequeno intervalo de tempo. O período de eclosão das larvas a 27 °C foi em média de 11 horas, metade do tempo observado a 26 °C por GABRE *et al.* (2005) . Como se

pode observar na Figura 1, o metabolismo praticamente dobrou após o início da eclosão das larvas, tendo em vista a grande atividade que estas últimas possuem logo após a eclosão a partir dos ovos, pois se utilizam de substratos discretos e efêmeros para alimentação (HANSKI, 1987; PESCHKE *et al.*, 1987). Nesse período da vida, ocorre limitação de recursos alimentares e a competição pelos recursos é, geralmente, do tipo exploratória (REIS *et al.*, 1994), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT, 1950). Desta forma, é de se esperar que o consumo de energia do estágio larval seja bastante alto comparado com o estágio de ovo.

Não foi observada diferença no metabolismo dos ovos sob a influência dos diferentes tratamentos considerados, tendo em vista que o contato com as substâncias químicas e alteração no fotoperíodo é curto e provavelmente não permitiu alterações metabólicas, além do fato que o envoltório do ovo exerce uma boa proteção contra determinados efeitos e estresses do ambiente.

Estágio larval

A análise do desenvolvimento larval nos diferentes tratamentos mostrou diferenças estatísticas significativas entre a média das massas obtidas em *C. megacephala*, nos três conjuntos de tratamentos realizados:

- **tratamentos com presença de drogas**(CD, Cit e Diaz):tratamentos (F=418,89; p<0,0001), tempo (F=4307,41; p<0,0001); tratamento x tempo (F=19,00; p<0,0001);

- **tratamentos com alterações no fotoperíodo**(CD, Cla e Esc):(F=247,0; p<0,0001), tempo (F=4339,4; p<0,0001); tratamento x tempo (F=26,7; p<0,0001);

- **tratamentos desenvolvidos em diferentes substratos alimentares**(CD e CC):(F=867,15; p<0,0001), tempo (F=2602,54; p<0,0001); tratamento x tempo (F=49.06; p<0,0001);

Na Figura 2 e Tabela 1, pode-se observar o ganho de massa nos diferentes tratamentos no decorrer do tempo.

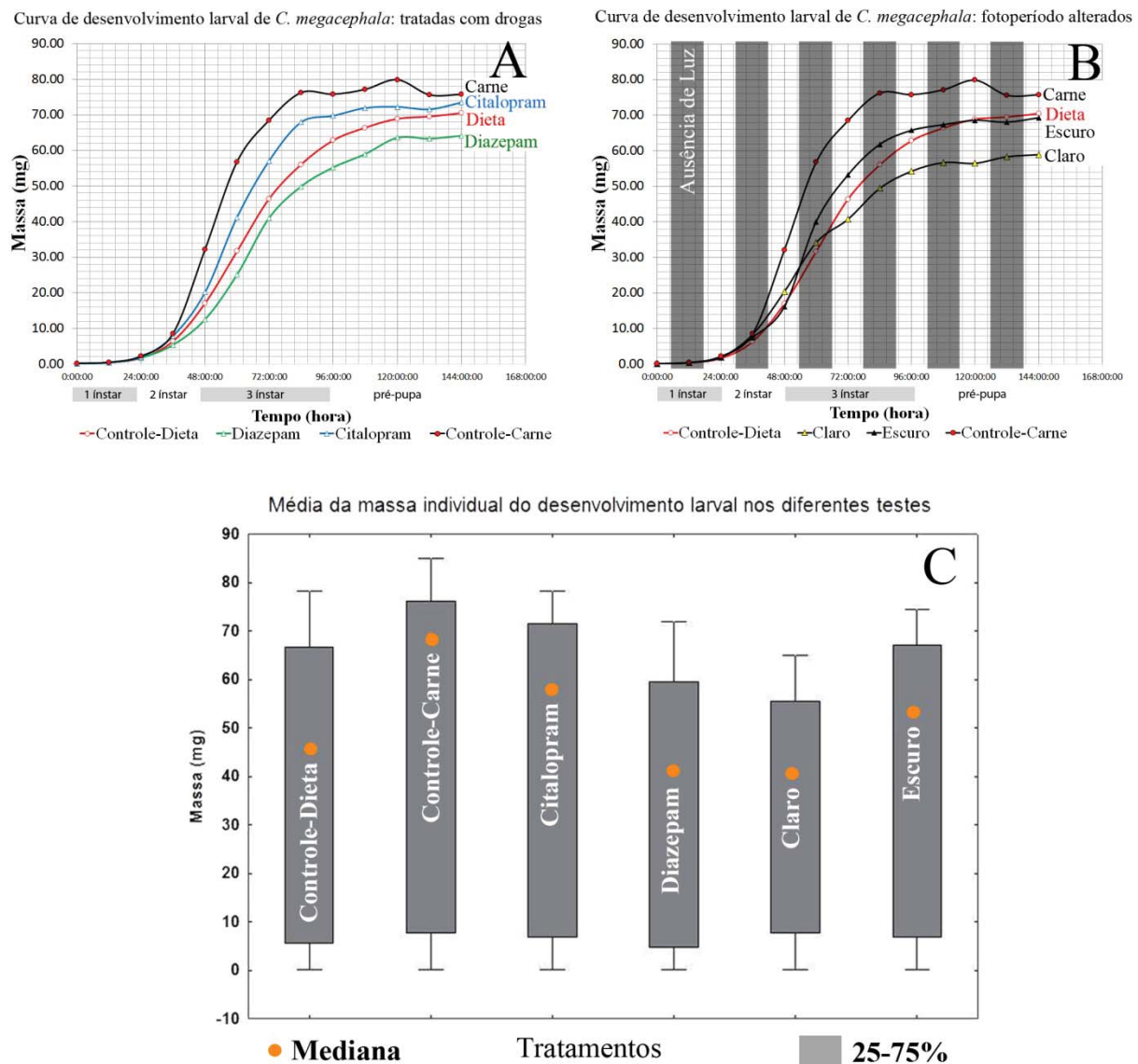


FIGURA 2. Gráficos das curvas de desenvolvimento larval (massa x tempo) de *C. megacephala* nos diferentes tratamentos e substratos (controles [Dieta e Carne]). **2A:** Tratamentos com presença de drogas; **2B:** tratamentos com alterações no fotoperíodo; **2C:** Distribuição da amostragem de massa durante todo o desenvolvimento e mediana de cada tratamento (círculo laranja).

Quando se observa o efeito do substrato alimentar sobre o ganho de massa, as larvas desenvolveram-se mais rapidamente em carne (CC) do que em todos os outros tratamentos, sendo que a massa média foi bem maior que o controle em dieta (Figura 2C e Tabela 1). Essa diferença pode ser explicada pela qualidade nutricional e pela sensibilidade da população de larvas à dieta artificial, quando se compara a carne com a dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982). Vários estudos observaram alterações no desenvolvimento em diferentes substratos alimentares, como por exemplo, o de IRELAND & TURNER (2006) com *Calliphora vomitoria* e o de KANESHRAJAH & TURNER (2004) com *Calliphora vicina*, nos quais diferentes grupos de larvas foram tratados com diferentes tecidos (cérebro, músculo, pulmão, fígado) de porcos, e

estes grupos tiveram diferenças no tempo de desenvolvimento larval entre os diferentes tratamentos, o que também foi observado em *Lucilia sericata* por CLARK *et al.* (2006).

TABELA 1. Média e desvio padrão da massa individual (mg) de 20 indivíduos pesados nos diferentes tratamentos por intervalo de tempo utilizado (12 horas); as cores mostram diferenças significativas entre os tratamentos e o controle CD, e as linhas em cada tratamento mostram diferenças significativas entre as horas de desenvolvimento dentro de cada tratamento. **A:** Diferenças entre controle dieta e os tratamentos com alterações de fotoperíodo; **B:** Diferenças entre controle dieta e os tratamentos com presença de drogas; **C:** Diferenças entre controle dieta e controle carne.

Tempo (horas)	A			B			C		
	Controle Dieta	Claro	Escuro	Controle Dieta	Citalopram	Diazepam	Controle Dieta	Controle Carne	
0									0
12	0.14±0.05	0.15±0.05	0.15±0.05	0.14±0.05	0.14±0.05	0.14±0.05	0.14±0.05	0.17±0.05	12
24	0.43±0.09	0.45±0.13	0.38±0.12	0.43±0.09	0.39±0.12	0.34±0.10	0.43±0.09	0.475±0.13	24
36	1.65±0.24	1.98±0.32	1.91±0.39	1.65±0.24	1.96±0.33	1.75±0.37	1.65±0.24	2.2±0.28	36
48	6.37±1.08	8.37±0.93	7.56±0.9	6.37±1.08	7.86±1.17	5.36±1.05	6.37±1.08	8.54±1.02	48
60	17.03±1.71	20.43±3.03	16.23±1.61	17.03±1.71	20.12±1.67	12.53±1.58	17.03±1.71	27.40±8.89	60
72	31.67±5.76	34.21±3.17	40.10±1.41	31.67±5.76	41.24±3.43	25.11±2.81	31.67±5.76	56.32±8.86	72
84	46.41±4.91	40.78±3.88	53.26±3.48	46.41±4.91	51.07±4.10	41.04±5.15	46.41±4.91	68.49±3.92	84
96	56.07±5.13	49.46±4.19	61.83±7.23	56.07±5.13	63.93±4.26	49.89±4.86	56.07±5.13	76.25±5.58	96
108	62.82±5.50	54.27±5.13	65.79±2.04	62.82±5.50	6974±2.16	55.24±5.38	62.82±5.50	75.82±4.94	108
120	65.9±5.92	56.69±4.10	67.36±2.75	65.9±5.92	71.93±1.78	58.99±2.97	65.9±5.92	77.18±4.51	120
132	68.89±4.15	56.51±4.00	68.60±2.94	68.89±4.15	72.25±4.62	63.58±3.10	68.89±4.15	79.89±3.51	132
144	69.52±2.52	58.34±3.00	68.09±2.08	69.52±2.52	71.55±3.79	63.31±4.76	69.52±2.52	75.64±3.26	144
144	70.49±3.60	58.93±3.50	69.32±2.27	70.49±3.60	73.47±4.13	64.13±4.44	70.49±3.60	75.75±3.32	144

O tempo médio de duração do desenvolvimento larval de *C. megacephala* no presente trabalho foi de aproximadamente 144h, um tempo muito maior que o observado por Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010), de aproximadamente 98h para formação da pupa. No entanto, vale ressaltar que o presente experimento utilizou densidade de apenas 20 indivíduos, ou seja, pouca agregação devido à baixa densidade de indivíduos acabou resultando no desenvolvimento larval retardado, sendo que tal relação é conhecida em Ecologia de Populações como Efeito de Allee (BERRYMAN, 1999). Assim, essas variações no tempo de desenvolvimento dos tratamentos se devem provavelmente a diferenças físicas e nutricionais entre os tratamentos e, à densidade de indivíduos utilizada (VON ZUBEN, 1995; IRELAND & TURNER, 2006).

Na Figura 2A e Tabela 1A, pode-se visualizar o efeito das drogas no desenvolvimento larval de *C. megacephala*: o tratamento com Citalopram acelerou o desenvolvimento larval e aquele com Diazepam, retardou o desenvolvimento, quando comparado ao tratamento Controle-Dieta, nas dosagens utilizadas. Esta diferença pode ser explicada provavelmente pelo efeito já descrito destas substâncias sobre o sistema nervoso em humanos, com o antidepressivo aumentando os impulsos neurais e o ansiolítico retardando os mesmos (GOODMAN & GILMAN, 2003; MCELROY *et.al*, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004).

No desenvolvimento com Diazepam, ficou evidente também o comportamento dinâmico do aglomerado larval, sendo que a atividade de movimentação das larvas era muito menor que aquela das larvas que se alimentavam do substrato controle. O efeito de Diazepam já foi estudado em dípteros, sendo que GOMES (2006) observou que este ansiolítico causou um retardo no desenvolvimento larval de *C. megacephala*. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que em *C. albiceps* e *C. putoria*, houve uma aceleração no desenvolvimento larval quando em contato com o Diazepam, porém considerando diferentes dosagens do que no presente trabalho.

No caso da alteração do fotoperíodo, o efeito da presença/ausência da luz alterou o ganho de massa (Tabela 1B), comparando-se com o tratamento Dieta. A presença de luz durante todo o desenvolvimento larval retardou o ganho de massa de forma bastante evidente, como pode se observar na Figura 2B e Tabela 1B, principalmente após as 48h de desenvolvimento, talvez por efeito da maior atividade dinâmica do aglomerado larval nos recipientes (observada durante as pesagens), e consequentemente gasto energético das larvas quando comparado com os outros tratamentos (CD e Esc). As larvas, na ausência de luz, aceleraram o ganho de massa por tempo durante o intervalo de 48h a 108h em relação à CD, provavelmente pela menor movimentação das larvas durante o desenvolvimento. A presença de luz altera a atividade das larvas, como já observado por (EVANS, 1936; SMITH *et al.*, 1981; RICHARDS *et al.*, 1986), pois as larvas respondem à fonte de luz, sendo atraídas ou repelidas, o que poderia responder pela diferença observada nos tratamentos em diferentes fotoperíodos.

Pode-se observar também na Tabela 1, que a partir de 24 horas, a massa durante o desenvolvimento larval difere significativamente nos diferentes tratamentos, sendo que cada tratamento se diferencia do controle em termos de ganho de massa, de forma distinta nos intervalos de tempo. Nos tratamentos que aceleraram o desenvolvimento (Citalopram e Carne), o período de estabilização da massa ocorreu antes dos demais, já que em 84 horas a média da massa não apresentava mais diferença significativa em relação a pesagens anteriores. Já no tratamento CD e nos tratamentos que retardaram o desenvolvimento (Diazepam e Escuro), a média da massa começou a se estabilizar no mínimo com 96h de desenvolvimento. Esta estabilização da massa se deve ao período de pré-pupa, a qual se caracteriza pelas larvas de último ínstar estarem prestes a empupar, quando cessam a alimentação e se locomovem à procura de um sítio de pupação (HINTON, 1946; FRAENKEL & BHASKARAN, 1973; COSTA *et al.*, 2006).

Esta alteração no tempo de desenvolvimento se deveu principalmente aos ínstaes larvais e pré-pupa, os quais podem apresentar diferenças na morfologia e fisiologia dos

imaturos, com reflexos na duração(tempo) do desenvolvimento do inseto (HINTON, 1946; FRAENKEL & BHASKARAN, 1973; COSTA *et al.*, 2006).

Na Tabela 2 a seguir, pode-se observar a duração dos diferentes instares larvais e estágios de pré-pupa nos tratamentos realizados.

Tabela 2. Intervalo de tempo observado de duração das fases do estágio larval nos diferentes tratamentos

	Dieta oligídica					Substrato de carne bovina
	Controle-Dieta	Citalopram	Diazepam	Claro	Escuro	
1º instar	0-24h	0-24h	0-24h	0-24h	0-24h	0-18h
2º instar	24-48h	24-48h	24-48h	24-48h	24-48h	18-36h
3º instar	48h-96h	48h-96h	48h-96h	48h-96h	48h-96h	36-84h
Pré pupa	96-144h	96-144h	96-144h	96-144h	96-144h	84h-144h

Obs.: Não foi avaliado o estágio de farado

Desta forma, a análise metabólica foi avaliada separadamente, de acordo com as fases do desenvolvimento larval (três instares) e pré-pupa.

Na Figura 3, é possível visualizar a média do metabolismo ao longo de todo estágio larval e de pré-pupa de *C. megacephala*, nos diferentes tratamentos.

Pode-se observar pela Figura 3B, que o metabolismo do primeiro instar do estágio larval é o único que apresenta diferença significativa em relação ao Controle-Dieta em quase todos os tratamentos, exceto no tratamento Claro. No entanto, o 1º instar foi o único período em que a massa foi idêntica em todos os tratamentos (Figura 2 e Tabela 1), o que leva a pensar que o 1º instar é crucial para o desenvolvimento larval, pois as respostas e padrões de desenvolvimento e ganho de massa podem variar posteriormente. Este estágio inicial do desenvolvimento larval parece ter se adaptado a substratos discretos e efêmeros, em que quanto mais rápido um grupo de larvas obtiver alimento e mudar de instares, maior a chance de sobrevivência, já que os recursos vão se exaurir rapidamente.

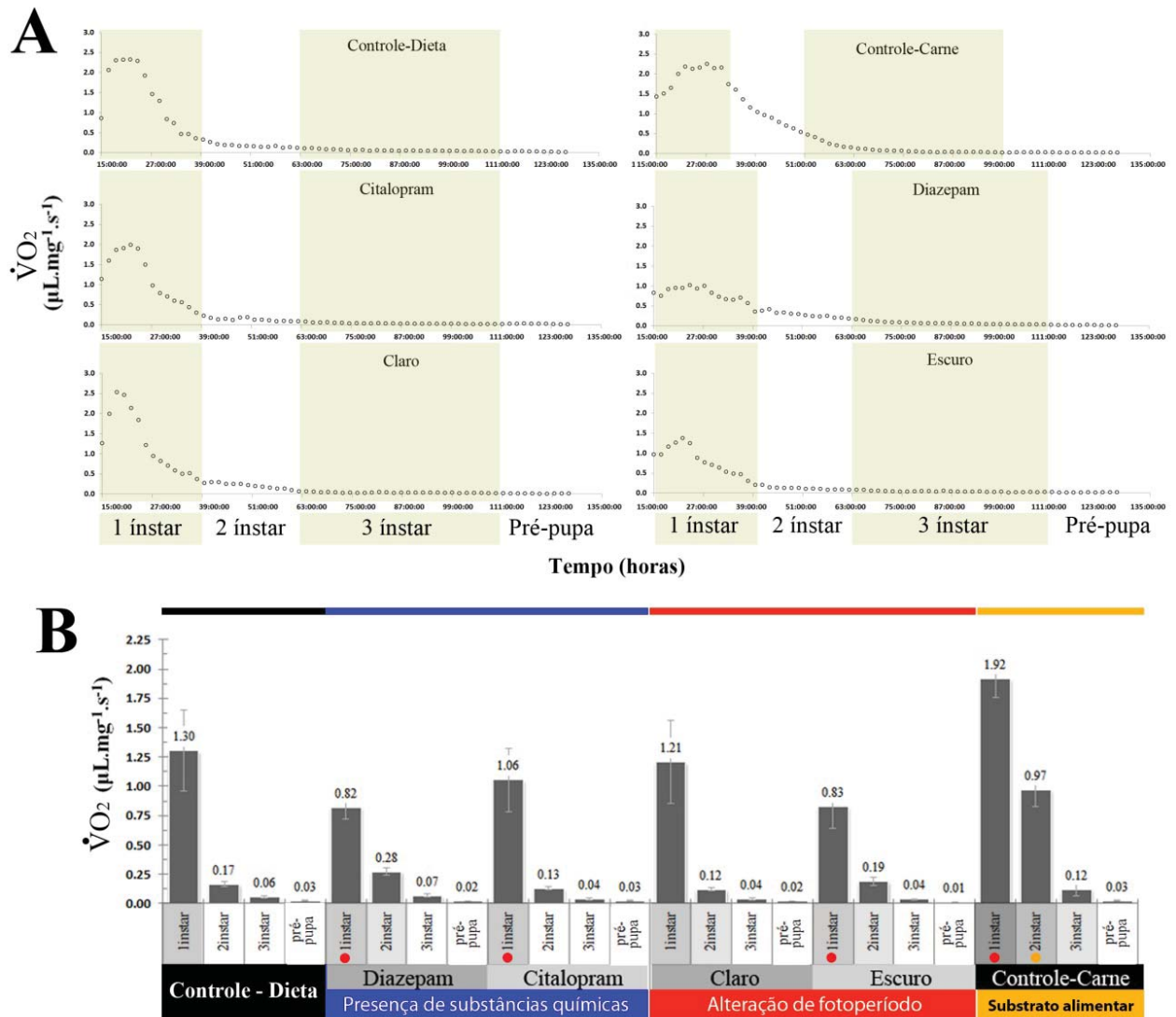


FIGURA 3. Média com desvio padrão do metabolismo específico ao longo das e nas diferentes fases do estágio larval nos diferentes tratamentos. **A:** Média ($n=5$) dos dados obtidos durante todos os intervalos de tempo observados. **B:** Média dos dados obtidos dentro dos diferentes estágios larvais durante o desenvolvimento. Os retângulos em tons de cinza nas fases larvais indicam diferença significativa (teste a posteriori de Bonferroni; $p < 0,05$) quando se avalia as fases dentro do mesmo tratamento. Os círculos coloridos mostram diferença significativa com controle-dieta entre as mesmas fases larvais nos diferentes tratamentos, e a ausência do círculo indica semelhança (teste a posteriori de Bonferroni; $p < 0,05$).

Ao analisar o efeito dos diferentes substratos alimentares (dieta e carne) sobre o metabolismo energético nos diferentes ínstaes, pode-se observar que eles diferem significativamente: ínstaes ($F=1019,3$; $p<0.0001$); tratamentos ($F=253,9$; $p<0.0001$) e ínstar*tratamento ($F=76,7$; $p<0,0001$). Observou-se diferença significativa no metabolismo dos dois primeiros ínstaes, quando se compara o desenvolvimento em diferentes substratos, ou seja, a qualidade nutricional do substrato alimentar e a decomposição da carne alteram significativamente o metabolismo e consequentemente, o ganho de massa neste período crítico no desenvolvimento larval (Figuras 2 e 3). A decomposição do substrato carne bovina

moída é muito mais acelerada que a observada na dieta, o que fornece maior quantidade de substrato que pode ser assimilado com maior facilidade pelo estágio larval de *C. megacephala*.

Ao comparar o efeito das drogas com o controle dieta, nos diferentes ínstares, pode-se observar que eles diferem significativamente: ínstares ($F=785,3$; $p<0.0001$); tratamentos ($F=10,5$; $p<0.0001$) e ínstar*tratamento ($F=20,4$; $p<0,0001$). Tal diferença significativa entre as drogas nos diferentes íntares só foi observada apenas no primeiro ínstar para as duas drogas utilizadas, em relação com o Controle-Dieta como pode-se observar na Figura 3B.

Na presença de uma substância química, o metabolismo do 1º ínstar foi reduzido, o que causou um retardo no desenvolvimento larval na presença de Diazepam, como já observado anteriormente na avaliação da massa (Figura 2A). No entanto, na presença de Citalopram, pode-se observar uma aceleração no ganho de massa por tempo do desenvolvimento larval (Figura 2); porém, o metabolismo foi menor que o observado no Controle-Dieta. Desta forma, ambas as substâncias reduziram a taxa metabólica do 1º instar larval de *C. megacephala*, sendo que tal efeito poderia ser atribuído à ação da droga na fisiologia do organismo ou ainda ao efeito inibitório do antidepressivo e do ansiolítico utilizados, sobre o crescimento de microrganismos (BATAI *et al.*, 1999; NEAL *et al.*, 2001; KRUSZEWSKA *et al.*, 2006), os quais auxiliam no processo de assimilação dos nutrientes (HOBSON, 1931, 1932) principalmente no 1º instar larval. Além disto, as larvas podem ter apresentado a mesma/ou menor atividade de alimentação que do controle; no entanto, a droga parece ter agido no acúmulo de reservas no corpo do animal, o que indica a necessidade de uma avaliação da massa seca do indivíduo, a qual não foi realizada no presente estudo.

Ao comparar o efeito dos tratamentos com alteração no fotoperíodo (Claro e Escuro) com o tratamento Dieta (Fotoperíodo de 12h) nos diferentes ínstares, pode-se observar que eles diferem significativamente: ínstares ($F=689,3$; $p<0.0001$); tratamentos ($F=17,1$; $p<0.0001$) e ínstar*tratamento ($F=12,5$; $p<0,0001$). O metabolismo do tratamento Claro é praticamente idêntico ao Controle-Dieta; no entanto, a presença de luz contínua agiu retardando o ganho de massa por tempo (visto anteriormente – Figura 2), provavelmente devido a interrupções alimentares que devem ter ocorrido pela atividade dinâmica do aglomerado larval, a qual foi visivelmente maior que dos outros tratamentos, pois as larvas respondem à fonte de luz, positivamente ou negativamente, principalmente durante o momento de dispersão larval pós-alimentar na busca de sítios de pupação (EVANS, 1936; SMITH *et al.*, 1981; RICHARDS *et al.*, 1986; KOCAREK, 2001). Estes mesmos autores observaram que a intensidade luminosa é muito mais importante que as alterações de

temperatura e umidade no comportamento e atividade de deslocamento de espécies de moscas-varejeiras (EVANS, 1936; SMITH *et al.*, 1981; RICHARDS *et al.*, 1986; KOCAREK, 2001).

Já o tratamento Escuro apresentou um metabolismo do 1º ínstar menor que o observado no controle (Figura 3), e o ganho de massa foi bem maior durante o desenvolvimento. Assim sendo, a presença de luz direta (Claro) ou em ciclos (Dieta) pode atuar estimulando a atividade de deslocamento das larvas, o que acarretaria em um consumo de reservas energéticas do indivíduo, reduzindo a média de massa do grupo.

Estágio de pupa

A análise da massa das pupas nos diferentes tratamentos mostrou diferença significativa entre os tratamentos ($F=6,95$; $p<0.0001$), como se pode observar na Tabela 3, mas somente controle-carne foi diferente de controle-dieta.

As pupas formadas em carne apresentaram maior massa que a obtida no controle, como também foi observado anteriormente no estágio larval. Em relação aos tratamentos (drogas e fotoperíodo), a massa das pupas não foi significativamente diferente, sendo que apenas a massa do Escuro foi significativamente maior que a massa do Claro ($p=0,0361$) (Tabela 3). Apesar das larvas se desenvolverem aparentemente de formas distintas nos diferentes tratamentos, o peso médio da pré-pupa tendeu a ser parecido nas últimas horas antes da empupação (Figura 2 e Tabela 1).

Na Figura 4, pode-se observar também a média do metabolismo específico ao longo do intervalo de tempo do estágio de pupa, nos diferentes tratamentos.

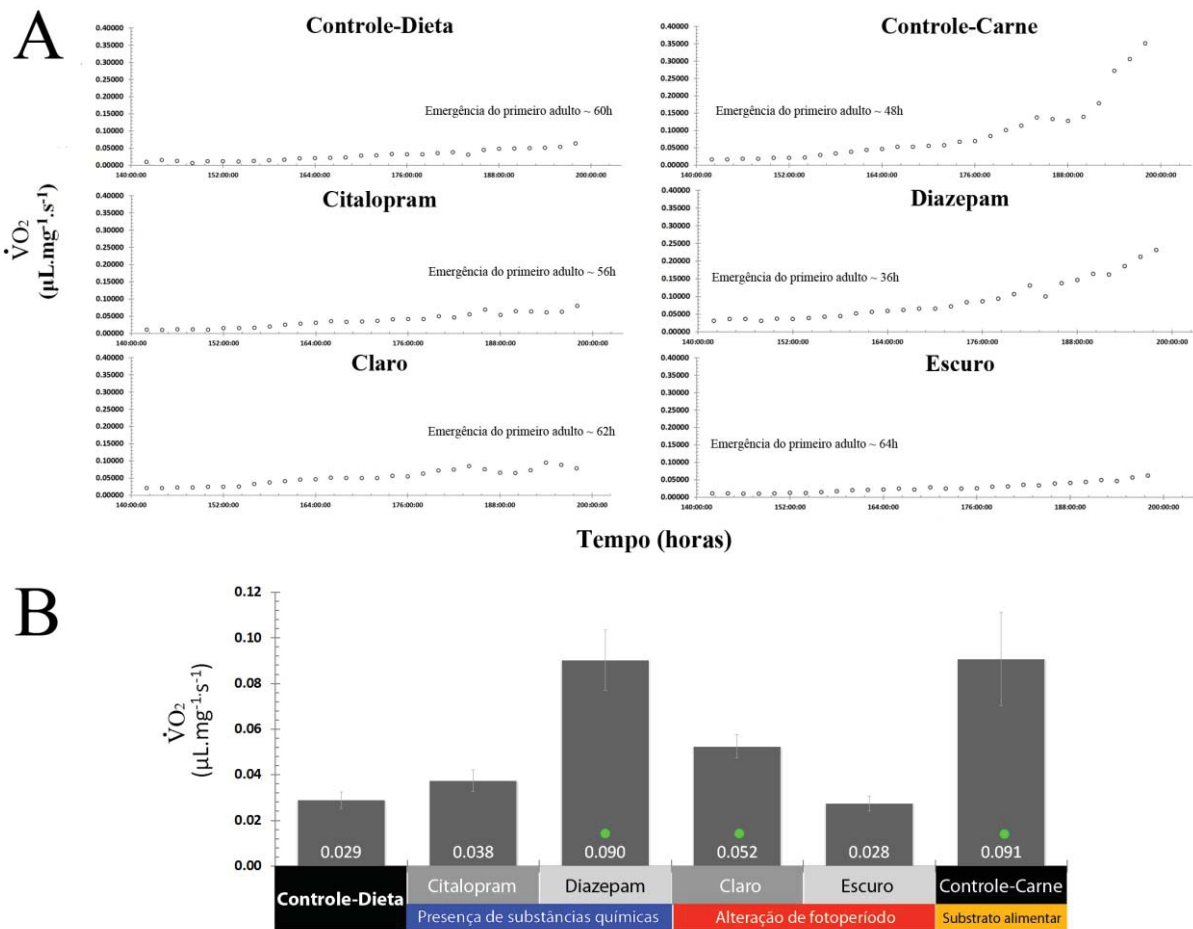


FIGURA 4. A: Média do metabolismo específico ($n=5$) ao longo do período de pupa nos diferentes tratamentos, além da média de emergência do primeiro adulto ($n=25$). **B:** Média com erro padrão do metabolismo específico do período de pupa nos diferentes tratamentos. A presença de círculos verdes mostram os metabolismos iguais comparando-se ao controle-dieta, e ausência mostra diferença significativa (teste a posteriori de Bonferroni; $p < 0,05$).

TABELA 3. Média e erro padrão da massa da pupa nos diferentes tratamentos ($n=25$)

Controle-Dieta	Citalopram	Diazepam	Claro	Escuro	Controle-Carne
47.84±0,001	48.86±0,001	43.9±0,001	43.74±0,003	54.86±0,002	59.02±0,001*

*mostra diferença significativa em relação ao controle ($p<0,05$)

Todos os experimentos apresentaram diferenças significativas no metabolismo específico em relação aos tratamentos: Substrato alimentar ($F=13,71$; $p<0,0001$); Drogas ($F=24,05$; $p<0,0001$); Fotoperíodo ($F=17,87$; $p<0,0001$).

Em relação ao substrato alimentar, pode-se observar um maior metabolismo específico do tratamento Carne em relação ao controle-dieta ($F=13,71$; $p<0,0001$), sendo que a massa das pupas que se desenvolveram em carne também foi maior do que a massa do controle-dieta (Tabela 3). O aumento do metabolismo observado na carne pode estar relacionado ao tempo de duração deste estágio neste tratamento. Quanto mais curto o período de pupa, mais

acelerado foi o metabolismo durante sua metamorfose; assim, em aproximadamente 48h após a formação da pupa, já eram observados adultos do Controle-Carne emergindo, sendo que os adultos do controle-dieta começaram a emergir aproximadamente após 60h (Figura 4A).

No caso da presença de drogas, não foi observada diferença significativa entre o metabolismo de Citalopram e Controle, porém Diazepam apresentou um maior metabolismo comparado com Controle, sendo que os primeiros indivíduos também emergiram antes do controle-dieta, em aproximadamente 36h (Figura 4A).

Em relação ao fotoperíodo, os indivíduos do Claro apresentaram maior metabolismo que o controle-dieta (Figura 4B); no entanto, o tempo de emergência (62h) foi bastante parecido ao do controle-dieta (60h) (Figura 4A).

Estágio adulto

Em relação à massa, não se observou diferença em relação ao sexo, no estágio adulto ($F=1,99$; $p<0,16$), porém podem-se observar algumas diferenças significativas para: idade ($F=37,97$; $p<0,0001$); tratamento ($F=7,72$; $p<0,0001$); e na interação idade*tratamento ($F=193,3$; $p<0,0001$). Na Figura 5 e 6, pode-se observar a variação na mediana e a distribuição da amostragem da massa obtida nos adultos, para os diferentes tratamentos e idades.

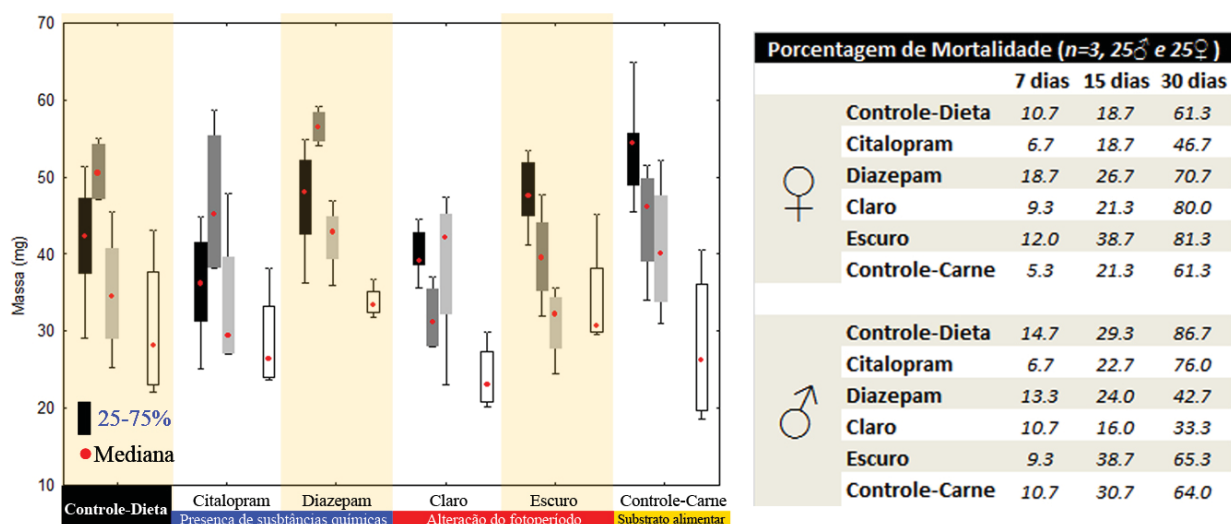


Figura5. Box-plot da massa individual dos adultos nos diferentes tratamentos e idade, além da tabela de porcentagem de mortalidade nos diferentes tratamentos e idade. **B:** Gráfico do metabolismo específico de repouso e o escopo metabólico ao longo dos diferentes tratamentos, idade e sexo. A presença de círculo colorido na barra de metabolismo de repouso ou escopo metabólico significa diferença significativa ao controle-dieta na comparação a mesma idade observada. As barras coloridas abaixo do eixo x significa diferença ou igualdade estatística nos dados metabólicos entre as idades dentro do mesmo tratamento.

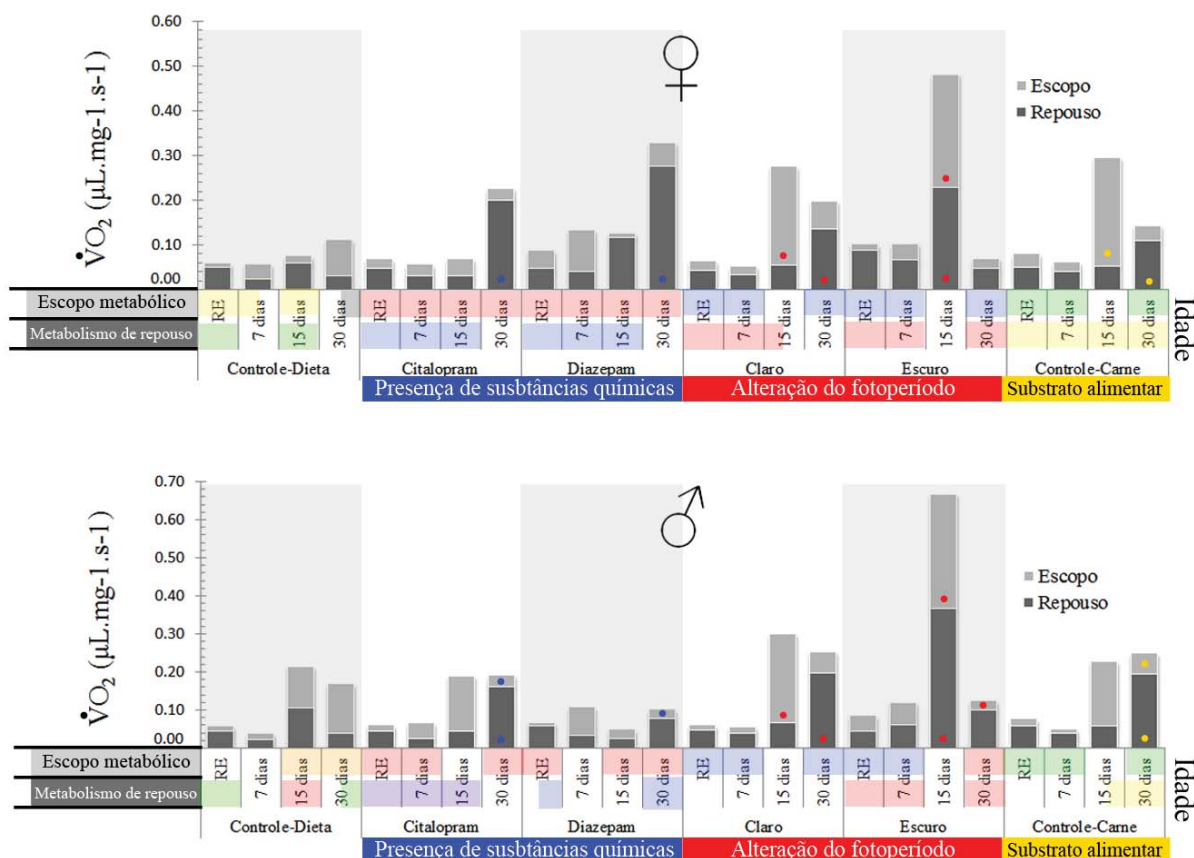


Figura 6. Gráficos do metabolismo específico de repouso e o escopo metabólico ao longo dos diferentes tratamentos, idade e sexo. A presença de círculo colorido na barra de metabolismo de repouso ou escopo metabólico significa diferença significativa ao controle-dieta na comparação a mesma idade observada. As barras coloridas abaixo do eixo x significa diferença ou igualdade estatística nos dados metabólicos entre as idades dentro do mesmo tratamento.

Ao analisar a influência de substratos alimentares, pode-se observar que o metabolismo específico de repouso mostrou diferença significativa nos tratamentos ($F=5,82$; $p<0,05$); idade ($F=6,03$; $p<0,001$); tratamento*idade ($F=9,24$; $p<0,0001$). O escopo metabólico também foi distinto entre os tratamentos ($F=7,01$; $p<0,01$); idade ($F=42,93$; $p<0,0001$); tratamento*sexo ($F=9,85$; $p<0,01$); tratamento*sexo*idade ($F=4,48$; $p<0,01$).

A presença de drogas durante o desenvolvimento larval causou alterações significativas no metabolismo dos adultos que emergiram, em relação ao metabolismo específico de repouso: tratamentos ($F=10,56$; $p<0,0001$); sexo ($F=10,99$; $p<0,001$); idade ($F=12,49$; $p<0,0001$); tratamento*sexo ($F=13,45$; $p<0,0001$); tratamento*idade ($F=17,94$; $p<0,0001$); sexo*idade ($F=9,56$; $p<0,0001$); tratamento*sexo*idade ($F=18,54$; $p<0,0001$). A análise do escopo metabólico mostrou diferença significativa: sexo ($F=8,35$; $p<0,01$); idade ($F=19,81$; $p<0,0001$); tratamento*sexo ($F=8,42$; $p<0,001$); tratamento*idade ($F=15,25$; $p<0,0001$); sexo*idade ($F=10,77$; $p<0,0001$).

Nos experimentos com alteração de fotoperíodo, pode-se observar variação significativa no metabolismo de repouso em: tratamento ($F=16,55$; $p<0,0001$); sexo ($F=4,03$; $p<0,05$); idade ($F=14,91$; $p<0,0001$); tratamento*idade ($F=15,22$; $p<0,0001$); sexo*idade ($F=2,84$; $p<0,05$). Já quando se avalia

o escopo metabólico, pode-se observar diferença entre: tratamento ($F=7,84$; $p<0,001$); sexo ($F=4,34$; $p<0,05$); idade ($F=62,45$; $p<0,0001$); tratamento*idade ($F=16,12$; $p<0,0001$);

Desta forma, pode-se constatar que em todos os experimentos (substrato alimentar, presença de drogas e fotoperíodo) o metabolismo específico de repouso e escopo metabólico sofreram influência do tratamento e da idade dos adultos. Ou seja, dependendo da idade do adulto resultante do tratamento utilizado, podem-se observar diferenças significativas em relação ao controle-dieta (Figura 5 e 6).

Na Figura 7, podem-se visualizar diferenças e a variabilidade da amostragem nos diferentes tratamentos, por meio da mediana, percentil e valores mínimos e máximos.

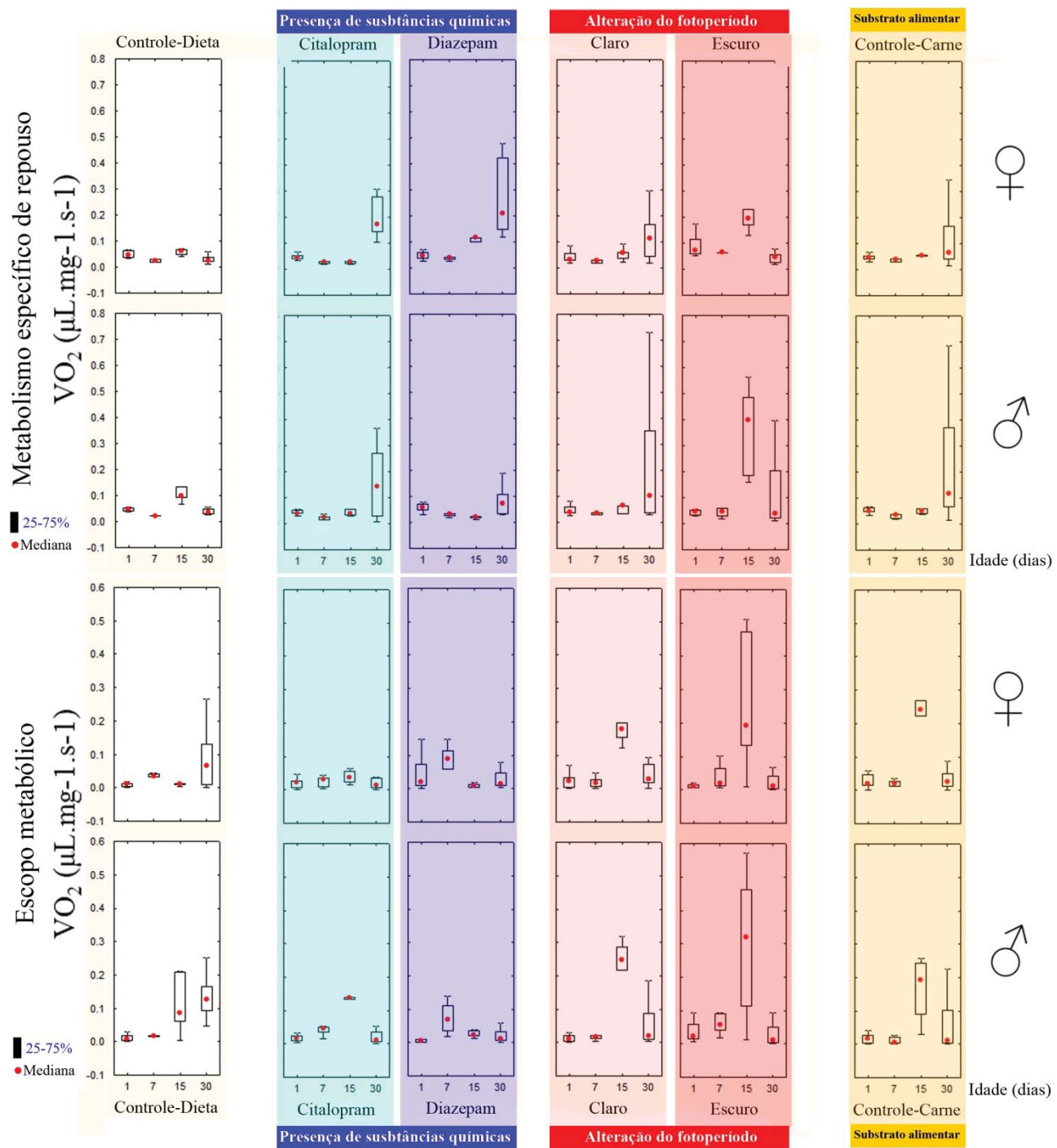


Figura 7. BoxPlot do metabolismo específico e escopo metabólico nos diferentes tratamentos e durante diferentes idades de adultos de *C. megacephala*.

Os adultos machos com idade de 15 dias apresentaram um escopo metabólico geralmente maior que o observado nos outros dias nos diferentes tratamentos, podendo este fato provavelmente estar relacionado ao ciclo de vida e maturação da espécie. Apenas no tratamento Diazepam, o escopo metabólico em 15 dias não foi maior que o das outras idades (Figura 7), provavelmente devido a um efeito da droga. A fêmea leva em torno de 7-10 dias para o desenvolvimento ovariano e início do comportamento de oviposição, como observado por LINHARES (1988) e LINHARES & AVANCINI (1989). No entanto, em fêmeas, não foi observado tal padrão do escopo metabólico, talvez pela ausência de desenvolvimento do ciclo gonotrófico, devido à não estimulação por fontes proteicas exógenas (não foi oferecido fígado bovino durante a manutenção dos adultos).

A presença das drogas alterou principalmente o valor de metabolismo e escopo metabólico dos adultos com 30 dias, provavelmente pelo efeito da droga no corpo dos imagos, o que afetou a sua sobrevivência (Figura 5), tendo em vista que a porcentagem de mortalidade foi muito maior nos tratamentos com presença de drogas. O custo metabólico na manutenção do indivíduo tendeu a ser maior do que o observado no controle-dieta, principalmente nas fêmeas de 30 dias (Figuras 6 e 7).

A influência do fotoperíodo também agiu sobre o metabolismo de repouso de 30 dias, principalmente sobre os indivíduos do tratamento Claro, que apresentaram maior mortalidade que os indivíduos de controle e escuro. No caso do tratamento Escuro, foram observadas alterações no metabolismo de atividade, talvez pela não estimulação da fonte luminosa (Figuras 6 e 7). Já o metabolismo de repouso, do escuro de 15 dias, foi também significativamente diferente do observado no controle-dieta, talvez pela alteração de atividade, na qual os indivíduos sem um sincronismo de claro e escuro teriam ficado ativos de forma alterada, ou seja, alterando seu ritmo circadiano.

Perfil geral do metabolismo de *C. megacephala*

Na Figura 8, pode-se observar a variação do metabolismo específico, absoluto e da massa, ao longo de toda a vida de *C. megacephala*, tratada com carne moída durante seu estágio larval.

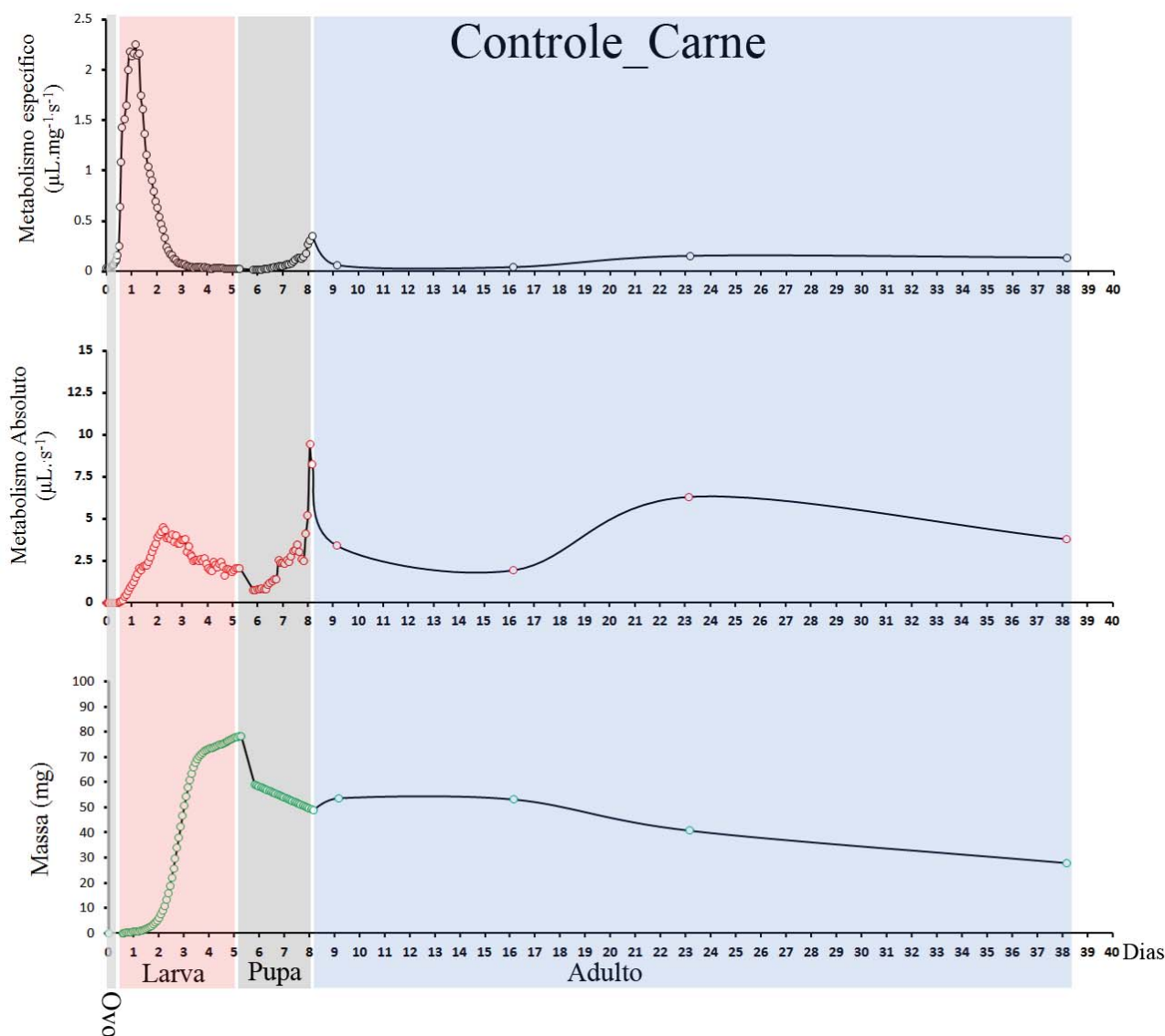


Figura 8. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala*.

A média do metabolismo específico apenas no estágio de ovo foi de $0,08 \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, havendo um acréscimo de 2.325% no estágio seguinte de larva de 1º ínstar ($1,94 \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A larva de 2º ínstar reduziu a 26,7% ($0,52 \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) do metabolismo específico do ínstar anterior. Já a larva de 3º ínstar reduziu a 22,1% ($0,11 \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) do metabolismo específico do estágio de 2º ínstar. A pré-pupa apresentou o menor gasto energético de todas as fases do desenvolvimento, reduzindo a 26,4% ($0,03 \mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) do metabolismo observado na larva de

3º instar. O estágio de pupa apresentou aumento de 300% do metabolismo observado no estágio anterior, e o adulto, um aumento de 110% do metabolismo específico médio em relação ao intervalo de estágio de pupa. Esse grande aumento nas taxas de metabolismo poderia ser resultado de associação entre vias metabólicas presentes nos diferentes estágios, além da presença de microrganismos que auxiliariam na decomposição do substrato alimentar, o que consequentemente aumentaria o consumo de forma tão extrema como o observado no 1º instar larval. A presença de bactérias é fundamental para a alimentação larval em moscas varejeiras, pois as larvas necessitam de alimentos liquefeitos para a captura e assimilação durante a nutrição, pois seu aparato bucal não apresenta dentes que permitam a alimentação a partir de substratos sólidos (HOBSON, 1931). Hobson (1932) também observou que o desenvolvimento de *Lucilia sericata* era retardado quando se esterilizava ovos, larvas e o substrato alimentar.

A nutrição larval de moscas-varejeiras foi estudada inicialmente por HOBSON (1932) e MACKERRAS & FRENEY (1933), que detectaram a importância de microrganismos como fatores promotores de crescimento no substrato de alimentação larval, que podem ser trazidos pelos próprios adultos ao visitar este substrato, pois os adultos de *C. megacephala* podem carregar mais de 40 espécies distintas de bactérias sobre seu corpo, como observado por Sukontason *et al.* (2007).

O período de estágio larval é o intervalo mais importante na vida de um inseto holometábolo, porque é o estágio em que o mesmo é submetido a altos níveis de competição por alimento, o qual é considerado como discreto espacialmente e efêmero. E caso não atinja o peso mínimo de empupação, o indivíduo acaba morrendo e não completando seu ciclo de vida. Consequentemente, a larva de primeiro instar necessita crescer e desenvolver o mais rápido possível, no meio de um aglomerado que normalmente pode conter milhares de indivíduos competindo por alimento. Caso o indivíduo consiga ganhar massa e desenvolver mais rapidamente, isso acarretará em benefícios para a sua sobrevivência; desta forma, era de se esperar um grande metabolismo no estágio larval, o que pode ser confirmado observando a Figura 7, e as informações anteriormente descritas.

O estágio de pré-pupa apresentou neste caso o menor gasto energético entre todos os estágios imaturos, isto porque neste momento o inseto para de se alimentar e começa a procurar por um sítio para pupação, no qual permanece imóvel até a emergência do adulto. O período de pupa, o qual se caracteriza por processos de metamorfose do inseto, apresentou um metabolismo específico médio menor que o observado nos adultos. Porém, é importante

ressaltar que na fase final do período de pupa, o consumo energético foi maior que o observado no adulto, momento no qual o inseto apresenta uma grande atividade devido à necessidade de deixar o pupário.

No Apêndice 1, pode-se avaliar e observar as alterações no metabolismo específico, absoluto e massa ao longo de todo o desenvolvimento de *C. megacephala* nos diferentes tratamentos realizados neste trabalho, assim como demonstrado pela Figura 8.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram que os tratamentos causaram alterações distintas no metabolismo energético das diferentes fases da vida de *C. megacephala*. Diazepam e o tratamento Claro retardaram o ganho de massa por tempo, quando comparados com o Controle-Dieta. Já o Controle-Carne, Citalopram e Escuro aceleraram o ganho de massa por tempo. No entanto, as taxas metabólicas sofreram alterações distintas em cada fase da vida dessas moscas. Podem-se observar alterações em relação ao metabolismo energético nos diferentes tratamentos, principalmente na fase de 1º ínstar do estágio larval, fase na qual o indivíduo possui maior consumo de O₂ de todas as fases de seu ciclo de vida; no entanto, são necessários mais experimentos no futuro, avaliando a presença de outras vias metabólicas associadas a este grande aumento na taxa de metabolismo observada.

Na fase de pupa, podem-se observar alterações em relação aos tratamentos, sendo que os indivíduos que emergiram antes (Diazepam e Controle-Carne) apresentaram um metabolismo maior que os do Controle-Dieta. A incidência da luz (Claro) também aumentou o metabolismo específico na fase de pupa; no entanto, o tempo de emergência foi praticamente idêntico ao tratamento Dieta. Talvez a presença de luz atue na fotólise de alguma substância, alterando algum processo químico que poderia acarretar um aumento do metabolismo observado.

Já no metabolismo observado nos adultos, pode-se observar um aumento no escopo metabólico em torno do 15º dia de vida, além do que algumas diferenças no metabolismo de repouso e de atividade foram observadas quando se compara os tratamentos. O tratamento escuro foi o que mais apresentou resultados distintos quando comparado com os outros tratamentos, tanto no metabolismo de repouso quanto no escopo metabólico, no qual havia presença de luz.

No entanto, são necessários mais estudos visando avaliar os efeitos das substâncias químicas, do fotoperíodo e do substrato alimentar no metabolismo, nas células e a nível

molecular, ao longo das diferentes fases do desenvolvimento, para uma melhor compreensão dos efeitos gerados no desenvolvimento durante o ciclo de vida de um inseto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- ATANASOV, A. T.. The linear allometric relationship between total metabolic energy per life span and body mass of poikilothermic animals. **Biosystems**, 82, 137–142, 2005.
- BARBONE, F.; MCMAHON, A.D.; DAVEY, P.G.; MORRIS, A.D.; REID, I.C.; MCDEVITT, D. G.; MACDONALD, T.M. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. **The Lancet**, 332: 1331-1336, 1998.
- BARROS-CORDEIRO, K.B. & PUJOL-LUZ, J. R. . Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, p. 709-717, 2010.
- BARTHOLOMEW, G. A. & CASEY, T. M.. Oxygen consumption of moths during rest, pre-flight warm-up, and flight in relation to body size and wing morphology. **J. exp. Biol.** 76, 11-25, 1978.
- BATAI, I., M. KERENYI & M. TEKES. The impact of drugs used in anaesthesia on bacteria. **Eur. J. Anesthesiol.** 16: 425–440, 1999.
- BAUGARTNER, O. L. & GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. **Journal of Medical Entomology** 21:105-113, 1984.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BERRYMAN, A. A. **Principles of population dynamics and their application**. Cheltenham, UK, 1999.
- BOND, A.J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41–57, 1998.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- CAMPOBASSO, C. P.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTRONA, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **Int. J. Legal Med.** 118: 210-214, 2004.

- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CLARK, K.; EVANS, L. AND WALL. R.. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. **Forensic Sci. Int.**, 156 (2-3): 145-149, 2006.
- COELHO, J.R. & MOORE, A.J. Allometry of resting metabolic rate in cockroaches. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 587-590, 1989.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- COSTA, C.; IDE, S. & SIMONKA, C.E.. **Insetos Imaturos. Metamorfose e Identificação**. Holos Editora, Ribeirão Preto, 249p., 2006.
- DAAN, S., MASMAN, D. & GROENEWOLD, A. Avian metabolic rates: their association with body composition in nature. **American Journal of Physiology** 259, R333-R340, 1990.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DIETCH J.T. & JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184–188, 1988.
- ERZINÇLIOĞLU, Y.Z. Immature stages of british Calliphora and Cynomya, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). **Journal of Natural History**, 19:69-96. 1985.
- EVANS, A.V. The physiology of the sheep blowfly *Lucilia sericata* Meig. (Diptera). **Transactions of the Royal Entomological Society**, 85, 363-378, 1936.
- FENG, W. C., CUI, H., CHUAN, C. Y., XIONG, M. J., TAO, L. J., WANG, J. F., HU, C., CHEN, Y. C., MIN, J. X., LI, J. T. Chronology of development within puparium of *Chrysomya megecephala* in different constant temperature and its application in postmortem interval. **Acta Parasitology of Medical Entomology Sin** 8: 232–236, 2002a.
- FENG, W. C., CUI, H., CHUAN, C. Y., XIONG, M. J., TAO, L. J., WANG, J. F., HU, C., CHEN, Y. C., MIN, J. X., LI, J. T. Effect of temperature over the body-length change of *Chrysomya megacephala* (Fabrius). **Acta Parasitology of Medical Entomology Sin** 9: 100–105, 2002b.
- FRAENKEL, G. & BHASKARAN, G. Pupariation and pupation in Cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. **Ann. ent. Soc. Am.**, Washington, 66(2):418-422, 1973.

- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA, G.K. Microorganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GABRE, R. M.; F. F. ADHAM & H. CHI.. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologica** 27: 179–183, 2005.
- GARDENER, D.L & COWDRY, R.W. Alprazolam-induced dyscontrol in borderline personality disorder. **Am. J. Psychiatry**, 142: 98–100, 1985.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, G. Processos Auto-Organizados: **Efeitos de substâncias químicas que agem no sistema nervoso sobre o desenvolvimento e padrão de dispersão larval pós-alimentar de dípteros (Calliphoridae e Muscidae)**. Dissertação de mestrado, UNESP – Rio Claro, 202 f., 2006.
- GOMES, L. **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books Editora Ltda, 2010. v. 1. 524 p, 2010.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol**, 11: 45–49, 1981.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol**, 12: 257-266, 1987.
- HEMMINGSSEN, 1960. **Energy metabolism as related to body size and respiratory surfaces, and its evolution Report of the Stemo Memorial Hospital Nordisk Insulin Laboratory**, vol. 9 pp. 1–110, 1960.
- HINTON, H.E. CONCEALED PHASES IN THE METAMORPHOSIS OF THE INSECTS. **NATURE**, 157(3991):552-553, 1946.

- HOBSON, R. P. Studies on the Nutrition of Blow-Fly Larvae: I. Structure and Function of the Alimentary Tract. **J. Exp. Biol.**, 8:109-123, 1931.
- HOBSON, R. P. Studies on the Nutrition of Blow-Fly Larvae: II. Role of the Intestinal Flora in Digestion. **J. Exp. Biol.**, 9:128-138, 1932a.
- HOBSON, R. P. Studies on the Nutrition of Blow-Fly Larvae: IV. The Normal Role of Micro-Organisms in Larval Growth. **J. Exp. Biol.**, 9:366-377, 1932b.
- 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: 35-39, 1977.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- IRELAND, S. & TURNER, T. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Sci. Int.** 159(2-3):175-81, 2006.
- ISHIJIMA H. Revision of the third stage larvae of synantropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). **Japan J Sanit Zool** 18: 47-100, 1967.
- JONASSON, B. & SALDEEN, T. – Citalopram in fatal poisoning cases. **Fosensic Science International** 126 (2002) 1-6, 2002.
- KANESHRAJAH, G. & TURNER, B.D. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. **Int. J. Legal Medic.**, 118: 242–244, 2004.
- KITTEL, A. KBRPERGRBSSE, KBRPERZEITEN UND ENERGIEBILANZ. II. Der Sauerstoffverbrauch der Insekten in Abhndngigkeit von der Kbrpergrbsse. **Zeitschrift fur Vergleichende Physiologie** 24, 319-342, 1937
- KLEIBER, M. Body size and metabolism. **Hilgardia** 6, 315-353, 1932.
- KOCAREK, P. Diurnal patterns of postfeeding larval dispersal in carrion blowflies (Diptera, Calliphoridae). **European Jounal of Entomology** 98: 117–119, 2001.
- KONARZEWSKI, M. & DIAMOND, J. Evolution of basal metabolic rate and organ masses in laboratory mice. **Evolution** 49, 1239-1248, 1995.
- KRUSZEWSKA, H., ZAR BA, T., TYSKI, S. Estimation of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. **Acta Pol. Pharm.**, 63(5):457-60, 2006.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.

- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415–421, 1995.
- LEVOT, G.W., BROWN, K. R., SHIPP, E. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. **Bull. Entomol. Res.**, 69: 469-475, 1979.
- LINHARES, A. X., AVANCINI, R. Ovarian development in the blowflies *Chrysomya putoria* and *Chrysomya megacephala* on natural diets. **Med. Vet. Entomol.**, 3: 283-295, 1989.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LOPES DE CARVALHO, L. M. & LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil, **J. Forensic Sci.**, 46 (3): 604-608, 2001.
- MACKERRAS, M. J. & FRENEY, M. R. Observations on the nutrition of Australian blowflies. **J. exp. Biol** 10, 237-46, 1933.
- MCALPINE JF, PETERSON BV, SHEWELL GE, TESKEY HJ, VOCKEROTH JR, WOOD DM. **Manual of Nearctic Diptera**, Agriculture Canada, vol. I, Monograph 27, Research Branch, Ottawa, 674 pp, 1981.
- MCELROY, S. L., HUDSON, J. I., MALHOTRA, S., WELGE, J. A., NELSON, E. B., KECK, P. E. **Citalopram in the treatment of binge-eating disorder: a placebo-controlled trial.** 2003.
- MENDONÇA, M. M.; QUEIROZ, M. C. C. & ALMEIDA, J. M. Rearing *Chrysomya megacephala* on Artificial Diets Composed of Varying Concentrations of Albumin. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.52 n.1: pp. 421-426, (2009).
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARRARO, M.V.; MARTINS, C.; MOREIRA, O.I.; CRUZ, M. & SERAFIN, I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4):793-798, 1996.
- NEAL, C.P., FREESTONE, P.P.E., MAGGS, A.F., HAIGH, R.D., WILLIAMS, P.H. & LYTE, M. Catecholamine inotropes as growth factors for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology Letters** 194:163-169, 2001.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.** Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards.** Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi,

- C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- PESCHKE, K.; KRAPF, D. & FULDNER, D. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. **Zool. Jb. Syst.**, **114**: 241-265, 1987.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- PIRES S.M., CÁRCAMO, M. C.; ZIMMER, C. R. & RIBEIRO, P. B. Influencia da dieta no desenvolvimento e investimento reprodutivo de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.1, p.41-47, 2009.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- QUEIROZ, M.M.C.; MELLO, R.P. DE & LIMA, M.M. Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) Reared in the Laboratory. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92:187-196, 1997.
- QUEIROZ, S.M.P. & CARVALHO, C.J.B. DE. Chave pictórica e descrição de larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em Vazadouros de Resíduos Sólidos Domésticos em Curitiba, Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 16(2):265-288, 1987.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W. & FRENCH, K. **Fisiologia animal - mecanismos e adaptações**. Rio de Janeiro. : Guanabara. 2000.
- REIGADA, C.; GODOY, W. A. C. Larval density, temperature and biological aspects of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 4, p. 562-566, 2006.
- REINHOLD, K. Costly Behaviour and the Evolution of Resting Metabolic Rate in Insects. **Functional Ecology**, Vol. 13, No. 2 pp. 217-224, 1999.
- REIS, S.F.; G. STANGENHAUS, W.A.C. GODOY, C.J. VON ZUBEN & O.B. RIBEIRO. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.

- RICHARDS, D. S., SAUNDERS, D. S., EGAN, V. M., THOMSON, R. C. K. The timing of larval wandering and puparium formation in the flesh-fly *Sarcophaga argyrostoma*. **Physiol. Entomol.**, 11: 53–60, 1986.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- ROSA, G. S., CARVALHO, L. R., REIS, S. F., GODOY, W. A. C. The Dynamics of Intraguild Predation in *Chrysomya albiceps* Wied. (Diptera: Calliphoridae): Interactions between Instars and Species under Different Abundances of Food. **Neot. Ent.** 35: 775-780, 2006.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481–485, 1997.
- SAS Institute Inc., **SAS User's Guide: Statistics**, Version, 8th Edition, Cary, NC, USA, 2001.
- SAUNDERS, D. S. **Insects clocks**. 3rd edn. Elsevier Science BV: Amsterdam, 2002.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SMITH, P. H., DALLWITZ, R., WARDHAUGH, K. G., VOGT, W. G., WOODBURN, T. L. Timing of larval exodus from sheep and carrion in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 30(2): 157-162, 1981.
- SUKONTASON, K. L., BUNCHOO, M., KHANTAWA, B., PIANGJAI, S., RONGSRIYAM, Y., SUKONTASON, K. Comparison between *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in northern Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 38:38–44, 2007.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.
- TAUBER, E. & KYRIACOU, C.P. Insect photoperiodism and circadian clocks: models and mechanisms. **Journal of Biological Rhythms** 16: 381-390, 2001.
- TRIPLEHORN, C A & JOHNSON, F J. **Estudo dos insetos** - Tradução da 7ª edição de Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects, Editora Cenage Learning, 816 p., 2011.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.
- VÉLEZ, M.C. & WOLF, M. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 48:41-47, 2008.
- VINOGRADOV, A.E. Nucleotypic effect in homeotherms: body-mass-corrected basal metabolic rate of mammals is related to genome size. **Evolution** 49, 1249-1259, 1995.

- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae).** Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WELLS, J.D. & KURAHASHI, H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera:Calliphoridae) development: Rate, variation, and the implications for forensic entomology. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, 45(4):303-309, 1994.
- WIJESUNDARA, D. P. The life-history and bionomics of *Chrysomya megacephala* (Fab.). **Ceylon J. Sci.** B25: 169-185, 1957.
- WOODS, J. H., Katz, J. L. & Winger, G. Benzodiazepines: Use, Abuse, and Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 44(2): 151-347, 1992.
- WORM, K., DRAGSHOLT, C., KRINGSHOLM, B., Citalopram concentrations in samples from autopsies and living persons, **Int. J. Leg. Med.** 111, 188-190, 1998.
- ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World.** London: Butterworths, 267 p, 1965.

CAPÍTULO 3

PERFIL DA TEMPERATURA CORPÓREA E TERMORREGULAÇÃO DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (F.)
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE).

RESUMO

As reações e processos bioquímicos sofrem grande influência da temperatura, e dessa forma, diversos animais gastam tempo e energia procurando regular a temperatura corpórea, mantendo-a dentro de limites, os quais podem fornecer maior eficiência em processos fisiológicos, permitindo a sobrevivência da espécie. A alteração na temperatura corpórea de um animal ocorre por diversos motivos, e o principal é o calor produzido durante a conversão de energia em alguns processos dentro do corpo do animal, como por exemplo, durante os processos de digestão, desenvolvimento ontogenético ou atividade física de um animal. Dentre os animais, os insetos tendem a manter a temperatura corpórea bastante próxima ao do ambiente, reduzindo custos metabólicos, porém limitando sua faixa de temperatura em que se mostram ativos no ambiente. No entanto, poucos estudos procuraram avaliar como alguns insetos, dentre eles dípteros, podem regular a temperatura corpórea frente a alterações do ambiente e durante seus diferentes estágios do desenvolvimento holometábolo. Assim, este trabalho procurou avaliar o perfil térmico e processos de termorregulação em *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) nos diferentes estágios de seu ciclo de vida e em diferentes tratamentos e temperaturas. A aplicação de diferentes metodologias para a avaliação do perfil térmico nesta espécie foi motivada pela importância que a mesma apresenta na ciência forense e do ponto de vista médico-sanitário. Foram constatadas alterações na temperatura do agregado larval em diferentes substratos alimentares, na presença de drogas e na alteração do fotoperíodo. Os adultos originados nos diferentes tratamentos apresentaram alterações no período de atividade e na temperatura de diferentes porções do corpo. Quando foram analisados os indivíduos aclimatados em diferentes temperaturas, pode-se constatar que a maior atividade ocorre entre 20 e 30 °C, sendo que abaixo e acima desses valores, poucos foram os indivíduos ativos, tendo em vista a forte influência da temperatura. Além destes fatos, foi possível observar e descrever um interessante comportamento de termorregulação quando a temperatura do ambiente aumentava, ou logo após a ausência de luz no ambiente, sendo que este comportamento foi denominado de arrefecimento por salivação, no qual os indivíduos exteriorizavam uma gota de saliva, mantendo-a no aparato bucal e durante a evaporação desta gota, ocorria uma grande queda na temperatura, e após sua reingestão, as temperaturas das porções do corpo diminuía consideravelmente.

Palavras chave: Moscas-varejeiras, perfil térmico, termorregulação, termografia, forense.

INTRODUÇÃO

O meio ambiente apresenta flutuações sazonais de diversos fatores abióticos, os quais influenciam todos os seres vivos e são derivados de aspectos físicos, químicos ou físico-químicos do próprio meio, tais como a luz, a temperatura, correntes de convecção, pH, entre outros (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000). Dentre estas variáveis, a temperatura tem grande importância, pois as reações e processos bioquímicos sofrem grande influência da mesma, e desta forma, diversos animais gastam tempo e energia procurando regular a temperatura corpórea, mantendo-a dentro de limites, os quais podem fornecer maior eficiência em processos fisiológicos, permitindo a sobrevivência da espécie (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000).

Assim, quando a temperatura do corpo é elevada acima de determinados níveis, devido ao aumento da carga de calor, seja a partir da exposição a um ambiente quente ou a partir de um incremento na produção de calor metabólico, os animais exibem mecanismos para melhorar a dissipação deste calor e, portanto, promover a diminuição na temperatura corpórea (T°_{corp}). Por exemplo, sob estresse térmico, alguns animais podem aumentar o fluxo sanguíneo em áreas nuas do corpo, que podem então agir como janelas térmicas para dissipação de calor. As orelhas de elefante, a cauda do rato, a barriga dos cães e o bico do tucano são alguns exemplos de tais janelas térmicas (PHILLIPS & HEATH, 1992; RANDALL *et al.*, 2000; OWENS *et al.*, 2002; TATTERSALL *et al.* 2009). Outros mecanismos também podem ser utilizados para o controle da temperatura, como a evaporação da água em contato com o corpo do animal (CHAPMAN, 1998; RANDALL *et al.*, 2000).

Para os insetos, nenhuma outra variável ambiental é mais importante que a temperatura (HEINRICH, 1993), que pode agir alterando a atividade de um indivíduo ou aumentando em mais de 10 °C a temperatura corpórea em apenas alguns segundos, como pode ser observado durante a atividade de voo de moscas (BARTHOLOMEW & LIGHTON, 1986; CHAPPELL & MORGAN, 1987; MORGAN & HEINRICH, 1987). Desta forma, a influência da temperatura sobre os insetos é muito mais rigorosa e efetiva que a observada em qualquer outro animal (HEINRICH, 1974, 1993).

Assim, o estudo do controle da temperatura nos insetos se torna bastante interessante, pois esses artrópodes tiveram que desenvolver mecanismos de adaptação térmica e de termorregulação para a sobrevivência durante as variações sazonais de temperatura do ambiente (T°_{amb}) e durante as súbitas variações na temperatura corpórea (T°_{corp}) quando entram em atividade (HEINRICH, 1993). No entanto, a grande maioria dos insetos possui

massa corpórea menor que 500mg, ou seja, a razão superfície/volume corpóreo é bem maior que a maioria dos outros animais, e consequentemente, esses insetos possuem dificuldade de manter a temperatura corpórea diferente da temperatura do ambiente, pois sofrem grandes e rápidas trocas de calor com o ambiente (HEINRICH, 1993; CHAPMAN, 1998).

Dentre os insetos, a ordem Diptera apresenta uma grande diversidade de famílias e espécies distribuídas por diversas regiões do globo terrestre, proporcionando como característica uma grande variedade ecológica, de formatos/tamanhos corpóreos e especializações nos diferentes ambientes em que estão presentes. Os dípteros em geral despertam grande interesse nos estudos científicos devido ao grande número de espécies descritas, fácil manutenção sob condições experimentais, rápida produção de grande número de descendentes, importância agrícola por atuarem como agentes polinizadores (ANDERSON *et al.*, 1982; SULAIMAN *et al.*, 1988, 1989), ou pelo fato de causarem danos econômicos à agricultura, e interesse como vetores de doenças tendo, desta forma, importância médico-veterinária (GUIMARÃES *et al.*, 1978; PESSOA & MARTINS, 1988; CATTS & GOFF, 1992; MARCONDES, 2001; STONEHOUSE *et al.*, 2004).

Desta forma, diversos estudos já foram realizados avaliando processos de termorregulação e de adaptações térmicas, utilizando-se dípteros. Dentre eles, as espécies mais estudadas são as moscas-de-fruta do gênero *Drosophila*. Com esse drosofilídeo, já foram realizados inúmeros trabalhos observando os efeitos da T°_{corp} sobre o envelhecimento (MAYNARD-SMITH, 1963), longevidade (HOSGOOD & PARSONS, 1968; MURPHY *et al.*, 1983), estratégias bioquímicas na adaptação térmica (MORRISON & MILKMAN, 1978; ALAHOTUS, 1983; CZAJKA & LEE, 1990), produção de ovos (CLAVEL & CLAVEL, 1969), acasalamento (SCHNEBEL & GROSSFIELD, 1984), e distribuição ecológica (PARSONS, 1978; KIMURA, 1988).

Alguns mecanismos de adaptação térmica e termorregulação já foram descritos para várias espécies de insetos (HEINRICH, 1993), e no caso das moscas, destacam-se mecanismos como: a utilização de correntes de convecção próximas ao tórax reduzindo a temperatura desta região do corpo durante o voo (HEINRICH, 1993); adaptações ao frio, como a presença de glicerol e outras substâncias na hemolinfa, dificultando o congelamento (LITTELWOOD, 1966; KEVAN, 1972; BYERS, 1983; KOHSHIMA, 1984;); alterações anatômicas na disposição de vasos de hemolinfa, facilitando o resfriamento e condução do calor (MORGAN *et al.*, 1985); alteração na abertura e fechamento de espiráculos quando a T°_{amb} aumenta ou diminui, respectivamente, facilitando o resfriamento ou manutenção da T°_{corp} (EDNEY & BARRAS,

1962). A termorregulação dos insetos propiciou a conquista de diversos ambientes (como desertos, florestas tropicais, região Ártica).

Este comportamento de termorregulação tem sido objeto de investigação há muitos anos (HEINRICH, 1993). Além de fatores endógenos, outros fatores influenciam a termorregulação, tais como o tamanho corpóreo, a pilosidade, a cor, tipo de nidificação, utilização de evaporação da água sobre o corpo, entre outros. Em insetos, o aumento endotérmico da temperatura corpórea acima da temperatura ambiente é produzido pelos músculos torácicos de voo (HEINRICH, 1980a, 1993; ROBERTS & HARRISON, 1998). A termogênese em insetos, obtida fisiologicamente, ocorre durante diversos tipos de atividades, como voo, deslocamento, canto, aquecimento pré-voo, defesa contra predadores, incubação da cria, forrageamento, entre outras (HEINRICH, 1981).

Dentre os dípteros, alguns representantes da família Calliphoridae, a qual apresenta uma distribuição mundial, também são muito utilizados como animais modelo em diversos estudos. Nessa família, as moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* têm grande importância médico-sanitária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (FURLANETTO *et al.* 1984), podendo causar miíases nos animais e em humanos (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983), além de serem de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (WELLS & GREENBERG, 1992; VON ZUBEN *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2003).

As moscas-varejeiras da família Calliphoridae utilizam em ambientes naturais, substratos discretos e efêmeros para a alimentação de imaturos e adultos e postura de ovos pelas fêmeas, como por exemplo, carcaças e fezes (ATKINSON & SHORROCKS, 1981; BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984, GUIMARÃES *et al.*, 1983), locais em que geralmente estão entre as primeiras espécies a chegar e onde enfrentam níveis severos de competição por alimento (ATKINSON & SHORROCKS, 1981).

Nas moscas-varejeiras, o estágio larval é o principal período em que ocorre competição por recursos alimentares limitados, e esta competição é considerada do tipo exploratória na maioria das espécies (GOODBROD & GOFF, 1990; REIS *et al.*, 1994; 1996). Neste caso, a competição caracteriza-se pelo fato de cada larva procurar independentemente ingerir o máximo de alimento, no menor intervalo de tempo possível, antes da completa exaustão dos recursos alimentares (DE JONG, 1976; LOMINICK, 1988; VON ZUBEN *et al.*, 2000).

Chrysomya megacephala é encontrada em diversas regiões do mundo, principalmente no Oriente e na região da Australásia, podendo ser encontrada no Japão e também na região

Paleártica (RICHARD & SHEARER, 1997). Desde os anos 1970, a ocorrência de *C. megacephala* estendeu-se a diferentes áreas do mundo, tendo a espécie invadindo novos territórios da Nova Zelândia e África (WILLIAMS & VILLET, 2006), juntamente com a América do Sul, Central e do Norte (IMBIRIBA *et al.*, 1977; GUIMARÃES *et al.*, 1978), provavelmente por meio de navios.

Esta espécie de califórideo é um inseto com desenvolvimento holometábolo, apresentando quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011). O tempo de vida varia em torno de um mês a dois meses, desde o estágio de ovo até o adulto (GABRE *et al.*, 2005; BARROS-CORDEIRO & PUJOL-LUZ, 2010).

O desenvolvimento larval pode ser afetado por vários fatores como densidade larval, temperatura e quantidade de alimento disponível, e por este motivo, a investigação detalhada deste desenvolvimento é de fundamental importância para a entomologia forense, já que a estimativa do Intervalo-Pós-Morte (IPM) é geralmente baseada na idade das larvas ou pupas mais velhas encontradas no ou nas circunvizinhanças do cadáver (SMITH, 1986; OLIVEIRA-COSTA, 2003). O desenvolvimento larval pode ser acelerado e a fecundidade aumentada por uma elevação de temperatura, ou seja, regiões mais quentes e úmidas tendem a favorecer o desenvolvimento das moscas-varejeiras e sua abundância (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.* 1996; VÉLEZ & WOLFF, 2008).

Vários estudos já foram feitos sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento larval de moscas-varejeiras, como por exemplo, os de WILLIAMS & RICHARDSON (1984), HANSKI (1987), WALL *et al.* (1992), MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.* (1996), GRASSBERGER & REITER (2002) e CLARK *et al.* (2006). Estes dados são muito importantes como referência para entomologistas forenses, já que os mesmos vão comparar o peso/tamanho das larvas encontradas no local do cadáver, com dados de desenvolvimento obtidos sob condições experimentais, para tentar inferir o IPM. Para tanto, é necessário obter-se os valores de temperatura na estação meteorológica mais próxima, dos dias que antecederam a descoberta do cadáver, para, a partir de uma temperatura média destes dias, calcular quanto tempo, nestas condições, as larvas/pupas das moscas-varejeiras levaram para atingir o massa/tamanho observado, quando foram coletadas. É importante ressaltar que a temperatura do agregado tende a ser diferente daquela do ambiente, chegando a apresentar diferenças superiores a 10°C dependendo da T°_{amb} (SLONE & GRUNER, 2007; GOMES *et al.*, 2008,). Além disto, Richards *et al.* (2008) observou em diversas espécies de moscas varejeiras a temperatura de preferência e sobrevivência nos diferentes estágios de vida dos dípteros, observando certa associação filogenética entre o clima de origem da espécie e a temperatura preferencial durante seu

desenvolvimento. No entanto, poucos trabalhos procuraram descrever e quantificar a produção de calor e os efeitos da temperatura na termorregulação nos diferentes fases da vida de um díptero.

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o perfil térmico, adaptações térmicas e processos de termorregulação nas diferentes fases da vida de *C. megacephala* em distintos cenários, visando dois tipos de enfoque: na biologia da espécie e em sua importância forense.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi procurar dar contribuição a um melhor conhecimento de alguns processos fisiológicos envolvendo a adaptação térmica e termorregulação de *C. megacephala*, estudo que pode auxiliar na compreensão da biologia e comportamento da espécie, podendo fornecer embasamento para outros estudos envolvendo a mesma.

As análises do perfil térmico e de aspectos da termorregulação foram realizadas, considerando as diferentes fases de desenvolvimento desse díptero, observando-se alterações da temperatura no ambiente em que um indivíduo está presente, no conjunto de indivíduos e em porções do corpo dos indivíduos, considerando diferentes tratamentos. Esta investigação foi fundamental para se descrever:

- o perfil térmico nas diferentes fases ontogenéticas do desenvolvimento de *C. megacephala* nas diferentes fases e nos diferentes tratamentos;

e prever:

- se as larvas durante o desenvolvimento sob influência dos diferentes tratamentos (*fotoperíodo, substrato alimentar, substâncias químicas*) poderiam apresentar um perfil térmico do agregado diferente, podendo isto estar relacionado com o metabolismo, uma vez que a taxa de conversão e utilização da energia durante os processos fisiológicos geraria dissipação de calor;

- se existe a presença de processos termorregulatórios nas diferentes fases e nos diferentes tratamentos, além dos já descritos na literatura;

- se aspectos do perfil térmico e processos de termorregulação existentes no estágio de larva e de adulto se diferenciam nos diferentes tratamentos;

E também para:

- avaliar como os adultos poderiam termorregular, tendo em vista a grande produção de calor quando os mesmos estão em atividade de voo, comparando esta atividade e o repouso

em diferentes tratamentos (temperatura ambiente, fotoperíodo e alterações no desenvolvimento, devido à influência de substâncias químicas durante a fase larval);

- avaliar também alterações no perfil térmico e termorregulação ao longo do dia nos diferentes tratamentos;

- comparar também se estes aspectos do perfil térmico em laboratório são parecidos aos observados em ambiente natural;

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a 27 ± 1 °C), umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento proteico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para oviposição das fêmeas grávidas (parentais); os ovos obtidos foram utilizados para produção da geração F₁. Somente a geração F₂ foi utilizada nos experimentos, por ser progênie de uma que teve todo o seu desenvolvimento sob condições experimentais.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval, nas diferentes metodologias e tratamentos, foram utilizados: meio artificial à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982) e carne moída bovina, objetivando uma comparação com os resultados obtidos na dieta oligídica. Em alguns tratamentos, houve a adição de substâncias químicas de importância forense: ansiolítico [Diazepam] e antidepressivo [Citalopram].

No caso do ansiolítico (Diazepam), foi adicionada na dieta artificial a DL50 (intravenosa) de coelho, ou seja, 9 mg/Kg [73,6mg de Diazepam em 125g de dieta] (NIOSH, 2004), e no caso do antidepressivo Citalopram, foi utilizada a dose de 18mg/kg [8,3mg de Diazepam em 125g de dieta], observada em overdoses com humanos (WORM *et al.*, 1998; JONASSON & SALDEEN, 2002;). Sendo assim, foi utilizada apenas uma dosagem de cada uma das drogas na dieta artificial, sendo que ao controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

Os ovos de *C. megacephala* foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a postura, os mesmos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de 27±1 °C e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais nos diferentes tratamentos e avaliação da temperatura nas diferentes fases da vida da espécie.

Avaliação do perfil de temperatura corpórea e termorregulação

O estudo da temperatura/termorregulação foi realizado por meio da utilização de sensores de aquisição de temperatura Tidbit/Onset[®] e câmera com visor infravermelho (Flir SC-640).

A metodologia também variou de acordo com o estágio do desenvolvimento; neste caso, avaliaram-se apenas os estágios larval e adulto, em diferentes tratamentos.

Larva: período de desenvolvimento larval.

Sensores de aquisição de temperatura Tidbit/Onset[®]

Após a eclosão a partir das massas de ovos, as larvas foram separadas em densidades de 300 por pote (250 mL) [300 larvas em 125 gramas de dieta – 0,42g/larva], tendo sido colocado um Tidbit/Onset[®] no centro da massa de substrato alimentar, capturando dados a cada 1 minuto. Foram realizados pelo menos duas repetições para cada um dos oito tratamentos. Todo o experimento foi realizado em BOD (temperatura de 27±1 °C, umidade relativa 60±10%).

Tratamentos realizados:

1. **Controle-Dieta**—0 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Dieta/larvas** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
3. **Dizepam/larvas**– 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 73,6mg diazepam - fotoperíodo de 12 horas.
4. **Citalopram/larvas**– 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 8,3mg citalopram- fotoperíodo de 12 horas.
5. **Claro/larvas**– 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
6. **Escuro/larvas**– 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.
7. **Carne/larvas** – 300 larvas + 125g carne moída bovina - fotoperíodo de 12 horas
8. **Controle-Carne** – 0 larvas + 125g carne moída bovina - fotoperíodo de 12 horas

Após a coleta dos dados de temperatura do conjunto (substrato alimentar + presença/ausência de larvas), foi feita comparação da temperatura durante o desenvolvimento larval entre os tratamentos e durante o intervalo de tempo observado.

Câmera com visor infravermelho Flir SC-640

Neste experimento, foi comparada a temperatura superficial do conjunto substrato alimentar/ larvas nos diferentes tratamentos citados anteriormente, utilizando-se uma Câmera com visor infravermelho Flir® SC-640. Foi feita uma termografia em intervalos de tempo de 12 horas, até o início da dispersão larval, sendo realizadas pelos menos duas repetições para cada tratamento. Utilizando-se ferramentas de rotina específicas do programa de análise de dados (Thermacam Researcher Pro 2.9), foi delimitada uma área circular que compreendeu o limite do frasco, além de quatro retas que seccionaram em 45° a área da circunferência. A média de temperatura da área e a variação da temperatura ao longo da reta foram utilizadas para comparação entre os tratamentos.

Adulto: temperatura ambiente e tratamentos

A temperatura superficial das diferentes porções do corpo do inseto também foi analisada; no entanto, as observações foram feitas nos diferentes tratamentos ao longo do dia, por meio de uma câmera com visor infravermelho Flir SC-640.

No experimento com adultos, foram realizados os tratamentos abaixo:

1. **Controle (correspondente ao item 2 (dieta/larva) dos tratamentos anteriores do desenvolvimento larval)** – adultos originados de larvas desenvolvidas em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Dizepam (correspondente ao item 3 (diazepam/larva) dos tratamentos anteriores do desenvolvimento larval)**– adultos originados de larvas desenvolvidas em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 73,6mg diazepam - fotoperíodo de 12 horas.
3. **Citalopram (correspondente ao item 4 (citalopram/larva) dos tratamentos anteriores do desenvolvimento larval)**– adultos originados de larvas desenvolvidas em 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) + 8,3mg citalopram- fotoperíodo de 12 horas.
4. **Claro (correspondente ao item 5 (claro/larva) dos tratamentos anteriores do desenvolvimento larval)**– adultos originados de larvas desenvolvidas em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
5. **Escuro (correspondente ao item 6 (escuro/larva) dos tratamentos anteriores do desenvolvimento larval)**– adultos originados de larvas desenvolvidas em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.

Pode-se perceber, nos tratamentos acima, que não foi realizada a avaliação da temperatura dos adultos no tratamento desenvolvido em carne, como foi feito no desenvolvimento larval. A ausência da análise deste tratamento nos adultos se deve à priorização que se deu no presente trabalho, da coleta de dados de temperatura nos indivíduos que se desenvolveram em um substrato padronizado, ou seja, em dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982).

Neste experimento, 50 adultos de cada um dos diferentes tratamentos foram anestesiados e posteriormente colocados dentro de um tubo de PVC de 50 cm, sendo fornecidos água e açúcar *ad libitum* aos insetos. De um lado deste tubo, havia uma tela que permitiria a renovação do ar interno, tanto nas trocas gasosas e de calor com o espaço interno da BOD. Este tubo foi inserido dentro da BOD, a qual foi fechada com isopor e manteve-se apenas um orifício por onde o visor infravermelho era acoplado ao tubo, para registro das termografias.

Utilizando-se ferramentas de rotina específicas do programa de análise de dados (Thermacam Researcher Pro 2.9), foram delimitadas áreas de interesse sobre as imagens térmicas do inseto, na qual a média de temperatura da área foi utilizada para comparação entre os tratamentos. As áreas compreendiam três porções do corpo do inseto: cabeça, tórax e abdome. As termografias foram realizadas em intervalos de tempos distintos, dependendo da metodologia. Foi considerada, para cálculo da temperatura da superfície, emissividade de 0,95, sendo a mesma utilizada em diversos trabalhos com insetos (HEINRICH, 1993). Em média, 15 indivíduos eram avaliados em cada termografia obtida.

O experimento foi dividido em duas metodologias: (1) avaliação dos dados de temperatura nos diferentes tratamentos ao longo do dia; (2) perfil térmico no corpo de *C. megacephala* e de processos de termorregulação que poderiam ser observados, quando variáveis abióticas fossem alteradas (temperatura e fotoperíodo).

As metodologias são descritas a seguir:

Avaliação térmica dos adultos que se desenvolveram nos tratamentos

Neste experimento, foi comparada a temperatura superficial das diferentes porções do corpo do inseto nos diferentes tratamentos ao longo do dia, e os adultos utilizados desenvolveram-se somente em dieta oligídica (LEAL et al., 1982) nos diferentes tratamentos, como descritos anteriormente: controle, diazepam, citalopram, escuro e claro.

Cada tratamento permaneceu aclimatado durante todo o experimento na BOD (temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa $60 \pm 10\%$). As imagens termográficas foram obtidas durante um intervalo de 48 horas, na taxa de $0.333 \text{ quadro.min}^{-1}$ (1 imagem a cada 3 min), sendo que os animais ficaram 12h aclimatados antes da captura das imagens.

Avaliação térmica e termorregulação dos adultos sob variações de temperatura

Apenas adultos do tratamento controle foram utilizados nesta metodologia, os quais foram aclimatados durante 2h em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. O perfil térmico das diferentes porções dos indivíduos em atividade e repouso, foi obtido de pelo menos 20 indivíduos, para cada uma das temperaturas. As imagens termográficas foram obtidas durante intervalos de 30 minutos na taxa de 1 quadro.seg⁻¹. Foi observada a presença de processos de termorregulação nas diferentes temperaturas, sendo quantificados e descritos quando presentes.

Perfil térmico das diferentes fases da vida em ambiente natural

Para comparação com todos os dados obtidos em laboratório, as mesmas metodologias foram realizadas com um substrato alimentar diferente e em ambiente natural, durante o mês de julho de 2010. Um porco *Sus scrofa domesticus*, com massa aproximada de 10kg, foi utilizado como substrato alimentar, e a decomposição ocorreu nas dependências do Jacarezário / UNESP-Rio Claro, e as fases de sua decomposição foram acompanhadas por aproximadamente 20 dias.

Foram inseridos sensores de aquisição de temperatura Tidbit/Onset®, em diferentes porções da carcaça do porco e no ambiente, para posterior comparação. A distribuição dos sensores pela carcaça foi a seguinte (um Tidbit para cada porção): cavidade oral, anal, abdome, subcutâneo, abaixo da carcaça e 10cm de profundidade no solo, logo abaixo do porco. Para colocação dos sensores no abdome e subcutâneo, houve a necessidade da abertura de um orifício, o qual foi suturado posteriormente, tentando minimizar a existência de mais orifícios para atração de moscas.

Utilizou-se a câmera com visor infravermelho Flir SC-640 para obtenção das imagens termográficas da carcaça, durante a decomposição, tanto na fase larval como na presença de adultos de moscas-varejeiras, da mesma forma que foi realizado em laboratório. As imagens foram obtidas geralmente nos seguintes períodos: início da manhã (6:00h), meio do dia (12:00h), término do dia (18:00h) e uma imagem noturna (0:00h).

Diversas espécies de moscas foram atraídas, porém apenas califorídeos foram analisados, os quais foram identificados sobre a carcaça, dentre eles *C. megacephala* e *C. albiceps*. Ambas as espécies foram bastante abundantes e devido à dificuldade de

identificação das duas espécies via termografia, a análise das imagens da temperatura foi feita de uma mistura dos adultos destas duas espécies.

Análise estatística e outras ferramentas

A análise estatística de todos os dados coletados dos perfis térmicos nos diferentes estágios da vida desta mosca foi feita no programa SAS[®]. Análise de variância fatorial (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Bonferroni foram utilizados, comparando as médias de massa dos indivíduos nos diferentes tratamentos realizados, utilizando-se nível global de significância de 5%. Tanto a variável dependente temperatura como a diferença entre temperaturas, foram utilizadas nas comparações entre os tratamentos, repetições, tempo e suas interações.

Nos experimentos durante o estágio larval, utilizou-se a diferença entre a temperatura do tratamento com presença de larvas e o substrato na ausência de larvas, e compararam-se estatisticamente estes valores ao longo dos dias de desenvolvimento, nos diferentes tratamentos.

Nos experimentos durante o estágio de imago, utilizou-se a diferença entre a temperatura de algumas porções do corpo (cabeça – T_{cab} ; tórax – T_{tor} ; e abdome – T_{abd}) e a temperatura ambiente (T_{amb}), e compararam-se estatisticamente estes valores ao longo dos dias de desenvolvimento nos diferentes tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil térmico observado em diferentes tratamentos durante o estágio larval do desenvolvimento de C. megacephala.

A análise da temperatura do conjunto substrato alimentar e agregado larval ao longo do desenvolvimento larval nos diferentes tratamentos, mostrou diferenças estatísticas significativas entre as variáveis e interações obtidas em *C. megacephala*:

Substratos alimentares (tratamentos [F=69432; p<0,0001], dias [F=13475; p<0,0001], tratamento*dia [F=13053; p<0,0001]);

Presença de drogas (tratamentos [F=1589; p<0,0001], dias [F=9515; p<0,0001], tratamento*dia [F=324; p<0,0001]);

Alteração do fotoperíodo (tratamentos [F=2265; p<0,0001], dias [F=16445; p<0,0001], tratamento*dia [F=716; p<0,0001]).

Na figura 1, pode-se visualizar a variação na temperatura do conjunto agregado larval e substrato alimentar nos diferentes tratamentos ao longo dos dias do desenvolvimento larval, até o início da dispersão larval.

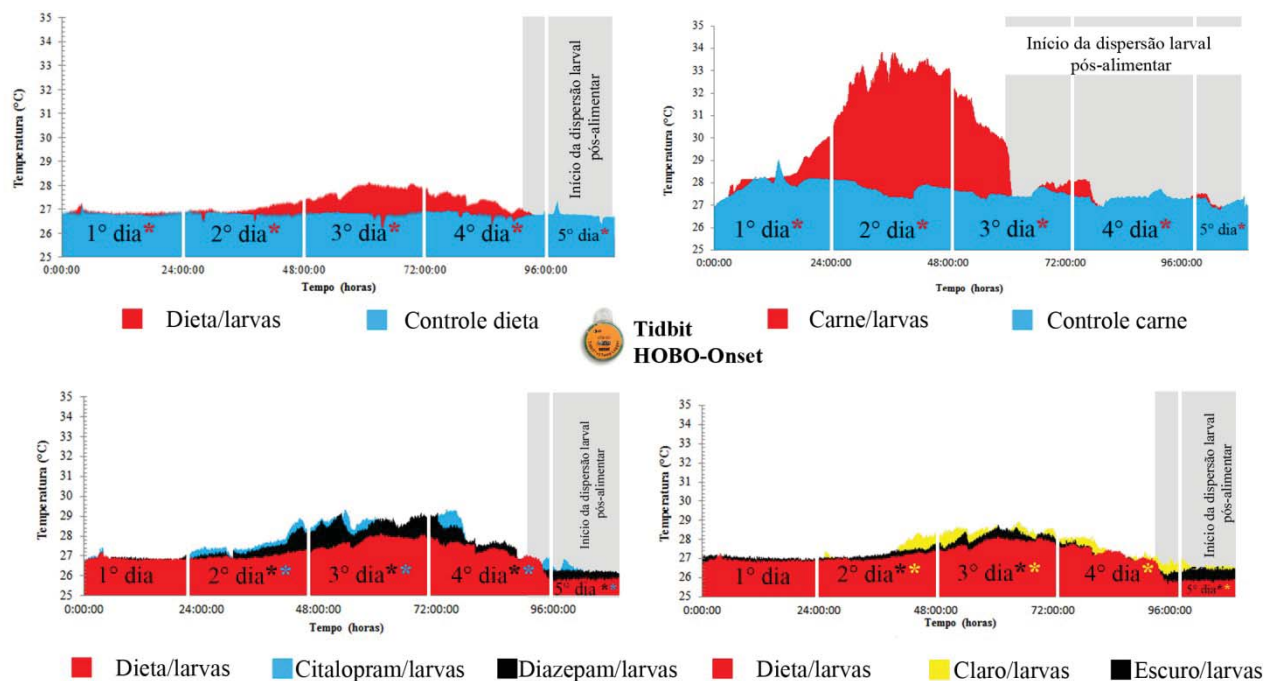


Figura 1. Padrão da temperatura média ($n=3$) do conjunto substrato alimentar mais larva nos diferentes tratamentos ao longo de todo o desenvolvimento larval. Os símbolos de * dentro dos dias representam diferenças significativas (teste de Bonferroni, utilizando-se nível de significância de 5%) dos tratamentos em relação à ausência de larvas nos dois gráficos de cima e em relação ao tratamento Dieta/larvas nos gráficos abaixo.

Pode-se constatar que todos os tratamentos utilizados geraram diferenças na temperatura interna do conjunto agregado larval e substrato alimentar em relação ao tratamento Controle (carne e dieta) e Dieta/larvas (Figura 1). A temperatura do conjunto no primeiro dia da decomposição e desenvolvimento larval já é significativamente diferente da temperatura coletada apenas no substrato alimentar (Figura 1); tal alteração se deve a processos metabólicos e fermentativos de larvas e bactérias presentes no substrato alimentar.

O calor gerado no conjunto larvas e substrato alimentar carne moída (Carne/larvas), foi muito maior que qualquer um dos outros tratamentos, chegando a atingir temperaturas médias próximas a 35 °C, ou seja, aproximadamente 8 °C a mais que a temperatura do substrato sem larvas e do ambiente da BOD. O pico da temperatura no tratamento Carne/larvas ocorreu já no segundo dia de desenvolvimento, enquanto os picos nos outros tratamentos foram observados no terceiro dia de desenvolvimento (Figura 1). A queda brusca na temperatura observada nos diferentes tratamentos esteve relacionada com o momento em que era observada a dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala*, e variou em pelo menos um dia, quando se compara o tratamento carne com larvas em relação a todos os outros

tratamentos. Tal fato observado se deve ao desenvolvimento larval ocorrer de forma mais acelerada na presença de carne bovina como substrato alimentar, comparado às larvas que se alimentaram da dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982).

Nos tratamentos com alteração de luz e na presença de drogas, pode-se observar que a diferença na temperatura do conjunto agregado larval mais substrato só foi significativa a partir do segundo dia. Tal ausência de diferença no primeiro dia poderia ser explicada pelo tamanho das larvas em relação ao substrato e pelo fato de que o efeito dos tratamentos sobre as larvas de primeiro instar, ainda não ter sido temporalmente suficiente para causar alterações da temperatura em relação ao tratamento dieta com larvas.

Pode-se constatar também que a presença das drogas e a alteração do fotoperíodo causaram um aumento na temperatura do agregado mais substrato alimentar, em relação ao tratamento dieta/larvas, ou seja, de alguma forma a presença das drogas e a presença /ausência permanente da luz geraram maior produção de calor pelo conjunto do agregado larval e substrato alimentar. As drogas podem ter causado uma alteração metabólica nos indivíduos, fazendo com que os mesmos convertessem mais energia tentando metabolizar as drogas, ou ainda podem ter aumentado a atividade dos indivíduos e consequentemente, aumentado a conversão de diferentes formas de energia, o que geraria maior dissipação de calor nestes tratamentos. No caso dos tratamentos com alteração no fotoperíodo, também foi observado um aumento da temperatura do conjunto, talvez explicado por um aumento da atividade do agregado e consequentemente do metabolismo destas larvas; isto provavelmente se deveu à atividade dinâmica do aglomerado larval, pois as larvas respondem à fonte de luz, positivamente ou negativamente (EVANS, 1936; SMITH *et al.*, 1981; RICHARDS *et al.*, 1986; KOCAREK, 2001).

Vale a pena ressaltar também as variações significativas entre as temperaturas do conjunto no último dia após a dispersão larval; porém, estas diferenças provavelmente se devem à movimentação e espalhamento do substrato nos frascos, o que poderia acarretar maior evaporação da água e consequentemente alterações na temperatura dos tratamentos, pois quanto maior evaporação de água, menor seria a temperatura do conjunto.

Tal resultado foi bem semelhante ao observado na superfície do conjunto agregado larval e substrato alimentar nos diferentes tratamentos. A análise do perfil térmico por meio de termografia da superfície do conjunto substrato alimentar e agregado larval ao longo do desenvolvimento larval nos diferentes tratamentos, mostrou diferenças estatísticas significativas entre as variáveis e interações obtidas em *C. megacephala*:

Substratos alimentares (tratamentos [F=1702; $p<0,0001$], horas [F=160; $p<0,0001$], tratamento*horas [F=367; $p<0,0001$]);

Presença de drogas (tratamentos [F=309; $p<0,0001$], horas [F=331; $p<0,0001$], tratamento*horas [F=38,15; $p<0,0001$]);

Alteração do fotoperíodo (tratamentos [F=120; $p<0,0001$], horas [F=335; $p<0,0001$], tratamento*horas [F=35,62; $p<0,0001$]).

Na Figura 2, pode-se visualizar termografias da variação na temperatura da superfície do conjunto agregado larval e substrato alimentar nos diferentes tratamentos, ao longo das horas do desenvolvimento larval até o início da dispersão larval.

Pode-se observar um aumento na temperatura superficial dos tratamentos em que havia presença de larvas no substrato alimentar, quando comparados aos frascos apenas com o alimento (Figura 2), ou seja, durante o desenvolvimento larval, ocorre uma grande dissipação de calor, devido a processos metabólicos que estão ocorrendo em cada indivíduo e no conjunto alimento + larvas.

No entanto, nos tratamentos com ausência de larvas (dieta e carne moída), pôde-se observar visualizando as termografias (Figura 2), um pequeno aumento da temperatura na dieta e um grande aumento nos frascos apenas com carne ao longo dos dias exibidos. Este aumento provavelmente ocorreu devido a processos fermentativos e metabólicos de microorganismos presentes nos dois substratos alimentares oferecidos, em que a presença de bactérias é fundamental para a alimentação larval em moscas-varejeiras, pois as larvas necessitam de alimentos liquefeitos para a captura e assimilação durante a nutrição, pois seu aparato bucal não apresenta dentes que permitam a alimentação de substratos sólidos (HOBSON, 1931). Porém, principalmente no tratamento com carne, não foi possível observar um aumento da temperatura interna vista anteriormente (Figura 1), parecido com a temperatura externa observada (Figura 2), talvez devido ao fato dos microorganismos presentes neste meio de cultura oferecido se localizarem preferencialmente na superfície, o que favoreceria trocas gasosas nos seus processos metabólicos, caso fossem necessárias.

Quando se compara os tratamentos na presença de drogas, tanto o tratamento Citalopram quanto o Diazepam, apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento Dieta/larvas, e um aumento da temperatura de superfície do conjunto agregado larval mais substrato (Figura 2), fato também observado na temperatura interna do conjunto (Figura 1), talvez explicado pelo efeito das drogas no metabolismo e atividade das larvas presentes.

A alteração do fotoperíodo gerou uma redução inicial da temperatura da superfície, e na medida em que os dias foram se passando, não foi observada diferença na temperatura superficial entre o tratamento Dieta/larvas e os tratamentos Claro e Escuro. Assim, a presença ou ausência constante de luz sobre o conjunto agregado larval + substrato alimentar parece ter reduzido a temperatura superficial nos primeiros dias, fato que pode ser explicado pelo comportamento dinâmico do agregado larval, que é influenciado pela luz positivamente ou negativamente, forçando as larvas a se deslocarem mais profundamente na dieta, reduzindo em partes a dissipação do calor na superfície.

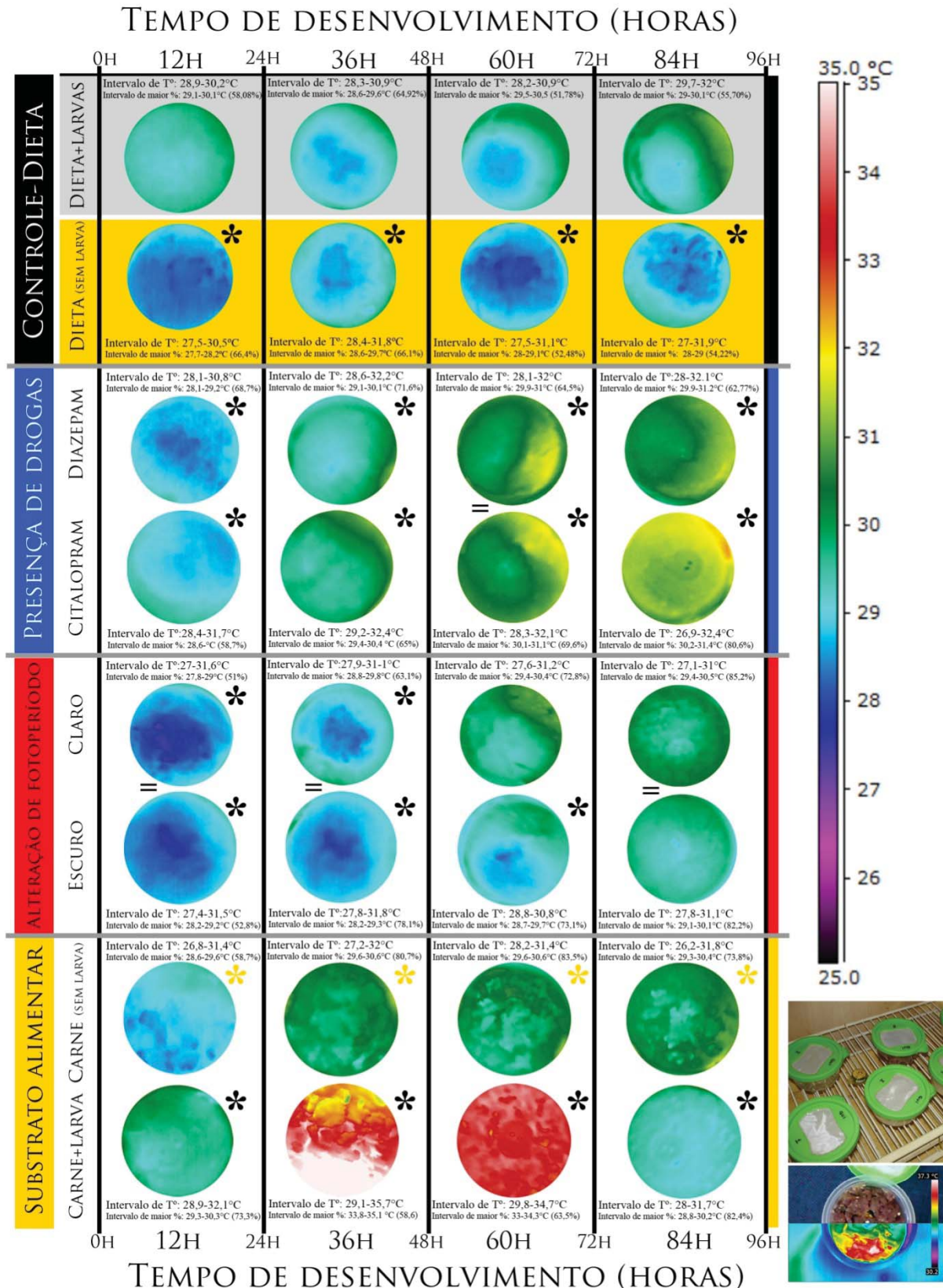


FIGURA 2. Termografias ($n=3$) da superfície do conjunto agregado larval e substrato alimentar, nos diferentes tratamentos e ao longo do tempo de desenvolvimento larval. Os símbolos de * na cor preta mostram diferenças significativas entre os tratamentos e o tratamento Dieta/larvas (teste de Bonferroni, utilizando-se nível de significância de 5%), os símbolos * na cor amarela mostram diferenças significativas em relação à dieta sem larvas. O símbolo de = mostra semelhança entre os tratamentos dentro de cada experimento. Ao lado do esquema, imagens dos frascos e coleta das informações de temperatura por meio de termografias.

Outro fator que pode influenciar bastante a temperatura do conjunto agregado larval e substrato alimentar é a evaporação de água deste sistema, que reduziria a temperatura nos diferentes tratamentos. Na figura 3, pode-se visualizar a perda de massa no decorrer do tempo nos diferentes tratamentos: o tratamento carne na ausência de larvas foi aquele que mais perdeu massa, principalmente por evaporação de água, quando se compara com os outros tratamentos em que as larvas não estavam presentes (Figura 3A). A maior evaporação da água pode ter ocorrido pela própria constituição dos substratos alimentares que eram distintos (dieta e carne), o que poderia facilitar a perda de água para o ambiente, já que um fator que age no aumento da evaporação é a área em contato com ambiente, e o substrato carne moída apresentava maior área em contato, devido às pequenas massas de carne que compunham o substrato total, diferente dos tratamentos com dieta, nos quais a superfície era bastante plana e sem presença de pequenas massas.

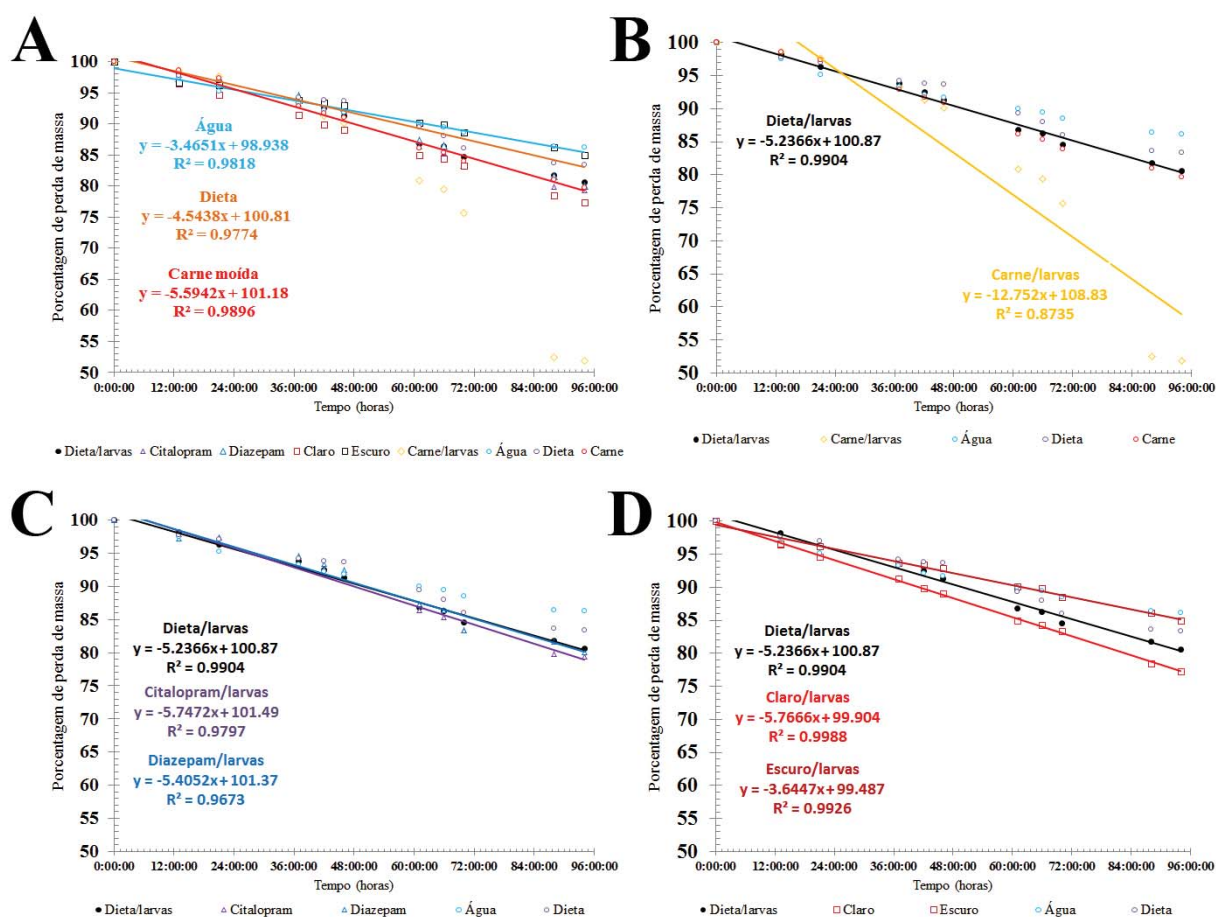


FIGURA 3. Média e regressões lineares da porcentagem de perda de massa no decorrer do tempo nos diferentes experimentos realizados (n=3).

Pode-se perceber também que a presença de larvas acelerou a perda de massa nos frascos (conjunto de larvas + substrato alimentar + recipiente) devido ao próprio metabolismo

larval (conversões de energia e estruturas nos indivíduos). A movimentação das larvas no substrato parece ter ajudado na evaporação da água em cada um dos tratamentos. Quando se avalia o efeito de diferentes substratos larvais (carne e dieta), é visível a grande perda de massa que ocorre no tratamento Carne/larvas em relação ao tratamento Dieta/larvas; no entanto, mesmo apresentando talvez uma maior perda de água, o que deveria reduzir a temperatura do conjunto, a dissipação de calor neste tratamento foi maior do que a observada em todos os tratamentos estudados (Figuras 1 e 2).

O efeito da presença de drogas não apresentou diferenças entre os tratamentos, em relação à perda de massa no decorrer do tempo, sendo que as regressões lineares são praticamente idênticas (Figura 3C). No entanto, como foi observado antes, a presença de substâncias químicas no substrato aumentou a temperatura do conjunto agregado larval+ substrato alimentar (Figuras 1 e 2).

Já a presença ou ausência de luz alterou a perda de massa nos diferentes tratamentos; a incidência de luz nos tratamentos fez aumentar a perda de massa por tempo, enquanto que o conjunto mantido no escuro perdeu menor massa do que os indivíduos que receberam luz contínua ou em intervalos, sendo que o tratamento claro foi o que perdeu maior quantidade de massa. Isto provavelmente foi devido à radiação do foco de luz alterar de certa forma a evaporação de água (no entanto, não apresentaram temperaturas distintas), ou devido à maior movimentação larval nos frascos onde havia luz, o que já foi discutido anteriormente, levando a um maior espalhamento de substrato e aumentando a área de contato com o meio, e desta forma, acelerando as taxas de evaporação. No entanto, a temperatura nos primeiros dias destes tratamentos, foi distinta do tratamento Dieta/larvas (Figuras 1 e 2), apresentando menores valores. No caso do escuro, as alterações metabólicas nas larvas poderiam explicar melhor a temperatura reduzida; já no tratamento claro, mudanças metabólicas e a evaporação de água maior que o controle poderiam explicar a menor temperatura do conjunto, nos primeiros dias do desenvolvimento.

As Figuras 4 e 5 mostram a variação da temperatura interna e externa, durante a decomposição de um porco em ambiente natural. Pode-se observar alterações da temperatura ao longo dos dias, dependendo da localização dos sensores de temperatura. Os dados são bastante semelhantes aos observados em laboratório e discutidos anteriormente, porém com alterações nos valores de temperatura observados, tendo em vista a influência da temperatura ambiental e da massa larval. Segundo Slone & Gruner (2007), o aumento da massa larval tende a aumentar a temperatura do agregado e os processos de termorregulação, o que foi observado no experimento realizado em campo quando em comparação ao descrito

anteriormente em agregados de 300 larvas no laboratório. Assim, a seguir, é feita uma descrição do observado em campo, tentando se comparar com os dados obtidos em laboratório.

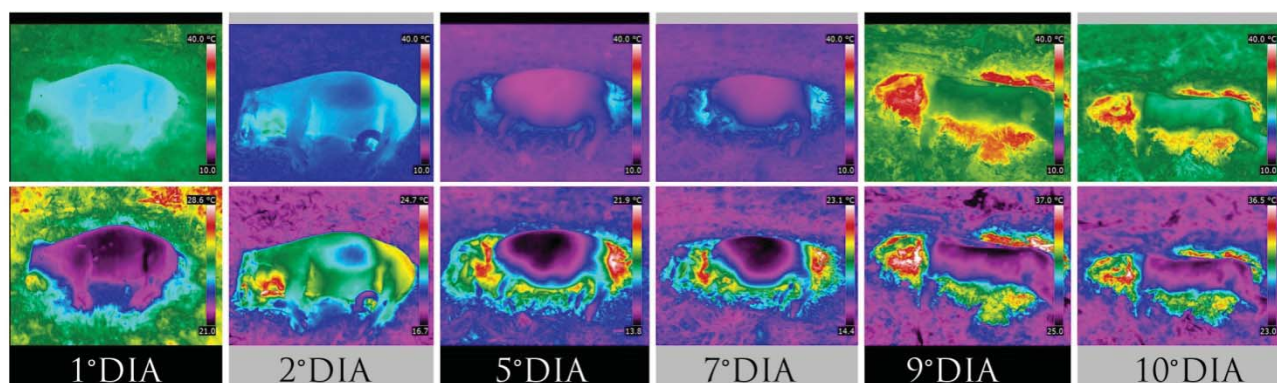
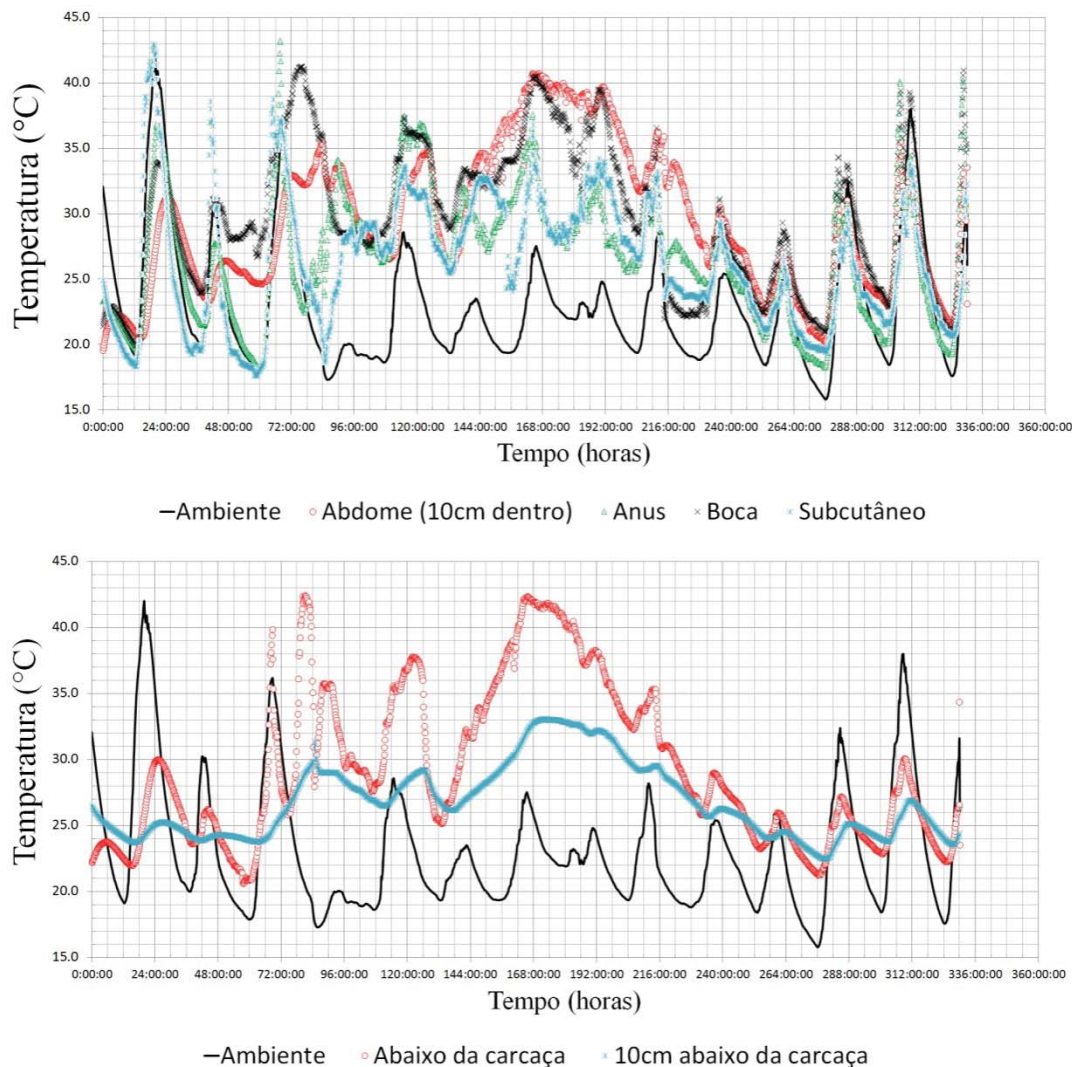


Figura 4. Gráficos e termografias do perfil da temperatura interna e externa ($n=1$) em diferentes porções da carcaça de porco, durante a decomposição em ambiente natural, em que distintas espécies de dípteros utilizaram a carcaça para o desenvolvimento larval. As termografias dentro de cada dia mostram a mesma imagem termográfica em duas escalas diferentes; acima, escalas iguais ao longo dos diferentes dias e abaixo, escalas do intervalo mínimo e máximo para cada dia.

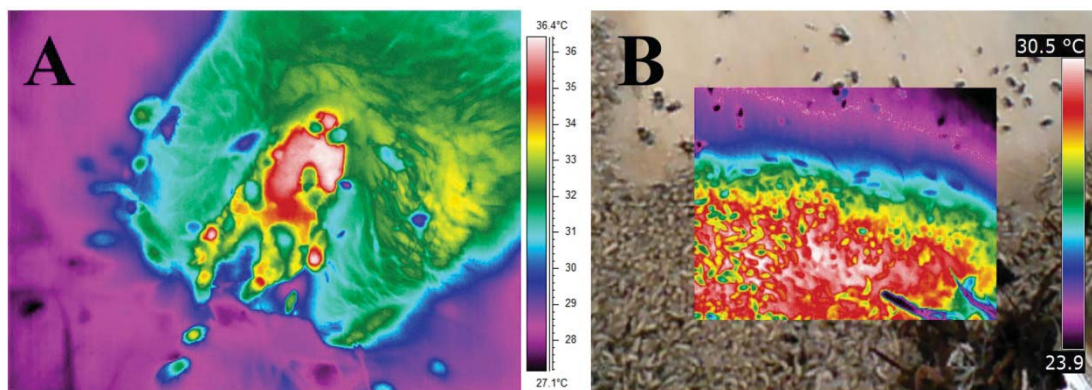


Figura 5. Termografias da carcaça durante decomposição. **A.** Imagem mostrando a variação a temperatura da boca no 3º dia de decomposição; **B.** Imagem mostrando a variação da temperatura de uma grande massa de larvas próximo a região abdominal durante o 10º de decomposição.

Pode-se constatar que a partir do 2º dia de decomposição, as temperaturas das diferentes regiões da carcaça já se diferenciaram da temperatura do ambiente, principalmente a temperatura do abdome e da boca, locais onde já ocorria a presença de larvas e o início de processos de decomposição, que geram produção de calor devido à existência de microorganismos. A partir do 3º dia, a presença de agregados larvais fez com que a temperatura das diferentes porções da carcaça se mantivesse, mesmo durante os períodos mais frios do dia, no mínimo 5 °C acima da temperatura do ambiente, chegando a atingir variações superiores a 10 °C entre o 6º e 7º dias de decomposição (Figuras 4 e 5B). O maior pico de temperatura observado ocorreu logo abaixo da carcaça, onde uma grande quantidade de larvas estava presente entre o sexto e sétimo dia de decomposição (Figura 4). Entre o 8º e 9º dias, pode-se observar uma redução da temperatura das diferentes porções do corpo e das regiões do solo abaixo da carcaça. Esta redução está provavelmente relacionada ao início de ondas de dispersão larval pós-alimentar, quando as larvas começam a deixar o substrato alimentar e iniciam a procura por um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG, 1990).

A análise das termografias mostra a alteração da temperatura superficial da carcaça ao longo do tempo, na qual se observa um aumento principalmente nas regiões próximas às aberturas naturais (boca, narina, ouvidos e ânus) e abdome, principais regiões para atração e ovipostura das fêmeas. Desta forma, são esses os locais em que primeiro aparecem os agregados larvais e consequentemente, a ocorrência de processos metabólicos que dissiparão calor (Figuras 4 e 5). Assim, a partir do 5º dia, é facilmente observado um aumento da temperatura próximo à região da cabeça e anal, e a partir do 9º dia, quando já começa a ocorrerem ondas de dispersão larval pós alimentar, pode-se constatar um grande aumento da

temperatura até mesmo no solo próximo à carcaça, devido à dissipação de calor das larvas em movimento sobre o solo, na procura por um sítio de pupação (Figuras 4 e 5).

Análise do perfil térmico de adultos de *C. megacephala*

Perfil térmico e atividade ao longo do dia dos adultos gerados nos diferentes tratamentos

Após o período de pupação, foi feita a análise do perfil da temperatura corpórea dos adultos que emergiram nos diferentes tratamentos, como pode-se observar na Figura 6. Nesta, é possível observar a temperatura das diferentes porções do corpo de vários adultos de *C. megacephala* ao longo de um dia completo (24h). A análise da temperatura das diferentes porções do corpo dos adultos nos diferentes tratamentos, mostrou diferenças estatísticas significativas entre as variáveis e interações obtidas em *C. megacephala*: porção do corpo ($F=13,72$; $p<0,0001$); tratamentos ($F=38,17$; $p<0,0001$); período do dia luz/escuro ($F=12,96$; $p<0,001$); porção do corpo*período do dia ($F=8,60$; $p<0,0001$); tratamento*período do dia ($F=32,09$; $p<0,0001$); porção do corpo*tratamento*período do dia ($F=2,66$; $p<0,0001$).

A diferença ou aumento da temperatura em porções do corpo dos insetos (cabeça, tórax e abdome) estão diretamente relacionados com a atividade de contrações musculares utilizadas durante o deslocamento, aquecimento pré voo, ou com processos de termorregulação, quando esse comportamento está presente (HEINRICH, 1993). Desta forma, a temperatura média nas diferentes porções corpóreas foi distinta, sendo que decresciam na seguinte ordem: temperatura do tórax (T°_{tor}) > temperatura da cabeça (T°_{cab}) > temperatura do abdome (T°_{abd}), como já observado também em diversas espécies de insetos (HEINRICH, 1993), em que a principal porção do corpo produtora de calor é o tórax, devido à grande frequência de contrações musculares utilizadas principalmente no voo.

Desta forma, nos gráficos dos tratamentos, é possível observar alguns intervalos de tempo em que há um aumento ou diminuição na temperatura de diferentes porções do corpo desses dípteros, que estão relacionados respectivamente com a presença ou ausência de luz, ou seja, atividade ou repouso. Nos tratamentos com fotoperíodo de 12h (Dieta/larvas, Diazepam e Citalopram), é possível observar um aumento da temperatura corpórea assim que a luz está presente, permanecendo ao longo das 12h até o momento em que a luz se apaga. No intervalo de escuridão, pode-se perceber uma queda na temperatura corpórea dos insetos chegando a apresentar temperaturas abaixo da temperatura ambiente; isso é possível devido à evaporação de água, que sequestra calor do corpo dessas moscas, reduzindo neste momento a T°_{corp} em relação ao ambiente. É possível ainda observar ao longo do dia, dois picos de

maior atividade dessas moscas nos tratamentos com fotoperíodo de 12h (Figura 6). O primeiro intervalo de maior atividade ocorreu entre as 6:00 até as 12:00; logo após, existe uma redução na atividade das moscas, retornando à atividade entre as 15:00 até a luz ser apagada, ou seja, às 18:00 horas.

Tal ciclo de atividade é totalmente distinto do ciclo observado no tratamento claro e escuro, ou seja, o fotoperíodo atua no ciclo de atividade/circadiano da espécie em questão. Nos indivíduos do tratamento claro, pode-se observar um grande intervalo de tempo (aproximadamente de 18h), no qual a temperatura corpórea estava maior que a $T^{\circ}\text{amb}$, ou seja, neste tratamento, a quantidade de indivíduos ativos permanecia sempre alta durante boa parte do dia, tendo em vista que a luz estava contínua para os mesmos. Pode-se observar uma queda na atividade apenas em um curto período de tempo (12:00 até aproximadamente 18:00), quando os indivíduos apresentaram uma diminuição da $T^{\circ}\text{corp}$ em relação à $T^{\circ}\text{amb}$. Desta forma, o ciclo circadiano destes adultos estava totalmente alterado em relação ao ciclo dos outros tratamentos, ou seja, no tratamento claro foi observado um período de atividade muito maior que o observado nos tratamentos com fotoperíodo de 12h.

Já nos indivíduos que se desenvolveram totalmente na ausência de luz, pode-se constatar que a temperatura corpórea tendeu a ser bem menor que a $T^{\circ}\text{amb}$ e bem abaixo da temperatura de todos os outros tratamentos, devido à menor atividade destes indivíduos, pois foi retirada uma das principais informações que estes insetos obtêm do ambiente, a luz. A queda da $T^{\circ}\text{corp}$, durante a ausência de luz, deve estar relacionada à necessidade de economia energética que estes animais precisam realizar, pois devem apresentar um pequeno tempo de resistência ($TR = \text{energia disponível} / \text{taxa de utilização}$) para se manterem vivos durante um longo período sem a presença de luz, já que esta última fornece informações importantes do ambiente para a sobrevivência da espécie. Assim, estes insetos podem ter desenvolvido adaptações térmicas e processos de termorregulação para baixar a temperatura corpórea e consequentemente reduzir o metabolismo, ou seja, o custo para a manutenção de processos básicos para sua sobrevivência durante o intervalo de escuridão, em que têm dificuldades de acesso a fontes alimentares.

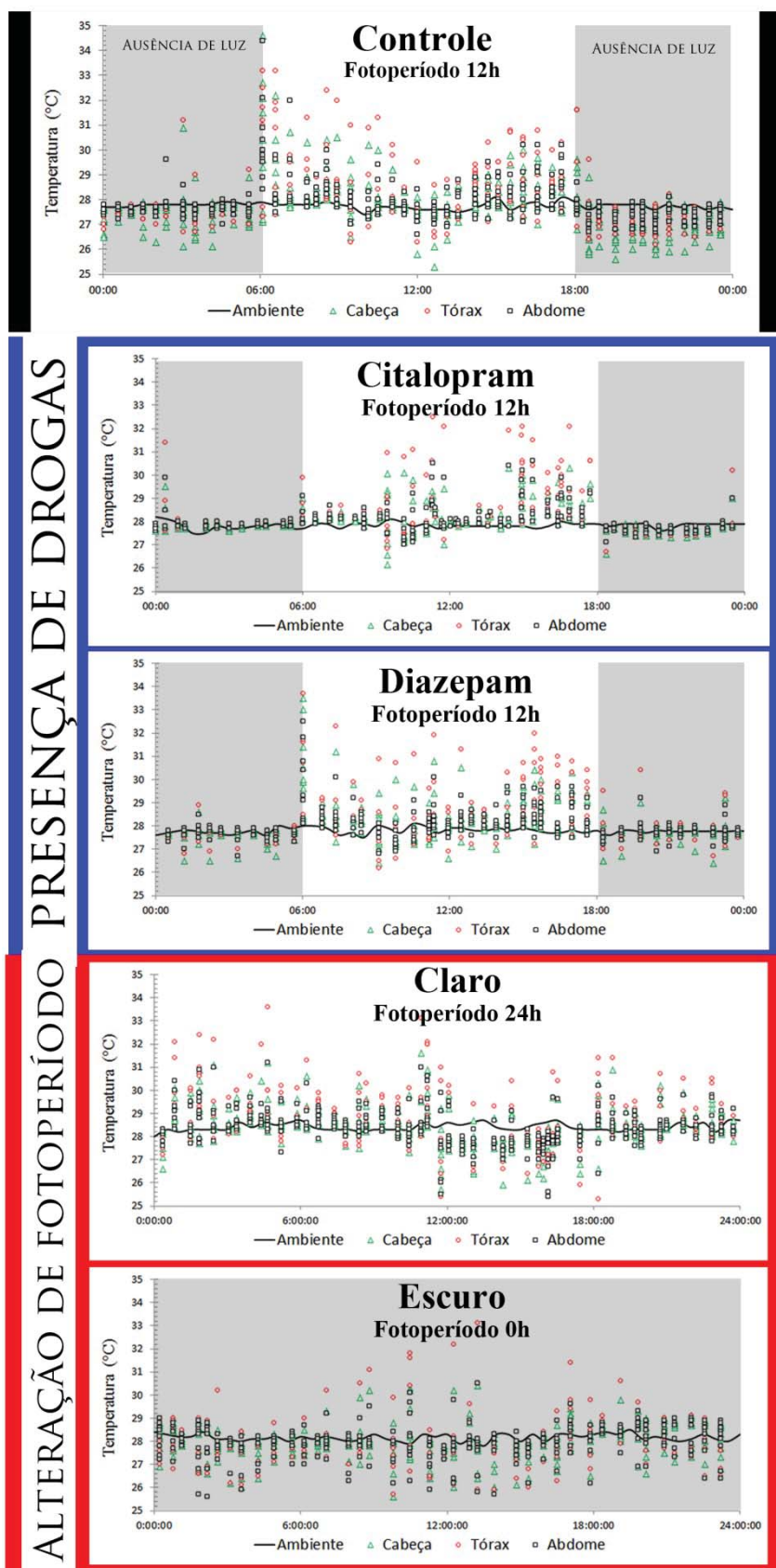


FIGURA 6. Gráficos mostrando o perfil da temperatura de porções do corpo de adultos de *C. megacephala* ao longo das horas do dia nos diferentes tratamentos, na presença e ausência de luz (n=400 para cada tratamento, BOD [temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$]).

Perfil térmico corpóreo dos adultos de *C. megacephala* em diferentes temperaturas

Na Figura 7, pode-se observar o perfil da temperatura nas diferentes porções do corpo de adultos em atividade ou em repouso de *C. megacephala*, aclimatados em diferentes temperaturas.

A análise estatística dos dados de temperatura das diferentes porções do corpo dos adultos, aclimatados em diferentes temperaturas, mostrou diferenças significantes entre: temperatura de aclimação ($F=85,13$; $p<0,0001$); estado de atividade ($F=423,67$; $p<0,0001$); porção do corpo ($F=17,54$; $p<0,0001$); temperatura de aclimação *estado de atividade ($F=16,09$; $p<0,0001$); estado de atividade*porção do corpo ($F=15,17$; $p<0,0001$).

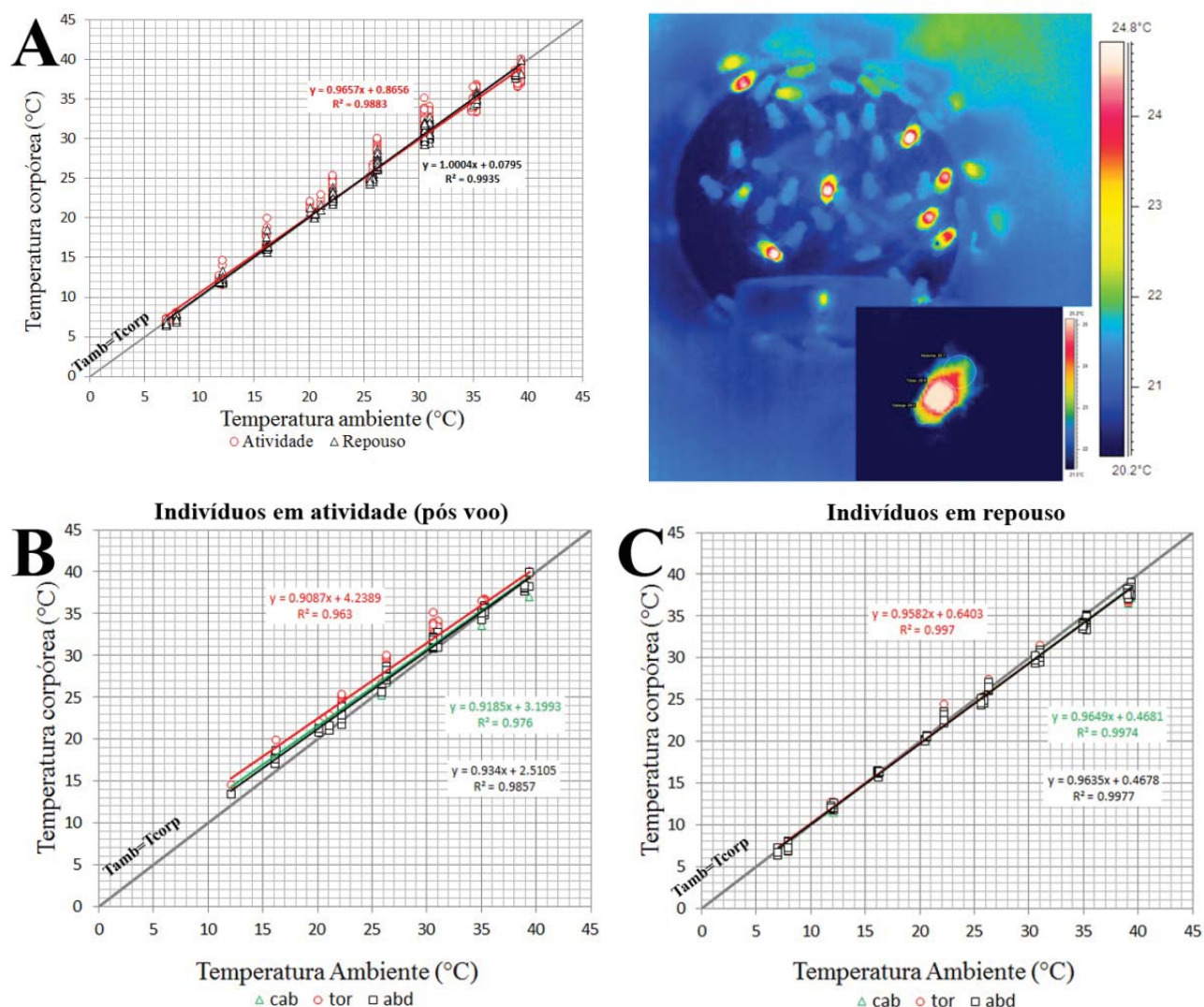


FIGURA 7. Perfil da temperatura de porções do corpo de adultos de *C. megacephala* em diferentes temperaturas e durante atividade ou repouso ($n=250$, temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C). A termografia ao lado mostra detalhes da obtenção da média da temperatura nas diferentes porções do corpo. A linha cinza no gráfico mostra os dados onde a temperatura ambiente é igual à corpórea, facilitando assim a comparação dos dados obtidos em *C. megacephala*.

Quando os indivíduos estão em atividade, houve diferença significativa entre a $T^{\circ}\text{corp}$ e $T^{\circ}\text{amb}$ em algumas das temperaturas em que os adultos foram aclimatados ($F=12,6$; $p<0,0001$), sendo que não foi observada diferença entre $T^{\circ}\text{corp}$ e $T^{\circ}\text{amb}$ nas seguintes temperaturas de aclimação: 35 °C e 40 °C. Vale ressaltar que não foi observada atividade nas temperaturas de 5 °C e 10 °C.

Pode-se constatar também, que os adultos de *C. megacephala* começam a entrar em atividade de voo quando o ambiente atinge 15 °C e permanecem ativos até a temperatura utilizada neste experimento, 40 °C, bem diferente do observado em moscas da neve (*Trichocera annulata*), as quais conseguem manter a atividade em temperaturas de 5 °C (LITTELWOOD, 1966). O pico de atividade de voo ocorreu em 30 °C (100% dos indivíduos ativos), sendo que acima deste valor, a quantidade de indivíduos voando foi reduzida (aproximadamente 12% em 15 °C, 28% de atividade em 35 °C e 40 °C, 40% em 25 °C e 48% em 20 °C).

Já para os indivíduos em repouso, pode-se observar diferença significativa entre a $T^{\circ}\text{corp}$ e $T^{\circ}\text{amb}$ em apenas três das temperaturas em que os adultos foram aclimatados (30 °C, 35 °C e 40 °C) ($F=37,02$; $p<0,01$), sendo a média da $T^{\circ}\text{corp} < T^{\circ}\text{amb}$. Não houve diferença entre a $T^{\circ}\text{corp}$ e $T^{\circ}\text{amb}$ dos adultos em repouso nas seguintes temperaturas de aclimação: 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C. Desta forma, os indivíduos em repouso e aclimatados em temperaturas acima de 25 °C começaram a utilizar alguns mecanismos para controlar a $T^{\circ}\text{corp}$ abaixo da $T^{\circ}\text{amb}$. Desta forma, pode-se constatar que o coeficiente angular das regressões lineares obtidas da $T^{\circ}\text{corp}$ e $T^{\circ}\text{amb}$ dos adultos em atividade e repouso (Figura 7) foi ligeiramente menor que 1, ou seja, na medida em que a temperatura aumenta, a $T^{\circ}\text{corp}$ tende a ser menor que a $T^{\circ}\text{amb}$. Uma redução na $T^{\circ}\text{cab}$ e $T^{\circ}\text{tor}$, quando ocorre um aumento da $T^{\circ}\text{amb}$, foi observada em *Apis mellifera* em atividade, por HEINRICH (1980a,b)

O mesmo padrão de reta para a regressão linear observada em laboratório (Figura 7) foi obtida em ambiente natural (Figura 8), no entanto, com coeficientes angulares bastante diferentes, talvez pela amostragem em ambiente natural envolver dois representantes da família Calliphoridae (*C. megacephala* e *C. albiceps*) e também pela atividade de movimentação das moscas ser muito maior em ambiente natural que a obtida em laboratório, no qual o recipiente impedia grandes deslocamentos. No ambiente natural, não foi possível observar indivíduos em repouso, pois as moscas eram atraídas pela carcaça do porco e consequentemente estavam ativas e em estado de imediato pós voo, quando apareciam.

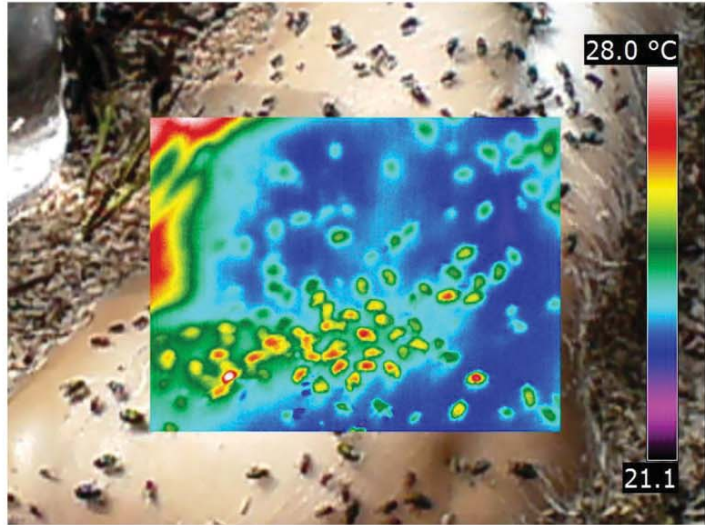
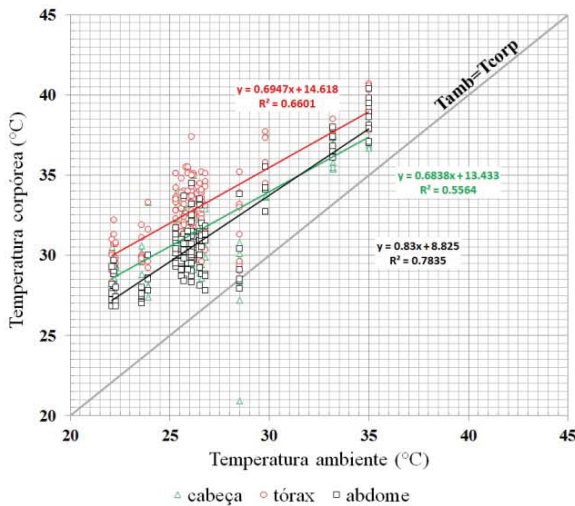


FIGURA 8. Perfil da temperatura de porções do corpo de adultos de moscas varejeiras (Calliphoridae) em diferentes temperaturas durante a atividade (n=150). A termografia ao lado mostra detalhes da obtenção dos dados dos indivíduos sobre a carcaça no ambiente. A linha cinza no gráfico mostra os dados onde a temperatura ambiente é igual à corpórea, facilitando assim a comparação dos dados obtidos em *C. megacephala*.

Assim, quando se observou os indivíduos em repouso ou pós voo em temperaturas mais elevadas, pode-se constatar uma tendência de regulação da temperatura corpórea em relação à temperatura ambiental (Figuras 7 e 8), ou seja, quanto maior a temperatura, maior a necessidade de controlar a temperatura corpórea por meio de processos ou mecanismos de termorregulação. Alguns mecanismos de adaptação térmica e termorregulação já haviam sido descritos e observados em diversas espécies de insetos (HEINRICH, 1993). Nas espécies de dípteros, já foram descritos mecanismos e adaptações para dissipação do calor durante o voo, tolerância ao frio, alterações na abertura e fechamento de espiráculos e a presença de correntes de convecção facilitando as trocas de calor (EDNEY & BARRAS, 1962; LITTELWOOD, 1966; KEVAN, 1972; BYERS, 1983; MORGAN *et al.*, 1985; HEINRICH, 1993; KOSHIMA, 1994).

O controle da temperatura corpórea ($T^{\circ}corp$) é um aspecto central da vida animal e, portanto, diversos animais investem tempo e energia consideráveis procurando manter a temperatura dentro de limites, os quais permitem otimização e melhor eficiência de processos fisiológicos e bioquímicos. Assim, quando a temperatura do corpo é elevada acima de determinados níveis, devido ao aumento da carga de calor, quer seja a partir da exposição a um ambiente quente ou a partir de um incremento na produção de calor metabólico, os animais exibem mecanismos para melhorar a dissipação de calor e, portanto, promover o abaixamento da $T^{\circ}corp$. Por exemplo, sob tensão térmica, alguns animais podem aumentar o fluxo sanguíneo em áreas nuas do corpo, que podem então atuar como janelas térmicas para dissipação de calor.

No entanto, se a temperatura do corpo e do ambiente continuar a ser elevada, a transferência do calor do corpo para o ambiente eventualmente pode não ser suficiente (ou possível) para manter a $T^{\circ}\text{corp}$ em um nível desejado. Neste caso, faz-se necessária a utilização de outros mecanismos, como a evaporação da água (580 cal / g H₂O), a qual pode ajudar na regulação da temperatura corporal do animal. Esta evaporação pode ocorrer de algumas maneiras, como por exemplo: 1) pela transpiração pelo suor ou pelo espalhamento de saliva sobre o corpo, como ocorre com mamíferos; 2) pela ofegação, observada em aves e outros mamíferos; 3) pelo comportamento de urinar ou defecar sobre a cauda, membros posteriores, e nos pés, observado em aves, lagartos, e outros mamíferos. Seja qual for o recurso utilizado, em todos os casos, a evaporação da água sobre a superfície do corpo vai roubar calor do animal, diminuindo sua $T^{\circ}\text{corp}$, uma forma eficaz de sistema de arrefecimento. Todas as formas anteriormente descritas envolvem a exteriorização de um fluido corpóreo para redução da temperatura do corpo do animal por meio da evaporação de parte deste fluido, fato também observado no díptero em estudo, *C. megacephala*.

Na Figura 9 e 10, é possível observar alguns resultados e gráficos obtidos por meio de termografia infravermelha, a qual mostra o interessante comportamento que *C. megacephala* apresenta para regular a $T^{\circ}\text{corp}$, quando algumas alterações de fatores ambientais ocorrem, como o aumento da $T^{\circ}\text{amb}$ e alteração no fotoperíodo.

O comportamento observado como processo de termorregulação no presente estudo, se baseia na movimentação de uma gota de saliva, a qual é exteriorizada e após um tempo (o qual varia aprox. 15s), re-ingerida. À medida que a gota de saliva é exteriorizada, a evaporação de água reduz a temperatura da gota em contato com ambiente externo em até 8 °C em relação ao ambiente (Figura 9B). Após a re-ingestão por parte da mosca, este meio arrefecido causa uma diminuição significativa na temperatura do corpo (Figuras 9A e 10). Um comportamento semelhante a esse, utilizando uma gota de saliva para redução da temperatura corpórea, já havia sido observado na abelha *Apis mellifera* (ESCH, 1976; HEINRICH, 1980a e 1980b). Esta abelha utiliza a evaporação da água da gota de saliva para reduzir a temperatura da cabeça e a porção anterior do tórax, quando o animal está em atividade de voo e exposto em laboratório a altas temperaturas ambiente, e quando a temperatura da cabeça atingia temperaturas acima de 45 °C (HEINRICH, 1980a e 1980b).

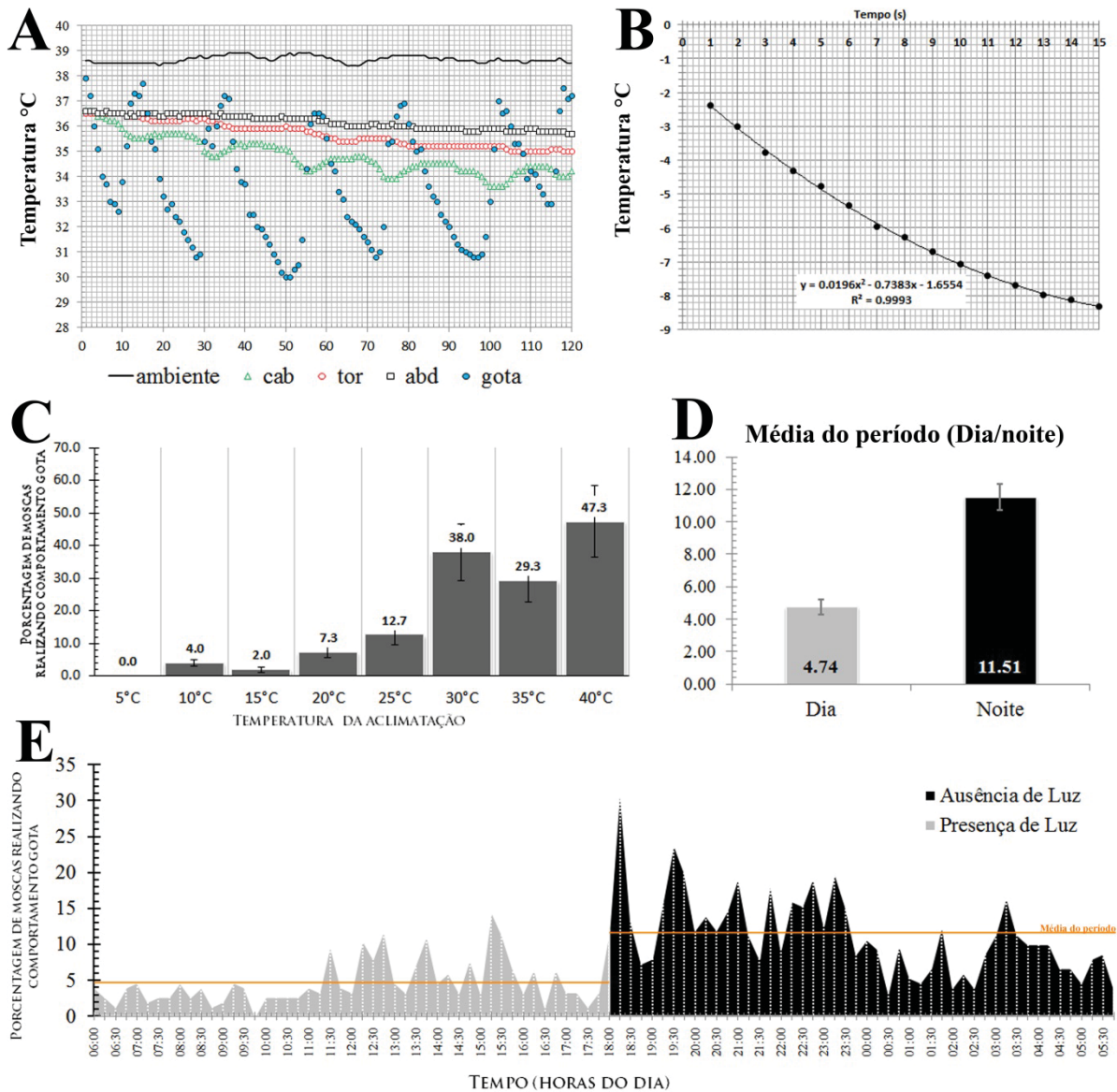


FIGURA 9. Perfil da temperatura de porções do corpo de adultos de *C. megacephala* durante o comportamento de termorregulação utilizando uma gota de saliva ($n=20$). **A:** Variação da temperatura durante comportamento de termorregulação em um indivíduo. **B:** Queda na temperatura da gota em relação ao tempo que ela fica exposta ao ambiente. **C:** Porcentagem deste comportamento sendo observada nas diferentes temperaturas de aclimação ($n=3$). **D e E:** Média e porcentagem de indivíduos realizando comportamento a cada 15min ao longo do dia na presença ou ausência de luz.

No entanto, este ato comportamental, que podemos definir como arrefecimento por fluxo salivar, foi obtido com as moscas pousadas na ausência de qualquer alimento e, portanto, não pode ser associado com a utilização da saliva, para fins digestivos (OSCHMAN & BERRIDGE, 1970; BAY, 1978), ou apenas para controle corpóreo durante ou após voo. Isto acaba confirmando o uso de termorregulação pela gota de saliva, sendo que foi observada uma correlação positiva entre a frequência do comportamento de arrefecimento salivar e a

temperatura ambiente (Figura 9C), em que a porcentagem de indivíduos exibindo este comportamento era de 0% a 5 °C e chegou a 47,3% a 40 °C.



FIGURA 10. Etograma em termografias mostrando a alteração da temperatura durante a realização deste comportamento de termorregulação, durante 170s (cab-cabeça; tor-tórax; abd-abdome).

Como observado anteriormente (Figuras 7 e 8), os indivíduos exibem uma grande termogênese na medida em que a temperatura do ambiente aumenta e começam a entrar em atividade (pré ou pós voo), que como observado, tem seu pico a 25 °C. No entanto, como discutido anteriormente, nas temperaturas acima de 25 °C, a T°corp começa a sofrer uma redução, chegando a ficar abaixo da T°amb em alguns momentos. Isso pode ser explicado da seguinte maneira: mesmo apresentando uma grande termogênese durante a atividade e voo, este calor pode ser dissipado sem problemas em temperaturas ambiente próximas a 25 °C, mantendo a temperatura corporal elevada e compatível com o desempenho de suas atividades. No entanto, quando a temperatura ambiente está acima de 25°C, pode-se perceber uma redução da atividade de voo e consequentemente um aumento do comportamento de arrefecimento salivar. Isto indica que se torna problemático dissipar a carga de calor produzido por termogênese, a temperaturas acima de 25 °C. Em temperaturas mais elevadas, as moscas tendem a cessar as suas atividades e priorizar a prevenção do superaquecimento.

Outro fator que atuou na frequência do comportamento de arrefecimento salivar foi o fotoperíodo, o qual interferiu na atividade dos indivíduos. Por exemplo, sob as mesmas condições controladas, o simples ato de apagar as luzes, que faz com que os indivíduos fiquem inativos, causou um aumento de mais de 100% no número de indivíduos exibindo o comportamento, como pode ser observado na Figura 9D e 9E.

Como durante o período de inatividade, a ingestão de fontes de energia é cessada, uma resposta comum observada entre organismos ecto e endotérmicos, é a diminuição da T°corp, que, por sua vez, reduz o gasto de energia metabólica. Assim, o comportamento de arrefecimento pelo fluxo de saliva também pode atuar neste sentido, para o díptero em questão. De fato, verificou-se que a frequência de arrefecimento salivar permanece elevada durante o período de inatividade total, resultando em uma diminuição média e significativa da temperatura corpórea em 3 °C ($F= 312$; $p<0,001$, $n=250$), quando se compara a T°corp na atividade com luz e o repouso na ausência de luz (Figura 11). Esta queda da temperatura pode trazer grandes benefícios ao indivíduo, reduzindo o custo metabólico durante o intervalo de tempo no qual o mesmo não possui acesso à fonte de alimento, já que depende da luz para obtenção de informações do meio. No entanto, seria interessante avaliar futuramente o Q10 das taxas metabólicas deste díptero em questão, avaliações estas não realizadas no presente trabalho.

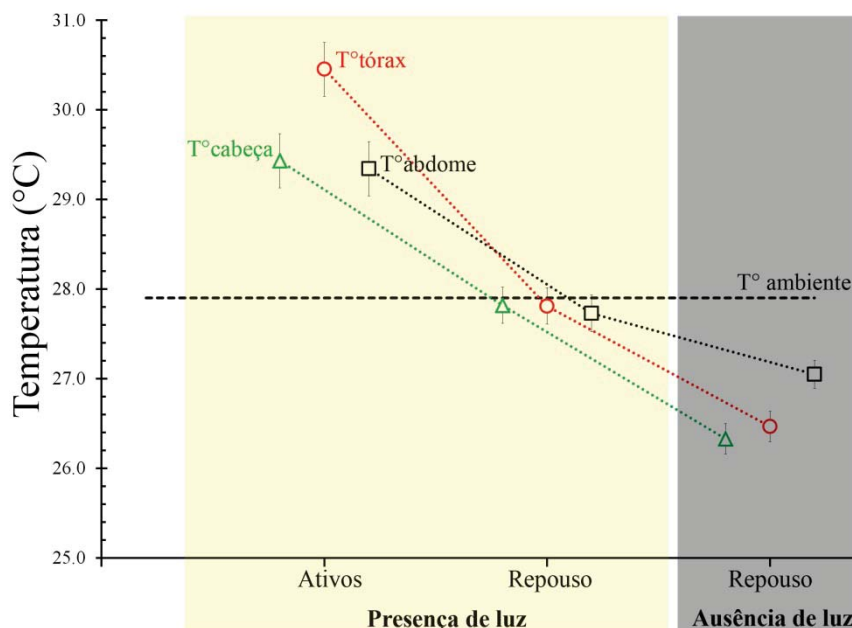


FIGURA 11. Variação da média de temperatura (n=250) e desvio padrão das diferentes porções do corpo de adultos de *C. megacephala* durante a atividade e repouso na presença e ausência de luz.

Os indivíduos em repouso durante a presença de luz, apresentaram uma temperatura significativamente maior que os indivíduos em repouso na ausência da luz (Figura 11). Vale a pena ressaltar que em todos os casos, estes valores foram obtidos para o mesmo grupo de indivíduos aclimatados em temperatura constante (27 °C) e umidade relativa ($60 \pm 10\%$).

Desta forma, pode-se constatar que os adultos de *C. megacephala* apresentam um comportamento de termorregulação, quando ocorrem alterações em alguns fatores abióticos, como aumento da temperatura ambiente e ausência de luz. No entanto, seria interessante testar este comportamento alterando a umidade relativa no ambiente, e procurar relacionar também com o gasto metabólico em diferentes temperaturas.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram alterações na temperatura das diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, quando influenciadas por tratamentos, como por exemplo: presença de drogas, alterações de fotoperíodo, alterações de substratos alimentares, alterações de temperatura e variações temporais.

No estágio larval, pode-se observar que a presença de larvas aumentou de forma distinta a temperatura do conjunto agregado+substrato alimentar, de acordo com o efeito de cada

tratamento. A presença de drogas aumentou a temperatura média em relação ao tratamento Dieta/larvas, principalmente nos primeiros dias do desenvolvimento. A alteração de fotoperíodo também aumentou a temperatura média do conjunto, quando se compara com o tratamento Dieta/larvas. As larvas que se desenvolveram em carne, apresentaram uma grande aceleração da fase larval, o que refletiu na maior termogênese, ou seja, a temperatura do conjunto larvas+carne foi muito maior do que em todos os outros tratamentos.

Na análise dos adultos, pode-se concluir que a atividade de *C. megacephala* é bastante dependente da luz, e apresentou dois picos ao longo do dia, o primeiro logo após a presença da luz e, o segundo, horas antes da luz se apagar, talvez devido à própria temperatura do ambiente ser um fator limitante aos adultos, quando a $T^{\circ}\text{amb}$ se torna bastante alta. Este fato também foi comprovado, pois acima de temperaturas de 25 °C, a atividade dos adultos é reduzida.

Em relação à atividade nos tratamentos com drogas e fotoperíodo, foi possível observar alterações na temperatura corpórea principalmente nos tratamentos com presença de drogas ou se havia a presença ou ausência total de luz durante o desenvolvimento, ou seja, a luz alterou o ciclo circadiano da espécie.

Em relação ao efeito da temperatura sobre os adultos de *C. megacephala*, pode-se perceber que a atividade dos mesmos é bastante alterada, diminuindo em temperaturas acima de 25 °C e abaixo de 15 °C, sendo que o pico ocorreu em torno de 25 °C. Também foi possível descrever um comportamento interessante de termorregulação destes indivíduos, que foi definido como arrefecimento pelo fluxo salivar, no qual o indivíduo podia reduzir sua $T^{\circ}\text{corp}$ em ambientes com altas temperaturas ou durante momentos de inatividade, após o início da ausência de luz no ambiente.

Referências Bibliográficas

- ALAHOTUS, S. N.. Heat shock proteins: A new view on temperature compensation. Comp. Biochem. Physiol. 75B:379-387, 1983.
- ANDERSON, S.L.; SEDGLEY, M.; SHORT, J.R.T. & ALLWOOD, A.J. 1982. Insect pollination of mango in northern Australian *Mangifera indica*, includes *Apis mellifera*. **Australian Journal of Agricultural Research**, 33(3):541-548, 1982.
- ATKINSON, W. D., & B. SHORROCKS. Competition on a divided and ephemeral resource: a simulation model. J. Anim. Ecol. 50:461-471, 1981.

- BARROS-CORDEIRO, K.B. & PUJOL-LUZ, J. R. . Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, p. 709-717, 2010.
- BARTHOLOMEW, G A, & LIGHTON, J R B. Endothermy and energy metabolism of a giant tropical fly, *Pantophthalmus tabaninus* Thunberg. **J. Comp. Physiol. B** 156:461-467, 1986.
- BAUGARTNER, O. L. & GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. **Journal of Medical Entomology** 21:105-113, 1984.
- BAY, C. M. H. The secretion and action of digestive enzymes of the salivary glands of the blowfly, *Calliphora*. **J. Insect Physiol.**, 1978. Vol. 24. pp. 141 - 149, 1978.
- BYERS, G. W.. The crane fly genus *Chionea* in North America. Univ. Kansas Sci. Bull. 52:59-195, 1983.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annu. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 4th edition, Cambridge, 770p, 1998.
- CHAPPELL, M. A., AND K. R. MORGAN. Temperature regulation, endothermy, resting metabolism, and flight energetics of tachinid flies (*Nowickia* sp.). **Physio. Zool.** 60:550-559, 1987.
- CLARK, K.; EVANS, L. AND WALL. R.. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. **Forensic Sci. Int.**, 156 (2-3): 145-149, 2006.
- CRAVEL, J. D., AND M. F. CLAVEL. Influence de la temperature sur le nombre, le pourcentage d' eclosion et la taille des oeufs fondus par *Drosophila melanosaster*. **Ann. Soc. Entomol. Fr.** 5:161-177, 1969.
- CZAJKA, M., AND R. E. LEE, JR. A rapid COLD-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanosaster*. **J. Exp. Bioi.** 148:245-254, 1990.
- EDNEY, E. B., AND R. BARRASS. The body temperature of the tse-tse fly, *Glossina morsitans* Westwood (Diptera, Muscidae). **J. Insect Physiol.** 8:469-481, 1962.
- ESCH, H.. Body temperature and flight performance of honeybees in a servo-mechanically controlled wind tunnel. **J. comp. Phys.** 109, 262-277, 1976.
- EVANS, A.V. The physiology of the sheep blowfly *Lucilia sericata* Meig. (Diptera). **Transactions of the Royal Entomological Society**, 85, 363-378, 1936.

- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA, G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GABRE, R. M.; F. F. ADHAM & H. CHI. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologica** 27: 179–183, 2005.
- GOMES, L., GOMES, G., OLIVEIRA, H. G., QUEIROZ, M. M. C., VON ZUBEN, C. J. Post-feeding larval dispersal in blowflies during summer and winter seasons in southeast Brazil. **Acta Zoologica Sinica**, 58: 176-182, 2008.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GOODBROD, J. R., & M. L. GOFF. Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture. **J. Med. Entomol.** 27: 338 -343, 1990.
- GRASSBERGER, M. & C. REITER. Effect of temperature on development of the forensically important Holarctic blow fly *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International** 128: 177–182, 2002.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 83: 1210-1214, 1990.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol**, 12: 257-266, 1987.
- HEINRICH, B. **Insect Thermoregulation**. New York: Wiley, 1981.
- HEINRICH, B. Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*. I. Regulation of head temperatures. **J. Exp. Biol.** 85, 61-72. 1980a.
- HEINRICH, B. Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*. II. Regulation of thoracic temperatures at high air temperatures. **J. Exp. Biol.** 85, 73-87. 1980b.
- HEINRICH, B. **The Hot-Blooded Insects**. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1993.
- HEINRICH, B. Thermoregulation in endothermic insects. **Science** 185:747-756, 1974.

- HOSGOOD SMW & PARSONS PA. Polymorphism in natural populations of *Drosophila* for the ability to withstand temperature shocks. **Experientia** 24: 727-728, 1968.
- 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: 35-39, 1977.
- JONASSON, B. & SALDEEN, T. – Citalopram in fatal poisoning cases. **Fosensic Science International** 126 (2002) 1-6, 2002.
- KEVAN, P. G.. Heliotropism in some Arctic flowers. **Can. Field Nat.** 86:41-44. 1972.
- KIMURA, M. T. Adaptations to temperate climates and evolution of overwintering strategies in the *Drosophila melanogaster* species group. **Evolution** 42: 1288-1297, 1988.
- KOCAREK, P. Diurnal patterns of postfeeding larval dispersal in carrion blowflies (Diptera, Calliphoridae). **European Journal of Entomology** 98: 117–119, 2001.
- KOHSHIMA, S. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. **Nature** 30:225-227, 1984.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LITTLEWOOD, S. C. Temperature threshold for flight of *Trichocera annulata* (Meigen) (Dipt., Trtchoceridae). **Entomol. Mon. Mag.** 102:15-18, 1966.
- LOMNICKI, A.. **Population ecology of individuals**. Princeton: Princeton Press, 233 p., 1988.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MAYNARD SMITH, J. Temperature and rate of aging in poikilotherms. **Nature** 199:400-402, 1963.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARRARO, M.V.; MARTINS, C.; MOREIRA, O.I.; CRUZ, M. & SERAFIN, I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4):793-798, 1996.
- MORGAN, K. R., AND B. HEINRICH. Temperature regulation in beeand wasp-mimicking syrpbid flies. **J. Exp. Biol.** 133:59-71, 1987.

- MORGAN, K. R., T. E. SHELLY, AND L. S. KIMSEY. Body temperature regulation, energy metabolism, and wing loading in light-seeking and shade-seeking robber flies. **J. Comp. Physiol. B** 151:561-570, 1985.
- MORRISON, W. W., AND R. MILKMAN. Modification of heat resistance in *Drosophila* by selection. **Nature** 273 :49-50, 1978.
- MURPHY, P. A., J. T. GIESEL, AND M. N. MANLOVE. Temperature effects on life history variation in *Drosophila simulans*. **Evolution** 37:1181- 1192, 1983.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances**. Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense – Quando os insetos são vestígios**. Campinas: Millennium, 2003. ISBN: 85-7625-001-2
- OSCHMAN J. L. & BERRIDGE M. J. Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. **Tissue and Cell** 2. 281-310, 1970.
- OWENS, N. C., OOTSUKA, Y., KANOSUE, K., MCALLEN, R. M. Thermoregulatory control of sympathetic fibers supplying the rat's tail. **J. Physiol.**, 543: 849–858, 2002.
- PARSONS, P. A. Boundary conditions for *Drosophila* resource utilization in temperate regions, espedally at low temperatures. **Am. Nat.** 112: 1063-1074, 1978.
- PESSÔA, S. B. & MARTINS A. V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara, 11ª edição, Rio de Janeiro, p. 872, 1988.
- PHILLIPS, P. K., HEATH, J. E. Heat exchange by the pinna of the African elephant (*Loxodonta africana*), **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, Vol.101, pp.693–699, 1992.
- RANDALL, D. BURGGREN, W. FRENCH, K. **Fisiologia animal - mecanismos e adaptações**. Ed. Guanabara. Rio de Janeiro. 2000.
- REIS, S.F.; G. STANGENHAUS, W.A.C. GODOY, C.J. VON ZUBEN & O.B. RIBEIRO. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.
- RICHARD, W. & SHEARER, D. **Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance**. London: Springer, 1997.
- RICHARDS, C. S. PRICE B. W. & VILLET, M. H. Thermal ecophysiology of seven carrion-feeding blowflies in Southern Africa. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 131: 11–19, 2009.

- RICHARDS, D. S., SAUNDERS, D. S., EGAN, V. M., THOMSON, R. C. K. The timing of larval wandering and puparium formation in the flesh-fly *Sarcophaga argyrostoma*. **Physiol. Entomol.**, 11: 53–60, 1986.
- ROBERTS, S. P. & HARRISON, J. F. Mechanisms of thermoregulation in flying bees. **Amer. Zool.** 38, 492-502, 1998.
- SAS Institute Inc., **SAS User's Guide: Statistics**, Version, 8th Edition, Cary, NC, USA, 2001.
- SCHNEBEL, E. M., AND J. GROSSFIELD. Mating-temperature range in *Drosophila*. **Evolution** 38: 1296-1307, 1984.
- SLONE, D.H. AND S.V. GRUNER. Thermoregulation in Larval Aggregations of Carrion-Feeding Blow Flies (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology** 44(3):516-523, 2007.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SMITH, P. H., DALLWITZ, R., WARDHAUGH, K. G., VOGT, W. G., WOODBURN, T. L. Timing of larval exodus from sheep and carrion in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 30(2): 157-162, 1981.
- STONEHOUSE, J., MUMFORD, J., POSWAL, A. MAHMOOD, R., MAKHDUM, A. H., CHAUDHARY, Z. M., BALOCH, K. N., MUSTAFA, G. & MCALLISTER, M. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: tephritidae). **Crop Protection**, 23: 293–296, 2004.
- SULAIMAN, S.; SOHADI, A.R. & JEFFERY, J. Human helminth parasite burdens on cyclorrhaphan flies (Diptera) trapped at an aboriginal settlement in Malaysian. **Bulletin of Entomological Research**, 79(4):625-629, 1989.
- SULAIMAN, S.; SOHADI, A.R.; YUNUS, H. & IBERAHIM, R. 1988. The role of some cyclorrhaphan flies as carriers of human helminthes in Malaysian. **Medical and Veterinary Entomology**, 2(1):1-6, 1988.
- TATTERSALL, G. J. ; ANDRADE, D. O. V. ; ABE, A. S. . Heat Exchange from the Toucan Bill Reveals a Controllable Vascular Thermal Radiator. **Science**, v. 325, p. 468-470, 2009.
- TRIPLEHORN, C A & JOHNSON, F J. **Estudo dos insetos** - Tradução da 7ª edição de Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects, Editora Cenage Learning, 816 p., 2011.
- VÉLEZ, M.C. & WOLF, M. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 48:41-47, 2008.

- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- VON ZUBEN, C. J.; STANGENHAUS, G.; GODOY, W.A.C.. Competição Larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Efeitos de Diferentes Níveis de Agregação Larval sobre Estimativas de Peso, Fecundidade e Investimento Reprodutivo. **Rev. Bras. Biol.**, 60 (2): 195-203, 2000.
- WALL R, FRENCH N & MORGAN KL. Development of an attractive target for the sheep blowfly *Lucilia sericata*. **Medical and Veterinary Entomology** 6: 67–74, 1992.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WILLIAMS, H & RICHARDSON, A. M. M. Growth energetics in relation to temperature for larvae of four species of necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae). **Australian Journal of Ecology** Volume 9, Issue 2, pages 141–152, 1984.
- WILLIAMS, K A, & VILLET, M H "A new and earlier record of *Chrysomya megacephala* in South Africa, with notes on another exotic species, *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae)". **African Invertebrates** 47: 347–350, 2006.
- WORM, K., DRAGSHOLT, C., KRINGSHOLM, B., Citalopram concentrations in samples from autopsies and living persons, **Int. J. Leg. Med.** 111, 188-190, 1998.

CAPÍTULO 4

NEUROFISIOLOGIA DO SISTEMA VISUAL DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (F.)
(DIPTERA:CALLIPHORIDAE): INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA
RESPOSTA DO NEURÔNIO H1.

RESUMO

A neurociência busca a compreensão do sistema nervoso e de capacidades cognitivas do ser humano e de animais, sendo uma das áreas de pesquisa mais fascinantes nos dias atuais. Porém, o estudo e a compreensão do sistema nervoso de qualquer animal permanecem sendo um dos maiores desafios da ciência, por se tratar de um sistema bastante complexo, altamente eficiente e com plasticidade. Esta dificuldade está presente desde sistemas complexos como o cérebro de um primata, até sistemas mais simples como o sistema nervoso de invertebrados, porém com funcionamento semelhante aos dos primatas. Desta forma, inúmeros trabalhos procurando compreender o funcionamento do sistema nervoso vêm sendo realizados com invertebrados (insetos), pela facilidade metodológica que eles permitem, e têm contribuído com importantes informações para a neurociência. Assim, o objetivo deste trabalho é procurar dar contribuição a um melhor conhecimento de como alguns fatores no ambiente, durante o desenvolvimento do díptero *C. megacephala*, poderiam afetar partes da percepção sensorial, avaliando-se a resposta do neurônio H1 do sistema visual, durante seu estágio adulto. Este estudo pode auxiliar na compreensão da biologia e comportamento da espécie, o que pode trazer benefícios nas diversas áreas de estudo em que *C. megacephala* tem sua importância. Os fatores estudados foram: alterações de fotoperíodo (fotoperíodo 0H e 24H) e a presença de substâncias químicas (Citalopram e Diazepam) durante estágios de desenvolvimento deste díptero, além do efeito da idade dos adultos analisados, sendo realizado um tratamento controle (Fotoperíodo 12h e com ausência de drogas). Nenhuma diferença foi constatada no tempo de resposta do neurônio H1 após estimulação, entre todos os tratamentos. No entanto, as moscas tratadas com alterações no fotoperíodo apresentaram menores taxas de disparo e maiores tempos entre spikes neurais, ou seja, a ausência ou presença de luz deve ter alterado, ou alguma via sensorial anterior a resposta do neurônio H1, ou a própria resposta desse neurônio. A presença das drogas também reduziu as taxas de disparo e aumentou o tempo entre spikes neurais, principalmente para os indivíduos mais jovens, talvez devido ao fato da droga estar presente apenas durante o estágio larval, com efeitos persistindo apenas no início da fase adulta. Pode-se observar também um aumento da taxa de disparos na medida em que os indivíduos ficavam mais velhos, em todos os tratamentos.

Palavras chave: Moscas-varejeiras, neurociência, sistema visual, neurofisiologia, neurônio H1.

INTRODUÇÃO

A Neurociência é uma área de pesquisa que abrange questionamentos sobre como os sistemas nervosos são organizados, e como funcionam para gerar os comportamentos (PURVES *et al.*, 2004; LENT, 2005), procurando-se compreender como a informação é transmitida do meio externo, captada por órgãos sensoriais e processada internamente nos tecidos biológicos, ou seja, ao nível celular neural (mensageiros químicos e impulsos neurais) (KANDEL *et al.*, 2000; PURVES *et al.*, 2004; LENT, 2005). A base celular do sistema nervoso nos animais é formada por células glia e neurônios, sendo bem maior a proporção de células glia em relação aos neurônios (LANE, 1985; KANDEL *et al.*, 2000; PURVES *et al.*, 2004; LENT, 2005). No entanto, o elemento funcional e básico do sistema nervoso é o neurônio, o qual possibilita a transmissão e o processamento da informação do meio externo, capturada pelos receptores sensoriais e transmitida e processada pelo sistema nervoso central ou periférico (KANDEL *et al.*, 2000; PURVES *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, diversos trabalhos estão mudando conceitos e acrescentando informações ao estudarem o sistema nervoso, e dentre eles merecem destaque: a aceitação da neurogênese em adultos de diversos animais (CAYRE *et al.*, 2002), trabalhos envolvendo interface cérebro/máquina e modelagem matemática (NICOLELIS, 2002; BRUNEL *et al.* 2003; CANGELOSI & PARIS, 2004; GROSSEBERG *et al.*, 2004; OZTOPA *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2007; CHAMINADE *et al.*, 2008) e novas técnicas de gravação com multieletródos (NICOLELIS & RIBEIRO, 2002).

Uma das mais fascinantes áreas de pesquisa nos dias atuais é a compreensão e simulação de capacidades cognitivas do ser humano e de animais. Uma possibilidade futura desta compreensão seria produzir máquinas capazes de exibir um comportamento inteligente, como se fossem reações e emoções humanas, trabalhos estes que permitiriam compreender melhor o funcionamento deste sistema dinâmico complexo, o que permitirá melhoras nos tratamentos de doenças, deficiências motoras ou sensoriais e na obtenção de ferramentas mais sofisticadas na área de tecnologia (NICOLELIS, 2002; DE CASTRO & TIMMIS, 2002; BRUNEL *et al.* 2003; KIM *et al.*, 2003; RIND, 2004; DE CASTRO & VON ZUBEN, 2004; CHENG *et al.*, 2007; CHAMINADE *et al.*, 2008). Assim, a natureza está servindo como fonte de inspiração para a computação, robótica, e inversamente, os resultados obtidos têm contribuído para o melhor entendimento da biologia, sendo que estes estudos são definidos como bio-inspirados.

No entanto, até o momento, muitas características cognitivas do cérebro humano ou de animais ainda não puderam ser reproduzidas por meio de máquinas e suas linguagens

matemáticas, devido à alta complexidade desta rede biológica existente no cérebro, além de variáveis ainda não conhecidas e necessidade de maiores avanços na tecnologia a ser empregada (KOCH & LAURENT, 1999; BASAR & GUNTEKIN, 2007). Desta forma, o estudo e a compreensão do sistema nervoso permanecem sendo um dos maiores desafios da ciência, devido a sua alta complexidade e plasticidade (KOCH & LAURENT, 1999). Esta dificuldade está presente desde sistemas complexos como o cérebro de um primata, até sistemas mais simples como o sistema nervoso de invertebrados (CHRISTENSEN, 2004), porém com funcionamento semelhante ao dos primatas. Desta forma, inúmeros trabalhos procurando compreender o funcionamento do sistema nervoso vêm sendo realizados com invertebrados (insetos), pela facilidade metodológica que eles permitem, e têm contribuído com importantes informações para a neurociência (CHRISTENSEN, 2004).

Entre os animais, o cérebro de um primata, como o humano, apresenta bilhões de neurônios, os quais se interligam por milhares de conexões, apresentando assim um sistema de rede bastante complexo e que possui grande eficácia e capacidade de processamento (KOCH & LAURENT, 1999; KANDEL *et al.*, 2000; LENT, 2005). Já em invertebrados, dentre eles os insetos, o número de neurônios é bem menor, mas a complexidade do sistema nervoso ainda é bastante alta (CHAPMAN, 1998; BORST & HAAG, 2002).

Devido à complexidade cerebral, estudos multidisciplinares unindo diversas áreas científicas para compreensão e interpretação de informações obtidas deste sistema, são necessários na neurociência (BRUNEL *et al.* 2003). Existem inúmeros trabalhos que procuram analisar a forma como a informação do exterior, captada por sistemas sensoriais, é transmitida para o sistema nervoso central e processada nesta imensa rede biológica. Dentre estes trabalhos, estudos envolvendo o sistema óptico, a transmissão da informação, e como ocorre o processamento e tradução desta informação no sistema nervoso central, vêm sendo amplamente realizados (STAVENGA, 2004), sendo que animais modelos que vêm sendo utilizados nestes estudos são insetos da ordem Diptera, família Calliphoridae, pela facilidade metodológica que eles oferecem (STEVENICK *et al.*, 1997; STRONG *et al.*, 1998; STAVENGA, 2004; GUIDO *et al.*, 2006).

Assim, os estudos do processamento da informação em redes neurais biológicas são de grande interesse na neurociência, pois permitirão a compreensão sistêmica de processos envolvidos na complexidade deste tecido biológico. Porém, há a necessidade de estudos que permitam a integração de resultados biológicos de diferentes níveis celulares, desde o nível celular até estudos sensoriais de animais *in vivo*.

Os insetos, assim como todos os animais, possuem múltiplos canais sensoriais que extraem a informação do meio externo e a convertem em respostas comportamentais e memória (HOMBERG, 2005). A maioria dos neurônios nos insetos são monopolares, ou seja, possuem uma única projeção no corpo celular; já as células periféricas são bipolares, recebendo estímulos do ambiente e transmitindo para um gânglio central. Algumas células multipolares que possuem muitas ramificações ocorrem nos gânglios do sistema nervoso, recebendo inúmeras informações oriundas do ambiente, informações estas que são transmitidas por neurônios bipolares (CHAPMAN, 1998).

Assim, a compreensão de como a informação é transmitida e processada entre os diferentes sistemas sensoriais dos animais é de extrema importância, e na maioria deles, a visão merece especial atenção, sendo que seu processamento é bastante complexo (CALVERT, 2001; EGELHAAF *et al.*, 2004). Os insetos, particularmente os dípteros, possuem um sistema visual bastante elaborado, constituído por um par de olhos compostos cobrindo a maior parte da cabeça e geralmente três ocelos, posicionados na porção superior da mesma (CHAPMAN, 1998, RUPPERT & BARNES, 2005; STAVENGA, 2004).

Os olhos compostos apresentam milhares de omatídeos, os quais são formados por um aparato dióptrico, com lentes e células fotorreceptoras, que recebem a informação do ambiente e induzem sinais elétricos neurais. Pela grande quantidade de omatídeos, o processamento desta informação obtida pelo estímulo luminoso é complexo e necessita de uma grande eficiência e rápida resposta comportamental e motora dos insetos, pois os insetos em geral fazem um uso eficiente da informação visual durante, por exemplo, o comportamento de acasalamento (LAND & COLLET, 1974; WAGNER, 1986; BOEDDEKER *et al.*, 2003; BOEDDEKER & EGELHAAF, 2003) e também na localização espacial, no caso específico de abelhas (ESCH & BURNS, 1996; SRINIVASAN *et al.*, 2000; ESCH *et al.*, 2001).

Esta extraordinária capacidade é possível apesar da presença de um pequeno número relativo de neurônios presentes no cérebro dos insetos, os quais processam as imagens da retina de uma forma surpreendentemente rápida (EGELHAAF *et al.*, 2004). Alguns dos animais-modelo que vêm sendo utilizados nestes estudos do sistema visual, são as moscas-varejeiras (STEVENINCK *et al.*, 1997; STRONG *et al.*, 1998; STAVENGA, 2004; GUIDO *et al.*, 2006). Nestes dípteros, a informação é captada pelos omatídeos e suas células fotorreceptoras, sendo a mesma transmitida a neurônios que a recebem de forma integrada (CHAPMAN, 1998; STAVENGA, 2004). Estes neurônios são ativados por diferentes tipos de estímulos visuais. No caso destes insetos, um dos principais neurônios utilizados nos estudos é o H1, que se

encontra na placa lobular logo atrás dos fotorreceptores e corresponde à região do córtex em primatas (STAVENGA, 2004).

Por ser um sentido que serve como guia para comportamentos, em praticamente todos os animais, o processamento da informação visual e interpretação pelo cérebro apresentam grande complexidade, devido à flutuação dos padrões da imagem quando o animal se movimenta no ambiente, ou seja, existe uma entrada de informação espaço-temporal complexa (EGELHAAF *et al.*, 2004).

Desta forma, o estudo da neurofisiologia destes dípteros pode auxiliar bastante na compreensão da complexidade do sistema nervoso em insetos, caracterizando assim, a importância dessas moscas também em estudos envolvendo as neurociências, além de outros fatores descritos a seguir.

As moscas-varejeiras, como *C. megacephala* têm grande importância médico-sanitária (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983; FURLANETTO *et al.* 1984), além de serem de fundamental importância em entomologia forense (WELLS & GREENBERG, 1992; VON ZUBEN *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2003;). Esta espécie apresenta uma grande importância nos estudos forenses, por ser uma das mais abundantes e que primeiro chegam aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978) e também por se alimentar dos mesmos durante seu estágio larval, podendo assim indicar o intervalo pós-morte (IPM) (SMITH, 1986; CATTS & GOFF, 1992), que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo (CATTS & GOFF, 1992), dado de extrema importância nas investigações médico-criminais.

Diversas drogas lícitas ou não, utilizadas direta ou indiretamente, vêm sendo encontradas em cadáveres, devido ao abuso no uso e podendo estar relacionadas à causa da morte (CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994; ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003). Os insetos que se alimentam do substrato em decomposição durante seu desenvolvimento, podem ter o desenvolvimento alterado pela presença de drogas (CATTS, 1992; CATTS & GOFF, 1992). Caso haja a presença de alguma substância química no substrato de alimentação larval, esta pode atuar sobre os indivíduos interferindo nos processos de transmissão neural, inibindo ou ativando os mensageiros químicos, causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento dos organismos em contato com a mesma (HAYNES, 1988; OMOTO, 2000), mudanças estas que podem prejudicar a estimativa do IPM (CATTS, 1992; CATTS & GOFF, 1992).

Assim sendo, os estudos toxicológicos para se verificar a presença de drogas no cadáver, e o efeito destas drogas nos insetos, são extremamente importantes para a ciência forense, sendo que se podem observar diferentes efeitos de drogas distintas nas diferentes espécies de insetos necrófagos (CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; SADLER *et al.*, 1997; GOFF *et al.*, 1997; BOUREL *et al.*, 2001; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; CAMPOBASSO *et al.*, 2004). Estes estudos envolvem a entomotoxicologia, ciência que procura quantificar e analisar o efeito de diferentes drogas sobre os insetos e também na taxa de desenvolvimento larval (GOFF & LORD, 1994; INTRONA *et al.*, 2001), que é de grande importância em uma estimativa mais precisa do intervalo pós-morte (IPM).

No presente trabalho, procurou-se avaliar a atividade de um neurônio sensível a movimentos horizontais, neurônio H1, como resposta a um estímulo dependente do tempo, presente no duto óptico do sistema visual da mosca-varejeira *C. megacephala*. Os dípteros em geral despertam grande interesse nos estudos científicos devido ao grande número de espécies descritas, fácil manutenção sob condições experimentais, rápida produção de grande número de descendentes, além de permitirem a realização de horas de aquisições eletrofisiológicas *in vivo*. Além disso, a escolha deste animal deve-se também ao fato de que certos estágios do sistema visual da mosca já serem bastante conhecidos e alguns de seus neurônios serem identificados e exaustivamente estudados há décadas (HAUSEN, 1981; HAUSEN, 1982ba; HAUSEN 1982b; HAAG *et al.*, 1999; HAAG & BORST, 2001; FRYE & DICKINSON, 2001; BORST & HAAG, 2002; FARROW *et al.* 2003).

Apesar do extenso conhecimento de sua morfologia, o desempenho coletivo de seus neurônios, capazes de processar informação sensorial e reagir em alguns milésimos de segundos, ainda é algo não completamente entendido (HUSTON & KRAPP, 2008; HOUGHTON & SEN, 2008; HAAG & Borst, 2008; NEMENMAN, 2008; SPAVIERI, 2009; KRAPP, 2009; KURTZ, 2009). Quando um animal necessita se locomover, desviar de obstáculos, localizar um predador ou uma presa, ele utiliza a informação visual que chega na forma de padrões do fluxo óptico, que permitem ao animal estimar seu próprio movimento e relacionar com o movimento de outros objetos em seu campo visual. A mosca utiliza esta informação visual e seus mecanismos de voo extremamente eficientes para ajustar sua velocidade e realizar impressionantes acrobacias aéreas (LAND & COLLET, 1974; BUELTHOFF *et al.*, 1980; WEHRHAHN *et al.*, 1982; WAGNER, 1985). Ou seja, o cérebro da mosca é capaz de codificar e utilizar uma grande quantidade de informação visual em uma curta escala temporal, mesmo seu aparato cerebral sendo extremamente simples se comparado ao cérebro de outros animais

e de humanos, possuindo apenas aproximadamente um milhão de neurônios comparado aos 100 bilhões estimados no cérebro humano.

Estas propriedades impressionantes de voo fizeram com que as moscas fossem estudadas com bastante frequência nas últimas décadas, tanto em relação aos seus aspectos aerodinâmicos como neurofisiológicos (LAND & COLLET, 1974; BUELTHOFF *et al.*, 1980; WEHRHAHN *et al.*, 1982; HAUSEN, 1982; WAGNER, 1985; DICKINSON *et al.*, 1999; FRYE, 2001; BORST & HAAG, 2002; FERNANDES *et al.*, 2010).

O sistema visual da mosca – neurônio H1

As moscas possuem uma excelente capacidade de voo, característica importante que auxilia na fuga de predadores e na perseguição de parceiros para a reprodução, garantindo a manutenção da espécie, sendo que a principal informação obtida do meio durante a movimentação no voo é a luz, por meio de um sistema visual bastante eficiente.

Anatomicamente e morfolologicamente, o sistema visual da mosca pode ser dividido em: Olho Composto, Lâmina, Medula, Lóbula e Placa lobular. Este sistema envolve a captação de informações sensoriais por exteroceptores e gera respostas neuromotoras adequadas dos músculos envolvidos com o voo deste inseto (FRANCESCHINI, 1982; HAUSEN, 1982; FRYE, 2001).

Dentre essas estruturas, os olhos compostos são os responsáveis pelo início do processamento, captação e transdução da informação da onda eletromagnética em impulsos elétricos no sistema visual. Para isto, os olhos são formados por uma rede hexagonal de aproximadamente 5 mil omatídeos (SUKONTASON *et al.*, 2008), e cada um com oito células fotorreceptoras (R1-R8) sensíveis a comprimentos de onda na região do ultravioleta, azul e verde (HARDIE, 1979; HARDIE, 1985; BRISCOE & CHITTKA, 2001; HAUSEN, 1982a). Estas células fotorreceptoras fazem a transdução da luz em sinais elétricos, por meio de despolarização de membranas (TATLER, *et al.* 2000; SCHWERMER, 1989; VOGT & KIRSCHFELD, 1984; VOGT, 1983).

Após esta conversão em sinais elétricos, a Lâmina recebe parte destes sinais e começa a processar a informação, ou seja, apenas a variação da intensidade luminosa em relação a sua média é codificada (LAUGHLIN, 1982 e 1989), processo importante devido à variação da intensidade da luz ao longo do dia. Ou seja, a Lâmina é responsável pelo empacotamento da informação visual, oferecendo sinais mais robustos para os níveis superiores de processamento.

Toda esta informação pré-processada pela Lâmina se torna o sinal de entrada da Medula, a qual está ligada à computação e extração de parâmetros visuais tais como direção, orientação, velocidade e contraste (STRAUSFELD, 1982; LAUGHLIN, 1982; DOUGLASS & STRAUSFELD, 2003b). A informação de saída de cada coluna medular se bifurcará para a lóbula e coluna lobular. Estudos mostram que alguns neurônios da lóbula estão associados a campos receptivos pequenos, ou seja, detectam a movimentação de pequenos objetos no campo visual. Os neurônios com esta característica na Lóbula só estão presentes em moscas do sexo masculino (STRAUSFELD, 1982; DOUGLASS & STRAUSFELD, 2003a e b), que desempenham melhor o comportamento de fuga que as fêmeas (LAND & COLLETT, 1974).

Já a Placa Lobular é responsável pela detecção de movimentos de campos receptivos amplos e na estabilização do voo (HAUSEN, 1982a), e é composta por cerca de 60 neurônios gigantes conhecidos como Células Tangenciais da Placa Lobular, sendo agrupados e nomeados de acordo com sua resposta perante estímulos externos. Neste estudo, avaliou-se a resposta do Neurônio H1, presente na Placa Lobular, o qual é sensível a movimentos horizontais de trás para frente da cabeça da mosca. O tipo de resposta do neurônio H1, é única dentro da Placa Lobular, o que torna inequívoca sua detecção.

A resposta deste neurônio H1 se dá na forma de potenciais de ação ao longo do axônio e pelas fibras dendríticas que se estendem pelo hemisfério oposto ao do seu corpo celular. Desta forma, o tipo de aquisição realizado no presente trabalho, foi uma resposta ipsilateral (Figura 1). Ou seja, a aquisição é feita no hemisfério oposto ao da estimulação, com movimentos horizontais de trás para frente da cabeça da mosca, sendo que movimentos opostos causam a inibição do sinal. Após a despolarização do neurônio H1, este demora em torno de 2ms para se repolarizar, ou seja, apresenta um período refratário de 2ms. Desta forma, existe um intervalo mínimo de 2ms (*bin*) entre cada disparo, o qual foi tomado como unidade de tempo padrão na exposição de alguns dados.

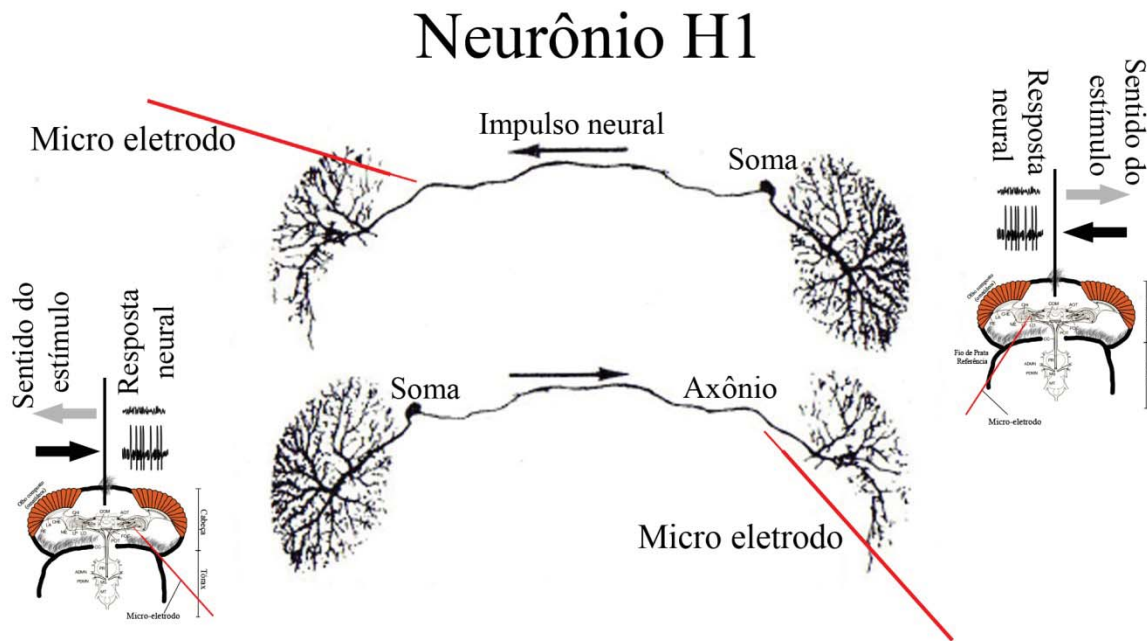


FIGURA 1. Sensitividade dos neurônios H1 (lóbulo direito e esquerdo, respectivamente), baseado em HAUSEN (1982a).

A transmissão de diferentes informações pelo H1 só ocorre pela alteração do tempo entre os potenciais de ação (spikes), ou seja, a caracterização da informação é feita pela lista dos tempos em que os spikes ocorrem, sendo que esta sequência é conhecida como trem de pulsos (DAYAN & ABBOTT, 2001; RIEKE, 1999).

Desta forma, muitos trabalhos focaram nos processos envolvendo o voo de dípteros e a percepção sensorial do ambiente; no entanto, estes processos ainda estão longe de serem totalmente compreendidos. Diversos trabalhos já estudaram o neurônio H1, e hoje em dia o mesmo é modelo de estudos consolidados em neurociência (LAND & COLLET, 1974; BUELTHOFF *et al.*, 1980; HAUSEN, 1982; WEHRHAHN *et al.*, 1982; WAGNER, 1985; DICKINSON *et al.*, 1999; FRYE, 2001; BORST & HAAG, 2002; FERNANDES *et al.*, 2010).

A escolha de *C. megacephala* para o presente estudo apresenta algumas vantagens, como: um único neurônio pode ser localizado e identificado em diferentes moscas; possibilidade de aquisições *in vivo* de grande quantidade de estímulos que podem ser reproduzidos em laboratório; os comportamentos complexos do voo e percepção visual são orquestrados por uma população limitada de algumas centenas de milhares de neurônios. A organização modular desses neurônios em canais paralelos claramente delineados é notável: a retina é constituída por uma rede geométrica de omatídeos, cujo ordenamento impera por quatro camadas sucessivas de neurônios, através de projeções ordenadas dos axônios, por isso

denominadas projeções retinotópicas. Assim, cada neurônio pode ser estudado dentro de seu contexto espacial, permitindo em tese a reconstrução das imagens neurais, nível a nível do processamento – o que seria impossível em um mamífero, por exemplo (HAAG & BORST, 2008); além de tudo isto, a facilidade de utilizar a neurogenética já bem descrita em *Drosophila melanogaster*, para auxiliar esses estudos.

OBJETIVOS

O objetivo básico deste trabalho foi procurar dar contribuição a um melhor conhecimento de como alguns fatores no ambiente, durante o desenvolvimento de *C. megacephala*, poderiam afetar processos da percepção sensorial (visão) durante seu estágio adulto. Este estudo pode auxiliar na compreensão da biologia e comportamento da espécie, o que pode trazer benefícios para estudos em diversas áreas, envolvendo *C. megacephala*.

Procurou-se investigar aspectos da neurofisiologia sensorial em adultos de *C. megacephala*, considerando os diferentes tratamentos sob o aspecto quantitativo, qualitativo e temporal, sendo este tipo de investigação fundamental para se predizer:

- se os indivíduos nos estágios larvais sob a influência dos diferentes tratamentos (alteração no fotoperíodo e presença de drogas) desenvolvem adultos com algum tipo de alteração na percepção sensorial, e mais especificamente, com alterações visuais na percepção de estímulos de movimentação horizontais;
- se os indivíduos com diferentes idades, que se desenvolveram com ausência total de luz, ou com presença constante de luz, apresentam alterações na resposta aos estímulos;
- se a presença de substâncias químicas alterando o desenvolvimento do indivíduo, durante estágios anteriores de seu ciclo, poderia acarretar em alterações na percepção do ambiente, pelo adulto resultante;

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a 27 ± 1 °C), umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento proteico necessário para o desenvolvimento ovariano

das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para oviposição das fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F₁. Somente a geração F₂ foi utilizada nos experimentos, por ser progênie de uma que teve todo o seu desenvolvimento sob condições experimentais, procurando desta forma, reduzir influências de outros parâmetros ambientais que poderiam alterar a resposta do inseto e/ou dificultar a análise dos resultados obtidos.

Como substrato alimentar para desenvolvimento larval nos diferentes tratamentos, foi utilizado: meio artificial à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982). Em alguns tratamentos, houve a adição de substâncias químicas de importância forense: ansiolítico [Diazepam] e antidepressivo [Citalopram].

No caso do ansiolítico (Diazepam), foi adicionada na dieta artificial a DL50 (intravenosa) de coelho, ou seja, 9 mg/Kg [73,6mg de Diazepam em 125g de dieta] (NIOSH, 2004), e no caso do antidepressivo Citalopram foi utilizada a dose de 18mg/kg [8,3mg de Diazepam em 125g de dieta], observada em casos de overdoses em humanos (WORM *et al.*, 1998; JONASSON & SALDEEN, 2002). Foi utilizada apenas uma dosagem de cada uma das drogas na dieta artificial, ou seja, a letal, sendo que ao controle, não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

Os ovos desta espécie foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a postura, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de 27±1 °C, umidade relativa 60±10%) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais nos diferentes tratamentos.

Foram realizados dois grupos de tratamentos:

1. efeito de substâncias químicas (Controle(**CD**), Citalopram(**Cit**) e Diazepam(**Diaz**));
2. efeito de fotoperíodo (Controle-12h(**CD**), Claro-24h(**Cla**) e Escuro-0h(**Esc**));

Os tratamentos foram os seguintes:

1. **Controle** – 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas.
2. **Diazepam** - 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas + 73,6mg de Diazepam.
3. **Citalopram** - 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 12 horas + 8,3mg Citalopram.
4. **Claro** - 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 24 horas.
5. **Escuro** - 300 larvas + 125g dieta oligídica (LEAL *et al.*, 1982) - fotoperíodo de 0 horas.

As fêmeas adultas que emergiram dos tratamentos foram separadas, mantidas em gaiolas e submetidas a métodos de eletrofisiologia, em três períodos ao longo da sua vida no estágio adulto (recém-emergidas 3-5 dias; 15 dias e 30 dias). Foi utilizado um microeletrodo acoplado em um suporte, o qual foi inserido na placa lobular próxima ao cérebro, para avaliação da transmissão do impulso no neurônio H1 do sistema visual. Para este experimento, contou-se com o apoio do Laboratório Dipteralab (Laboratório de Neurofísica) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de São Carlos, sob a coordenação do Prof. Dr. Roland Köberle. As aquisições de dados foram realizadas em períodos diurnos em temperatura média de $24,3 \pm 1,3$ °C, umidade $52,0 \pm 6,4\%$ e luminância de $43,5 \pm 12,2$ lux.

Na Figura 2, é possível observar imagens e esquemas da metodologia utilizada durante a experimentação, além da anatomia da via sensorial envolvida na codificação da informação visual no sistema nervoso de moscas.

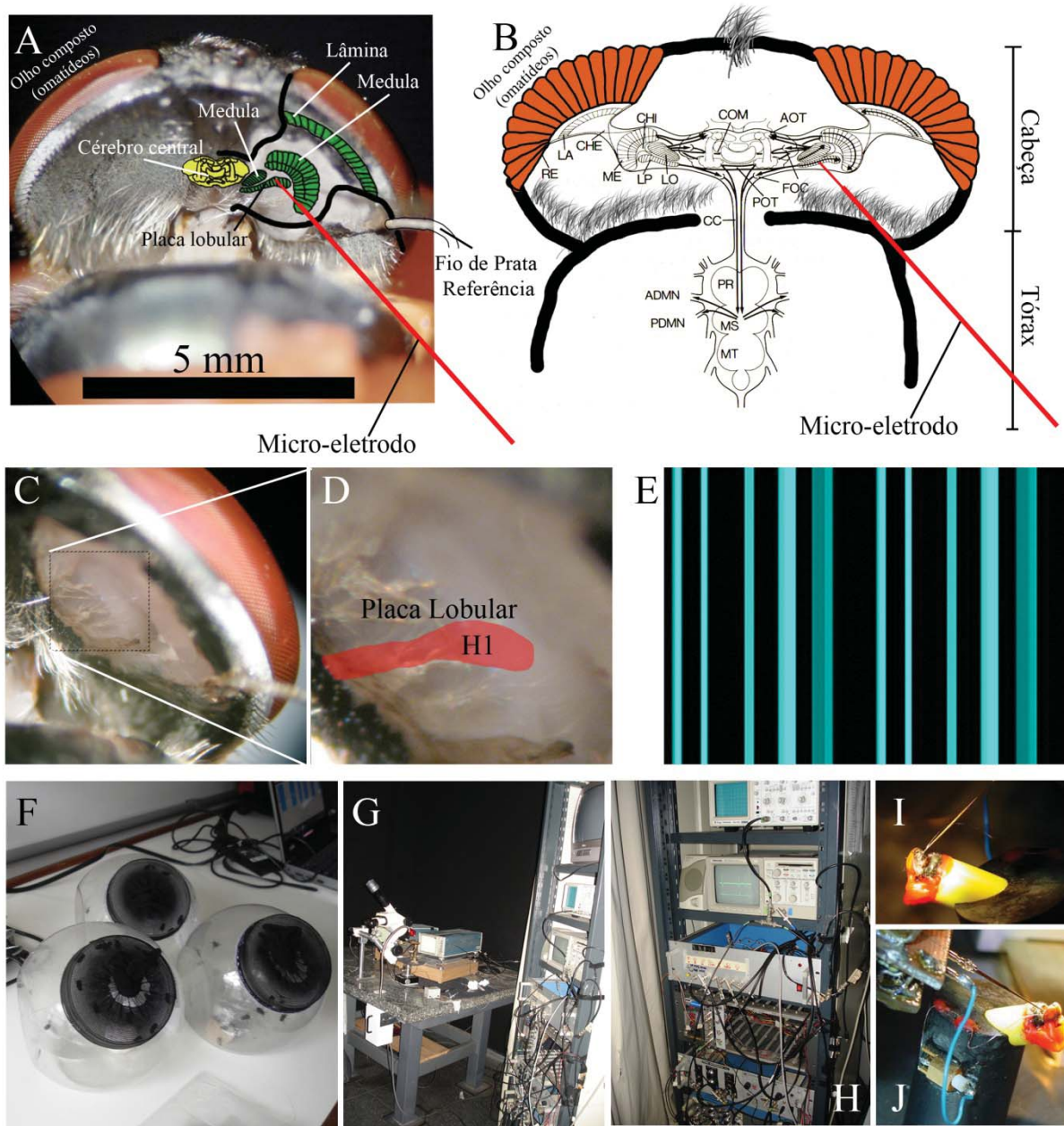


Figura 2. Imagens e esquemas do experimento. A e B: Esquemas da organização básica do sistema visual da mosca baseado em HAUSEN (1982). Os dois olhos compostos (RE) estão conectados ao cérebro pelos dois lóbulos ópticos, cada um contendo sucessivos neuropilares visuais (LA: lamina, ME: medula, LP: placa lobular, LO: lóbula) e dois quiasmas (CHE: quiasma externo, CHI: quiasma interno). Os neuropilares visuais são constituídos por colunas (indicadas por linhas finas) arranjadas retinotopicamente (indicadas pelas setas nos neuropilares do lóbulo óptico do lado direito). O trajeto óptico principal no cérebro e para o gânglio torácico são marcados por setas. Demais abreviações: ADMIN, PDMN: Nervo metatorácico dorsal anterior e posterior; CC: conexão cervical; COM: comissura central; FOC: foco óptico anterior e posterior; POT: trato óptico posterior; PR, MS, MT: neurômeros pro-, meso- e metatorácico do gânglio torácico (HAUSEN, 1982). C e D: Parte posterior da cabeça da mosca logo após microcirurgia e no canto inferior direito pode observar o fio de referência. Em C pode observar porção a porção da placa lobular e possível localização de porções do neurônio H1, imagem adaptada de CASTRO (2008). E: *Monet* utilizado na estimulação, mesmo utilizado por FERNANDES (2010). F: Imagens dos frascos para manutenção dos tratamentos durante aquisições no DipteraLab (USP - São Carlos). G e H: Equipamentos para aquisição dos dados neurofisiológicos, além da lupa e mesa com monitor para estimulação dos indivíduos. I e J: Moscas pronto para obtenção dos dados, com micro eletrodo já inserido.

Dados obtidos e analisados entre os tratamentos

Para a análise dos dados obtidos da neurofisiologia do neurônio H1 nos diferentes tratamentos, foram utilizados:

Tempo de resposta – Delay time: foi obtido para cada um dos tratamentos e repetições, representando o tempo entre o estímulo e a resposta de despolarização do neurônio H1. Foi obtido também o tempo de resposta dos 3 primeiros spikes neurais, para comparações entre os tratamentos;

Histograma dos intervalos entre spikes- ISI: O histograma dos intervalos entre dois spikes consecutivos (ISI - *Interspike Interval*) é uma estatística útil para caracterizar alguns padrões na resposta neural. Com a mesma, é possível conhecer a probabilidade de ocorrência de todos os intervalos registrados. Em uma resposta neural com N spikes, o ISI fornece a distribuição dos intervalos interspikes separados por um intervalo de tempo Δt , para os $N - 1$ intervalos interspikes existentes. No H1, Δt pode variar de 2ms - período refratário do neurônio - até algumas dezenas de milissegundos;

Taxa de Disparo e informação: foi obtida a média do número de disparos ocorridos, n , em um certo intervalo de tempo T, também conhecida como taxa de disparo baseada na contagem (*spike count rate*), além da informação transmitida por intervalo de tempo (bits/s);

Todas estas variáveis foram comparadas nos diferentes tratamentos e idade dos adultos de *C. megacephala*, buscando-se um padrão. A comparação foi feita por métodos estatísticos: testes de ANOVA fatorial foram utilizados, além de análises gráficas. Foram utilizados os programas Scilab[®] versão 5.3.3 para cálculos das variáveis e montagem de gráficos, além do programa estatístico SAS[®].

Estas variáveis calculadas foram obtidas da resposta do neurônio H1 do sistema visual de fêmeas adultas de *C. megacephala*.

Montagem para aquisição neurofisiológica do neurônio H1 nos tratamentos

O sistema em análise, como foi descrito, é formado por milhares de células neurais e os experimentos foram realizados da seguinte forma: a mosca viva (utilizou-se apenas fêmeas) foi fixada com cera em um suporte para facilitar a manipulação; logo após, a sua cabeça foi levemente inclinada facilitando o acesso à região posterior da cabeça, para a realização de uma microcirurgia, na qual foi retirada uma pequena porção do exoesqueleto e de tecido gorduroso, apenas para expor o cérebro e a região principalmente da placa lobular, e assim,

permitir as medidas *in vivo* (Figuras 2A, B, C, D, I e J). Apenas durante a montagem com as moscas do tratamento Escuro, foi tomado o cuidado de oferecer a informação luminosa apenas durante a aquisição dos dados; desta forma, a intensidade luminosa na sala de preparação foi reduzida e utilizou-se uma fonte de luz vermelha (moscas insensíveis a este comprimento de onda, segundo HARDIE, 1979; HARDIE, 1985; BRISCOE & CHITTKA, 2001; HAUSEN, 1982a), durante toda a manipulação até o início da aquisição.

Na placa lobular, situam-se quatro sinapses atrás dos fotorreceptores, que possuem várias dezenas de neurônios sensíveis a movimentos horizontais e verticais, com a finalidade de controlar a estabilidade do voo da mosca. Dentre estes neurônios, o neurônio H1 responde a movimentos horizontais, integrando a informação provinda dos 10.000 omatídeos dos olhos compostos. O neurônio gera impulsos, possibilitando a realização de registros extracelulares na mosca viva. Para isto, utilizou-se eletrodo de Tungstênio e foram registrados os tempos de geração dos pulsos em sincronia com o estímulo, sendo que este último consiste de uma cena visual, que se movimenta rigidamente na direção horizontal. A referência do sistema de aquisição foi fornecida por um fio de prata colocado na hemolinfa, no canto inferior da cabeça. O módulo de geração de estímulos visuais utilizado foi o Visual Stimuli Image Generator (VSImG), bastante utilizado para realizar experimentos no Dipterlab-IFSC – USP. Este sistema apresenta à mosca uma imagem gerada por um monitor de deflexão eletrostática (Tektronix 608), composta por um bitmap com diferentes níveis de contrastes, atualizada a uma taxa de 500 quadros por segundo.

Gerador de estímulos visuais

Após esta montagem e durante o início da aquisição de dados, os indivíduos eram mantidos em uma porção da sala totalmente escura a uma distância de aproximadamente 6cm de um único monitor de deflexão eletrostática (Tektronix 608), posicionado na porção esquerda da cabeça da mosca (Figura 2G, H, I e J). O monitor exibia uma imagem com diferentes níveis de contrastes em movimentação horizontal, já que havia interesse apenas em estimular a mosca com contrastes horizontais. A imagem era composta por 256 X 256 pixels, denominada “monet” (Figura 2E), sendo o mesmo monet utilizado por FERNANDES *et al.* (2010), a qual deslocou rigidamente no eixo horizontal em intervalos de 2ms, e com taxa de varredura vertical de 500Hz, muito superior à encontrada em monitores convencionais (60-85Hz), o que é suficiente para humanos terem a sensação de movimento contínuo da imagem.

No entanto, devido à pressão seletiva no ambiente, e sua forma de deslocamento, o sistema visual de moscas é capaz de detectar movimentos em menor escala temporal que a observada nos humanos. Desta forma, foi necessário utilizar estímulos com taxa de atualização na escala temporal do H1, o qual apresenta período refratário de 2ms (STEVENINCK & BIALEK, 1988). O sistema foi o mesmo descrito e desenvolvido por ALMEIDA (2006), e utilizado por CASTRO (2008) e FERNANDES *et al.*(2010).

Tratamento do sinal neural

As etapas e os tratamentos do sinal neural, durante a aquisição para obtenção dos tempos dos spikes neurais do neurônio H1 estão ilustrados na Figura 3.

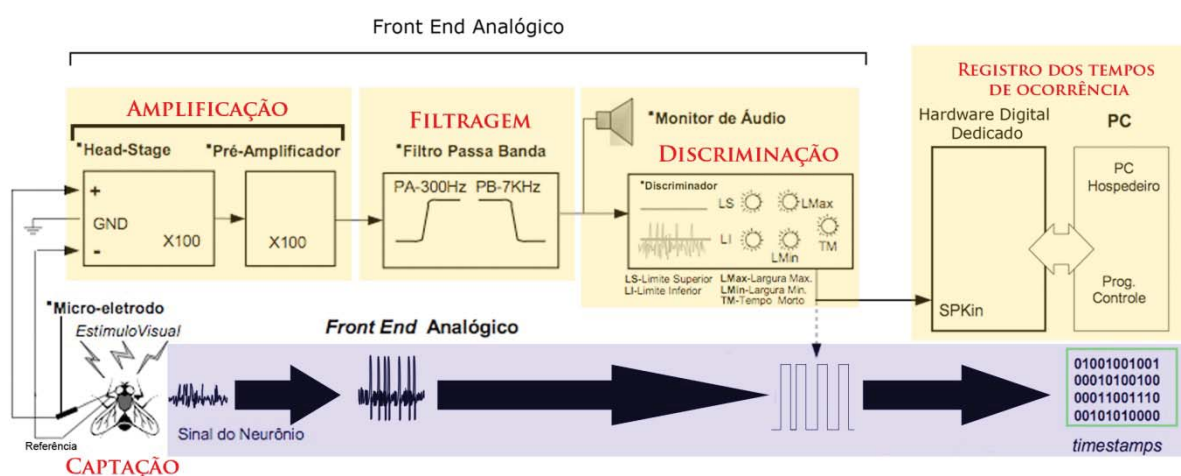


Figura 3. Etapas de aquisição do sinal neural. Adaptado de ALMEIDA (2006).

A captação do sinal dos impulsos neurais foi realizada de forma extracelular, sendo que na hemolinfa, a diferença de potencial da membrana durante os disparos no neurônio H1 caem de dezenas de milivolts para aproximadamente 20 a 100 μ V. Além disto, foram utilizados micro-eletrodos de alta impedância entre 2-5M Ω , o que possibilita uma boa seletividade do sinal em meio a dezenas de neurônios. No entanto, um micro-eletrodo capta junto com o sinal do neurônio H1, diversos ruídos presentes no sistema, como: neurônios vizinhos, despolarização de sarcolema e células musculares, ruídos térmicos, sistema traqueal, além de ruídos eletromagnéticos externos, como lâmpadas, equipamentos eletrônicos, etc. Desta forma, é necessário um tratamento no sinal captado, que foi descrito e desenvolvido por ALMEIDA (2006), e utilizado por CASTRO (2008) e FERNANDES *et al.* (2010).

Assim, primeiramente foi feita uma amplificação dos sinais por meio de amplificador diferencial (INA111-BurrBrown e opa604 – BurrBrown) próximo ao microeletrodo, localizado

no *headstage* (ALMEIDA, 2006; CASTRO, 2008; FERNANDES, 2010, FERNANDES *et al.*; 2010), que apresentava duas entradas: o micro-eletrodo próximo ao neurônio H1 e um fio de referência na hemolinfa dentro da cabeça, que permite uma redução de ruídos comuns. Tal sistema ainda possuía filtros passa alta, para frequências acima de 300Hz. Tal sistema descrito anteriormente já gerava uma amplificação de 100x na saída do sinal. Logo em seguida, utilizou-se um amplificador (OPA604 – BurrBrown) de baixo ruído, gerando novamente uma amplificação de 100 vezes. Desta forma, após a amplificação, o sinal captado tem aproximadamente 1V, facilitando a sua observação.

Após a amplificação, é necessária uma filtragem e para tanto, foram utilizados filtros Bessel de terceira ordem, com frequência de corte em 300Hz e 7Khz. Logo após esta filtragem, o sinal passa por um gerador de áudio e osciloscópio, facilitando a localização do neurônio H1 durante a preparação do experimento. Como discriminador do sinal, foi utilizada uma janela de limiar inferior e superior ajustável manualmente, sendo que para os sinais que possuem amplitudes dentro da janela, é gerado um pulso digital padrão *TTL* de largura fixa de 10 μ s (LEWICKI, 1998), obtendo assim a digitalização do sinal discriminado. Logo após toda a amplificação, filtragem e discriminação, é realizado o registro do tempo de ocorrência de cada Spike, com o auxílio de um Hardware Digital Dedicado, sendo que o instante de cada disparo é registrado em um arquivo de dados no Computador Hospedeiro.

Os dados e padrões obtidos nos adultos foram comparados entre os diferentes tratamentos considerados no presente trabalho, e também na perspectiva temporal. A aquisição e amostragem dos dados ocorreram em no mínimo três fêmeas adultas de cada um dos cinco tratamentos: controle, diazepam, citalopram, claro e escuro. Foram também considerados os efeitos de possíveis alterações na idade de exposição dos diferentes tratamentos, ou seja, foram avaliados três grupos etários em cada tratamento: adultos recém-emergidos (3-7 dias), com 15 dias e 30 dias de vida. Desta forma, foram avaliados pelo menos 9 indivíduos (no máximo 12) para cada tratamento, totalizando no mínimo 45 indivíduos, para os quais foram registrados dados neurofisiológicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da resposta do neurônio H1 frente ao estímulo oferecido, pode ser visualizada na Figura 4, na qual se pode observar o tempo de resposta (spikes) em relação o estímulo oferecido nos diferentes tratamentos e idades das fêmeas analisadas.

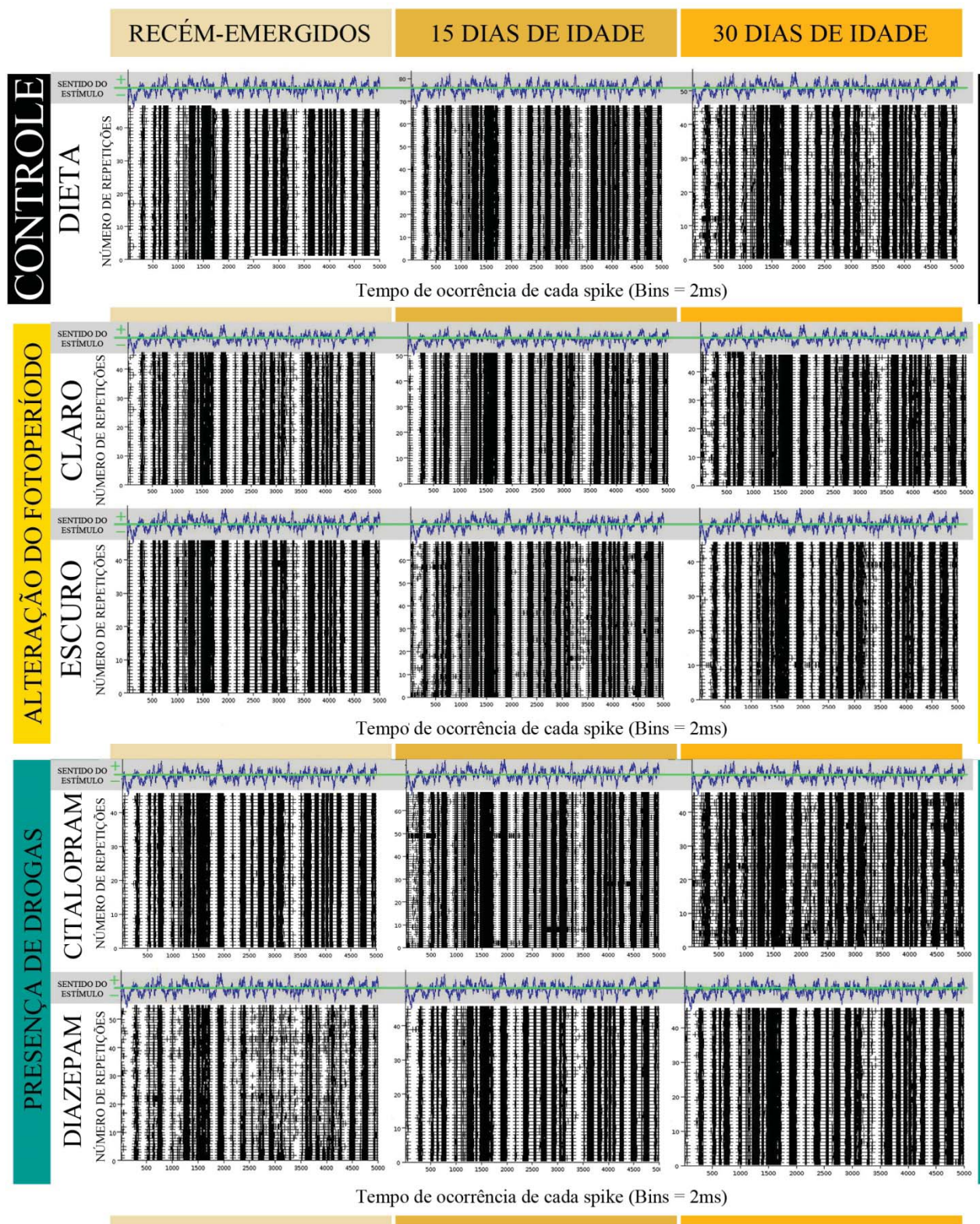


FIGURA 4. Gráficos *raster plot* mostrando os tempos de ocorrência dos spikes registrados em um adulto-exemplo durante um intervalo de tempo nos diferentes tratamentos e idade (Aproximadamente 60 repetições para cada indivíduo, e pelo menos três indivíduos para cada tratamento e idade). O estímulo oferecido é apresentado acima do gráfico, sendo que a linha verde define o limiar entre movimento e repouso, quando negativo ocorre a movimentação no eixo horizontal da frente da cabeça para trás, e quando positivo a movimentação é de trás da cabeça para sua porção anterior, ou seja, estimulando o neurônio H1.

Através da observação dos gráficos na Figura 4, pode-se constatar que o padrão da resposta é bastante parecido entre os distintos tratamentos e idades, sendo que algumas pequenas variações individuais nos tratamentos e idade puderam ser observadas visualmente, porém não foram quantificadas. Como por exemplo, um aumento da atividade neural espontânea com o aumento da idade dos indivíduos. Na presença de drogas, essas variações estão mais visíveis já em indivíduos mais jovens (Diazepam – recém-emergidos), quando comparados com o controle e outros tratamentos. Sendo que a atividade neuronal espontânea está associada a uma manutenção e estruturação de circuitos neurais sensoriais (RAPP *et al.*, 1985; MCKENNA *et al.*, 1994; YU *et al.* 2004), ou seja, quanto mais velhos os indivíduos maior necessidade de manter e estruturar os circuitos neurais devido a experiência com o ambiente.

No entanto, é necessária uma avaliação mais detalhada dos tempos de resposta para se poder inferir se houve alguma diferença na resposta do H1 sob a influência dos tratamentos e idade. Na Figura 5, é possível observar a variação e a média do tempo de resposta do neurônio H1 nos adultos com diferença na idade e entre os diferentes tratamentos, sendo que não se observaram diferenças significativas no tempo de resposta entre os diferentes tratamentos e idades dos indivíduos.

A média do tempo de resposta foi semelhante entre as fêmeas de diferentes idades e sob influência dos diferentes tratamentos. A presença de drogas durante o desenvolvimento larval originou fêmeas adultas que aparentemente não apresentaram alterações fisiológicas na resposta do neurônio H1 aos estímulos oferecidos. No entanto, podem ter acarretado alterações em outras respostas e morfologias, as quais não foram avaliadas neste trabalho.

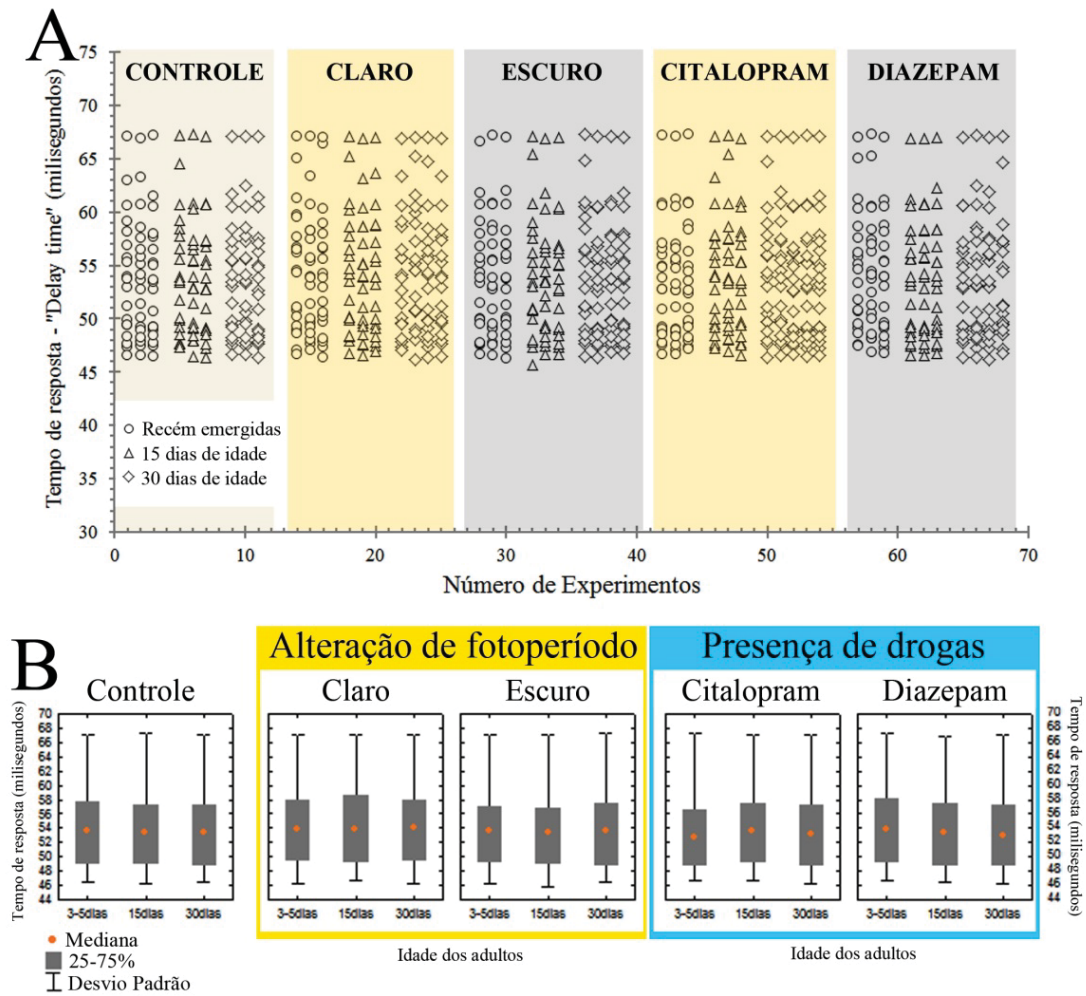


FIGURA 5. Tempo de resposta do neurônio H1 frente ao estímulo, nos diferentes tratamentos e ao longo da vida de adultos de *C. megacephala*.

Já a alteração do fotoperíodo também não acarretou diferenças significativas no tempo de resposta entre os tratamentos, resultado bastante semelhante ao observado por KARMEIER *et al.* (2001) em *Calliphora* sp, estudo em que foi feita apenas a comparação entre ambiente totalmente escuro e luz/escuro (controle) de adultos recém-emergidos. KARMEIER *et al.* (2001) concluíram que o campo receptivo dos neurônios tangenciais é independente da precoce estimulação de adultos recém-emergidos, ou seja, sugerindo que a distribuição da percepção das direções e sensibilidade dos movimentos nos neurônios tangenciais presentes na placa lobular, são geneticamente determinados em consequência de uma adaptação estabelecida ao longo da escala evolutiva, de uma tarefa específica de resposta às informações do ambiente.

No entanto, quando se avalia o tempo dos primeiros spikes após a estimulação, pode-se observar algumas diferenças entre os tratamentos e a idade dos adultos, como representado

na Figura 6. Foi observada diferença significativa entre o tempo dos três primeiros spikes nos diferentes tratamentos ($F=4,275$; $p<0.01$). Já a idade não influenciou no tempo de resposta dos três primeiros spikes. Houve diferença significativa entre Controle e o tratamento Claro e entre Controle e Diazepam, sendo que os tratamentos (Claro e Diazepam) apresentaram maior atraso na resposta comparado com o Controle, como se pode observar também na Figura 6.

As moscas que se desenvolveram com luz constante (Claro) estavam continuamente sendo estimuladas, o que poderia ocasionar uma acomodação da percepção da luz, a qual foi refletida nos tempos de resposta observados (Figura 6). Já os indivíduos desenvolvidos em Diazepam podem ter sofrido alterações na morfologia e no desenvolvimento nervoso dos adultos, o que pode ter causado alterações na percepção e resposta, uma vez que a presença deste ansiolítico retarda o desenvolvimento larval e o comportamento de dispersão larval, além de gerar adultos menores em *C. megacephala* (GOMES, 2006). Alterações na morfologia de larvas e pupas e na taxa de desenvolvimento larval na presença de benzodiazepínicos (Nordiazepam) no substrato de alimentação larval, também foram observadas por PIEN *et al.* (2004) em *Calliphora vicina*. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que Diazepam acelera o desenvolvimento larval de duas espécies de moscas, *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria*.

Quando se observa o tempo do primeiro spike, pode-se constatar que os tratamentos de certa forma geraram um retardo na resposta em relação ao controle, principalmente nos tratamentos Claro, Escuro e Diazepam. No entanto, apesar de não ter sido observada diferença significativa, pode-se observar uma grande variabilidade nas populações sob influência dos tratamentos, quando comparados ao Controle. As populações que sofreram alterações de fotoperíodo, ou o efeito da presença de drogas, geraram indivíduos com respostas mais distintas, o que aumentou a variabilidade, como se pode observar nas Figuras 6A e B. Dentre os tratamentos, os indivíduos na ausência de luz apresentaram o maior tempo entre todos, talvez pela própria falta de estimulação eletromagnética sobre as células fotossensíveis, e sobre os circuitos neurais envolvidos na percepção sensorial da luz durante o desenvolvimento destes dípteros (Figura 6). A presença constante de luz no tratamento Claro poderia acomodar e retardar um pouco a resposta nestes indivíduos (Figura 6).

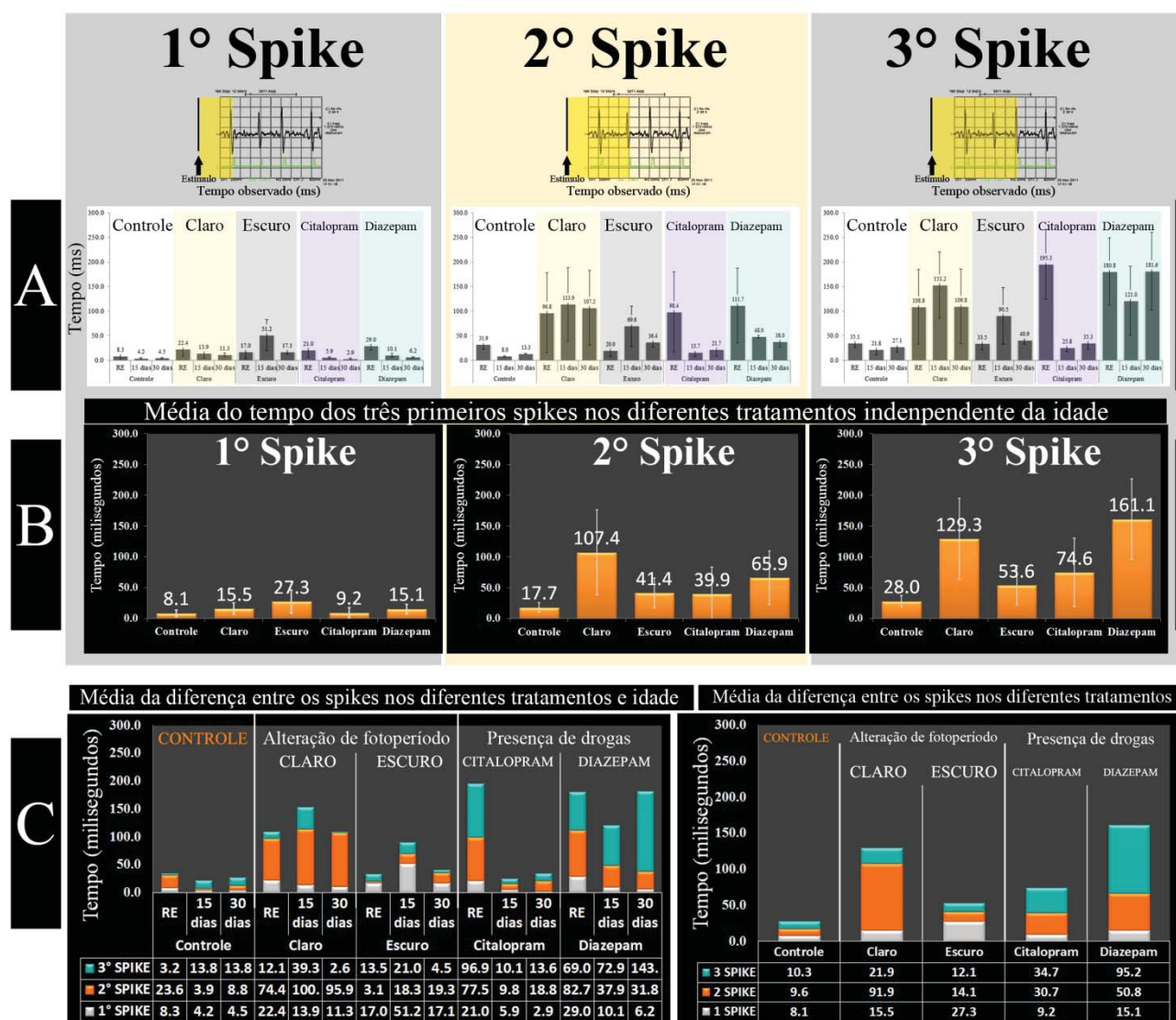


FIGURA 6. Gráficos mostrando o tempo (ms) dos três primeiros spikes após estímulo, nos diferentes tratamentos e idade. A: Tempo do 1º, 2º e 3º spike nos diferentes tratamentos e na idade das fêmeas analisadas. B: Intervalo de tempo do 1º, 2º e 3º spike nos diferentes tratamentos independente da idade. C: Tempo do 1º, 2º e 3º spike mostrado dentro do mesmo tratamento nas diferentes idades e no gráfico ao lado independente da idade

Já a presença de drogas retardou um pouco o tempo (Figura 6), principalmente no tratamento Diazepam, e poderia estar associada ao efeito da substância, a qual tem atuação ansiolítica reduzindo estimulação neural, pois interage com receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo GABA (GOODMAN & GILMAN, 2003). Neste caso, pode potencializar a ação dos neurotransmissores GABA, atuando sobre os receptores GABA_A, ou seja, ocorre um maior influxo de íons cloro para o neurônio pós-sináptico, dificultando assim sua despolarização e consequentemente, causando uma diminuição da velocidade de transmissão do impulso neural, o que deprime o sistema nervoso central (GOODMAN & GILMAN, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004).

Pode-se constatar ainda que a diferença entre o tempo em cada spike no tratamento controle é praticamente constante (Figura 6C); no entanto, em todos os outros tratamentos, pode-se observar alterações na diferença entre os tempos dos spikes, sendo que no tratamento Escuro o primeiro spike foi o mais retardado de todos os tratamentos. No entanto, os dois spikes seguintes foram rápidos em relação aos outros tratamentos. Tal fato talvez seja explicado pela falta de estimulação dos indivíduos do Escuro, os quais se desenvolveram na ausência de luz desde o estágio larval, e acabaram tendo um atraso na resposta neural devido à falta de uma sensibilização prévia dos fotorreceptores e processos anteriores à resposta do H1. Porém, os circuitos neurais estão presentes e respondem imediatamente logo após a primeira despolarização. Como sugerido por Karmeier *et al.* (2001), a distribuição da percepção das direções e sensibilidade dos movimentos nos neurônios tangenciais presentes na placa lobular são geneticamente determinados, e não dependem de estimulação prévia.

O outro tratamento que sofreu alteração do fotoperíodo (tratamento Claro), respondeu rapidamente ao estímulo; no entanto, os spikes seguintes foram muito mais lentos que todos os outros tratamentos (Figura 6C), provavelmente pela acomodação neural neste tratamento, tendo em vista que os indivíduos se desenvolveram na presença da luz desde o estágio larval.

Já os indivíduos que se desenvolveram na presença de drogas apresentaram alterações no tempo de resposta principalmente no tempo dos spikes seguidos da primeira despolarização neural, sendo que tal resposta é bastante evidente no tratamento Diazepam (Figura 6C), talvez pela ação supressora desta droga sobre o sistema nervoso (GOODMAN & GILMAN, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004), ou sobre o desenvolvimento deste tecido, uma vez que estava presente apenas durante o estágio larval. A presença da droga Citalopram apenas causou alterações no tempo de resposta em relação ao Controle, nos indivíduos recém-emergidos, talvez por alguma alteração que esta droga pode ter causado nos indivíduos durante o desenvolvimento. A presença de alguma substância química no substrato de alimentação larval, pode atuar sobre os indivíduos interferindo nos processos de transmissão neural, inibindo ou ativando os mensageiros químicos, causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento dos organismos em contato com a mesma (OMOTO, 2000; HAYNES, 1988), mudanças que podem prejudicar a estimativa do IPM na ciência forense (CATTS, 1992; CATTS & GOFF, 1992).

Os histogramas ISI (Figura 7) mostram a diferença encontrada entre as respostas nos diferentes tratamentos. Pode-se observar uma maior quantidade de intervalos curtos nas moscas mais jovens no tratamento controle (Figura 7A); no entanto, a diferença é bem

pequena, sendo que os histogramas praticamente se sobrepõem, diferentemente do observado nos outros tratamentos (Figura 7A).

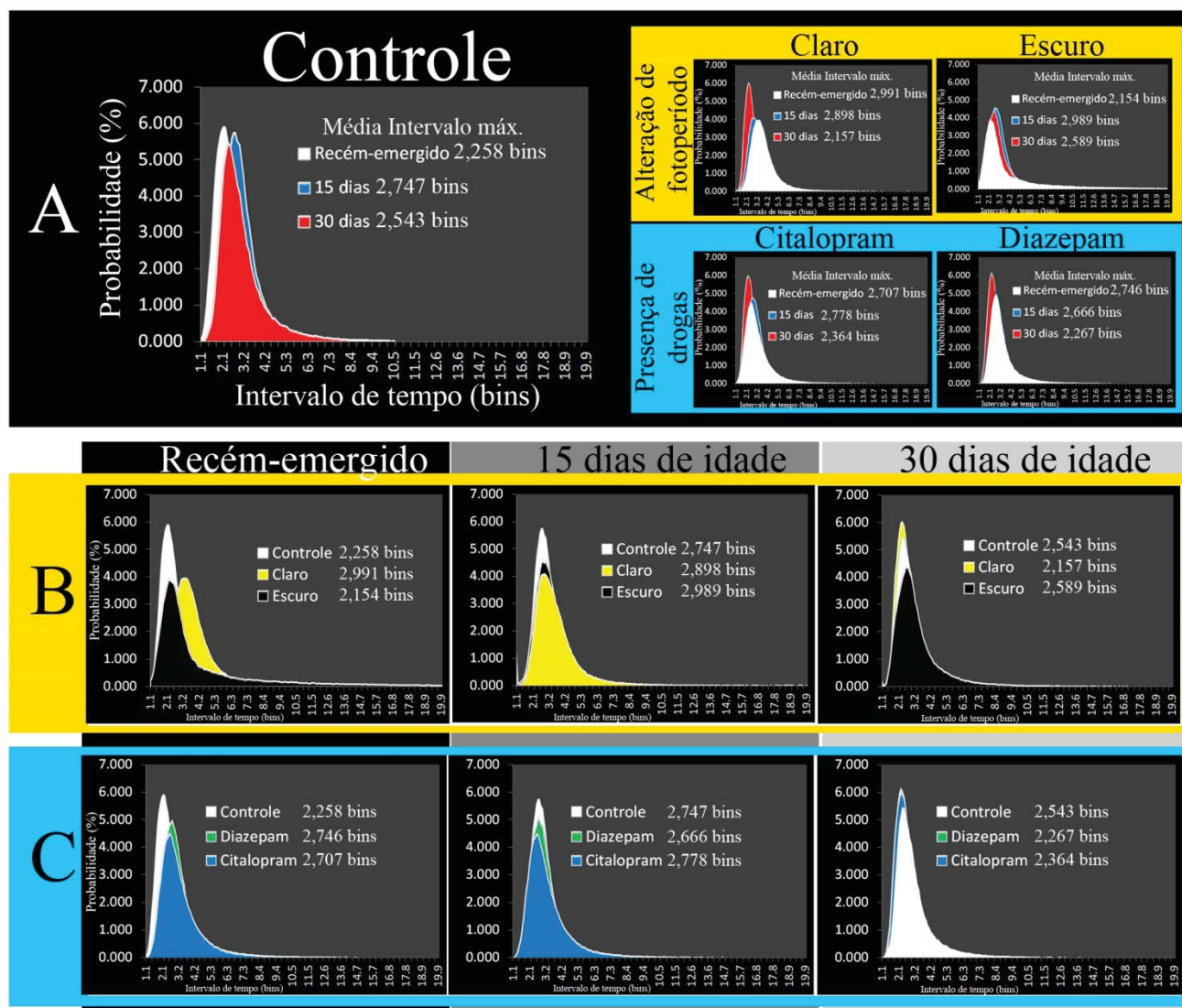


FIGURA 7. Histograma ISI e tempo de maior incidência de intervalos dos tratamentos e nas idade dos adultos de *C. megacephala* ($n=3$ para cada tratamento e idade). A: Variação da probabilidade em relação ao intervalo de tempo dos spikes nas diferentes idades dentro dos tratamentos. B e C: Variação da probabilidade em relação ao intervalo de tempo dos spikes nos distintos tratamentos, dentro da mesma idade.

Os tratamentos que sofreram influência do fotoperíodo foram os que mais alteraram o padrão da distribuição ISI obtida. Pode-se perceber que o controle apresentou maior quantidade de intervalos curtos entre os spikes do trem de pulso (principalmente nos indivíduos recém-emergidos (Figura 7B), sendo que os adultos de 30 dias apresentaram distribuição bastante semelhante entre Claro e Controle. Já no tratamento Escuro, pode-se observar que o pico da porcentagem sempre foi menor que dos outros tratamentos (Figura 7A e 7B). Isso significa que houve uma maior variabilidade nos intervalos de escuro, o que também foi observado nas moscas do Claro recém-emergidas (RE) e de 15 dias. Já dentro dos

tratamentos, os indivíduos do Claro apresentaram, na medida em que ficavam mais velhos, maior quantidade de intervalos curtos entre os spikes do trem de pulso, ou seja, maior quantidade de taxas de disparo na medida que envelheciam, diferença que não foi tão evidente tanto no Controle quanto no tratamento Escuro (Figuras 7A e B).

Já nos tratamentos com presença de drogas, o efeito da idade e do tipo de substância química foi bastante semelhante no padrão de distribuição dos intervalos de tempo entre spikes do trem de pulso, o que pode ser observado tanto nos gráficos na variação na idade (Figura 7A), como nos gráficos comparando os tratamentos (Figura 7C), em que a distribuição foi praticamente a mesma entre Diazepam e Citalopram, sendo ligeiramente menor que o Controle em indivíduos recém-emergidos e com idade de 15 dias, e praticamente idêntica nos indivíduos de 30 dias (Figura 7C). Tal resultado pode estar relacionado ao efeito da droga, principalmente nos indivíduos mais jovens, já que a mesma estava presente apenas durante o estágio de desenvolvimento larval, e após 30 dias, a quantidade da mesma que poderia ainda estar no corpo destes insetos era praticamente desprezível.

A taxa de disparos e o processamento da informação também foram avaliados nos diferentes tratamentos e idades, e podem ser observados na Figura 8.

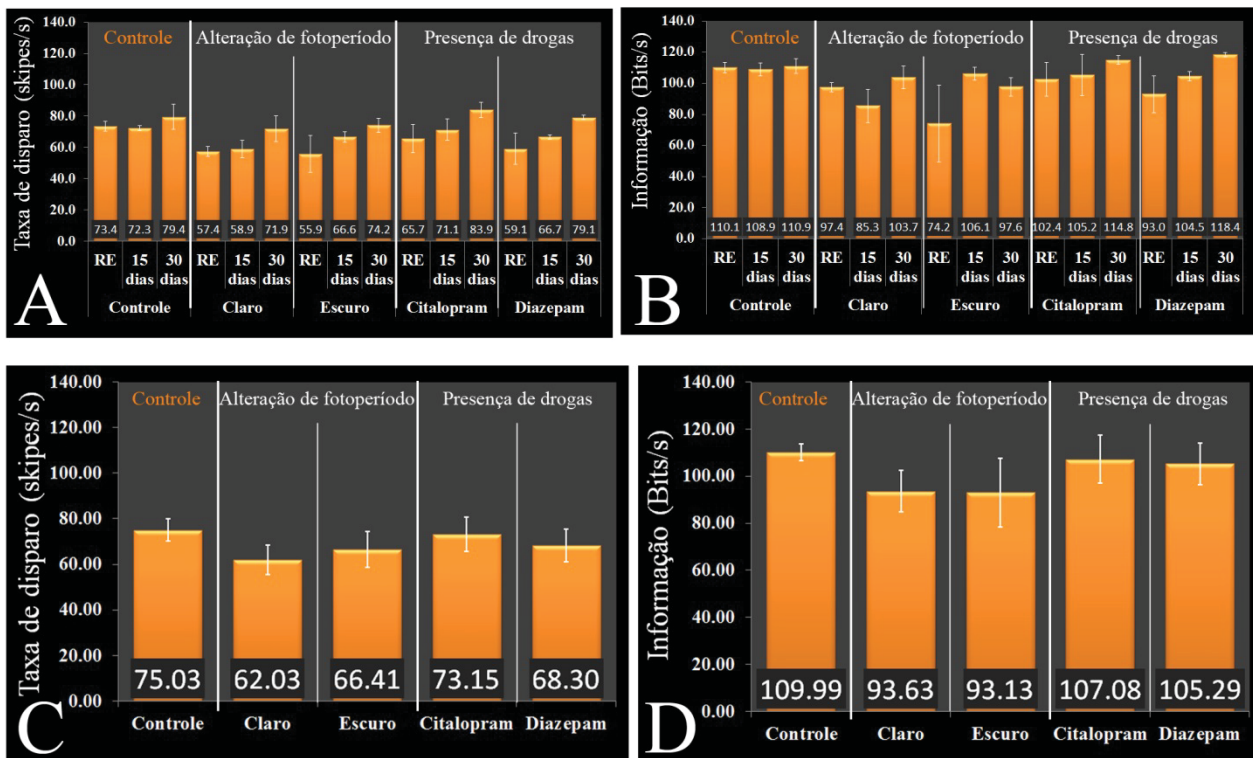


FIGURA 8. Média e erro padrão da taxa de disparos e da informação. A e B: média da taxa e da informação, respectivamente, nas diferentes idades e tratamentos realizados. C e D: média da taxa e da informação, respectivamente, nos diferentes tratamentos independentemente da idade das fêmeas adultas de *C. megacephala*.

Pode-se observar na Figura 8A, que a taxa de disparo foi diretamente proporcional à idade dos adultos, ou seja, em todos os tratamentos, quanto mais velhos eram os indivíduos, maior a média da taxa de disparo observada. Quando se observa a taxa de disparo nos diferentes tratamentos, independente da idade (Figura 8B), pode-se notar uma redução na taxa de disparo de todos os tratamentos em relação ao controle. A experiência do indivíduo, ou seja, o maior tempo de contato com os estímulos visuais do ambiente, provavelmente agiu aumentando a frequência de spikes por unidade de tempo; assim, os indivíduos mais velhos de todos os tratamentos se tornaram mais sensíveis e aumentaram o processamento da informação durante a exposição aos estímulos, pois quanto maior a taxa de disparo no neurônio H1, maior é a sensibilização neural neste circuito sensorial.

Já a influência dos diferentes tratamentos reduziu esta sensibilização e processamento, ou seja, os tratamentos atuaram reduzindo a percepção de informações no ambiente, talvez pela acomodação frente à presença constante de luz (Claro), ou devido à falta de estimulação prévia tendo em vista a constante ausência de luz (Escuro) ou o efeito de substâncias químicas que agiram durante o desenvolvimento larval e refletiram no indivíduo adulto (Citalopram e Diazepam).

O processamento da informação também foi alterado nos tratamentos (Figuras 8B e 8D), sendo que a influência do fotoperíodo reduziu a informação processada por tempo em relação ao Controle, e a presença de drogas não causou grandes alterações nesta variável. Tendo em vista que a percepção sensorial observada neste trabalho foi a visual, a influência da luz sobre os tratamentos causou as maiores alterações na resposta do neurônio H1, em relação à presença de drogas. Assim, os indivíduos tratados com presença e ausência constante de luz (Claro e Escuro, respectivamente), processaram menor quantidade de informações por tempo, ou seja, captaram menos informações que a observada nos indivíduos do tratamento Controle. Alterações no processamento da informação, ou seja, nos intervalos entre os spikes, também foram observados por ESTEVES (2010), que testou diferentes imagens (naturais ou não) e observou maior detalhamento e processamento da informação, quando eram apresentadas imagens naturais aos adultos de *C. megacephala*.

Pode-se constatar que foi no tratamento Controle, em relação a todos os outros analisados, que ocorreu a melhor captação de informações do ambiente e respostas via neurônio H1 em *C. megacephala*, pois foi o tratamento que apresentou a maior quantidade de intervalos curtos entre os spikes do trem de pulso (Figura 7), além da maior taxa de disparos e de informação.

Vale a pena citar que os dados obtidos nos tratamentos sob influência do fotoperíodo e das drogas, apresentaram um aumento da variabilidade em relação ao controle, o que deve estar relacionado às características individuais, devido à variabilidade genética, características estas que podem gerar respostas mais diversas, quando os indivíduos são expostos a ambientes diferentes daqueles nos quais sofreram a pressão seletiva durante sua especiação.

CONCLUSÕES

A análise da neurofisiologia do neurônio H1 do sistema visual de *C. megacephala* mostrou algumas semelhanças e alterações, quando se considera a influência dos tratamentos e a variação da idade dos indivíduos. Pode-se observar que o tempo de resposta praticamente não apresentou diferenças significativas nos diferentes tratamentos e em relação à idade dos adultos avaliados.

Tanto a presença quanto a ausência constante de luz geraram algumas alterações no padrão de resposta do neurônio H1; ambos os tratamentos reduziram as taxas de disparo, o intervalo entre os spikes desses tratamentos foi maior nas moscas mais jovens; já a primeira resposta do tratamento Escuro tendeu a ser maior que a observada nos outros tratamentos. Ou seja, a luz constantemente presente ou ausente influencia diretamente em alguns padrões de resposta do neurônio H1, talvez pela alteração de fatores anteriores como, por exemplo: sensibilidade das células receptoras, ou vias neurais anteriores de processamento da informação que podem alterar o tempo da resposta do H1.

Já nos tratamentos na presença da droga, foram constatadas reduções na taxa de disparo, principalmente redução na frequência de disparos nos indivíduos mais jovens, talvez por ainda sofrerem influências das substâncias químicas em seu corpo, uma vez que estas drogas estavam presentes no estágio larval. Além disto, quando se avaliou o tempo dos primeiros disparos do neurônio H1 após o estímulo, o tempo observado no tratamento Diazepam foi o mais retardado de todos, talvez pela própria função desta substância, que é ansiolítica.

Pode-se constatar também que quanto mais velhas as moscas, maiores são as taxas de disparo observadas; porém, o tempo de resposta parece não ter tido grandes alterações em adultos de *C. megacephala*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. O. B. **Desenvolvimento de instrumentação eletrônica para estudos de codificações neurais no duto óptico em moscas.** 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2006.
- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- BAŞAR, E. & GÜNTEKIN, B. A breakthrough in neuroscience needs a “Nebulous Cartesian System”: Oscillations, quantum dynamics and chaos in the brain and vegetative system. **International Journal of Psychophysiology** 64: 108–122, 2007
- BOEDDEKER N & EGELHAAF M Steering a model fly: simulations on visual pursuit in blowflies. **Proc. R. Soc. Lond. B** 270:1971–1978, 2003.
- BOEDDEKER N, KERN R, EGELHAAF M Chasing a dummy target: smooth pursuit and velocity control in male blowflies. **Proc. Roy. Soc. Lond. B** 270:393–399, 2003.
- BORST, A.; HAAG, J. Neural networks in the cockpit of the fly. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, v. 188, n. 6, p. 419–437, 2002.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BRISCOE, A. D. & CHITTKA, L. The evolution of color vision in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 471–510, 2001.
- BRUNEL, N.; MEUNIER, C.; FREGNAC, Y. & NADAL, J P. Neuroscience and computation. **Journal of Physiology** - Paris 97, 387–390, 2003.
- BUELTHOFF, H.; POGGIO, T.; WEHRHAHN, C. 3-d analysis of the flight trajectories of flies (*drosophila melanogaster*). *Zeitschrift Fur Naturforschung C: Journal of Biosciences*, v. 35, n. 9-10, p. 811–815, 1980.
- CALVERT GA (2001) Crossmodal processing in the human brain: insights from functional neuroimaging studies. **Cereb. Cortex** 11:1110–1123.
- CAMPOBASSO, C. P.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTRONA, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **Int. J. Legal Med.** 118: 210-214, 2004.
- CANGELOSI, A. & PARIS, D. The processing of verbs and nouns in neural networks: Insights from synthetic brain imaging. **Brain and Language**: 89, 401–408, 2004.

- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CASTRO, N. H. H. de. **Multifractalidade no código neural da mosca**. 69 p. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2008.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annu. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CAYRE, M., MALATERRE, J. SCOTTO-LOMASSESE, S., STRAMBI, C. & STRAMBI, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**: 132, p.1-15, 2002.
- CHAMINADE, T.; OZTOP, E.; CHENG, G.; KAWATO, M.K. From self-observation to imitation: Visuomotor association on a robotic hand. **Brain Research Bulletin** 75 775–784, 2008.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 4th edition, Cambridge, 770p, 1998.
- CHENG, G.; HYON, S.H.; MRIMOTO, J.; UDE, A.; HALE, J.G.; COLVIN, G.; SCROGGIN, W.; JACOBSEN, S. CB: a humanoid research platform for exploring neuroscience. **Advanced Robotics**, Volume 21, Number 10, pp. 1097-1114(18), 2007.
- CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- DAYAN, P.; ABBOTT, L. F. **Theoretical neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems**. Cambridge, Mass.: Massachusetts Institute of Technology Press, 2001.
- DE CASTRO, L. N. & TIMMIS, J. I. **Artificial Immune Systems: A New Computational Intelligence Approach**, Springer-Verlag, London, September, 357 p., 2002.
- DE CASTRO, L. N. & VON ZUBEN, F. J. **Recent Developments in Biologically Inspired Computing**. Publicado por Idea Group Pub., 439 p., 2004.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.

- DICKINSON, M. H.; LEHMANN, F. O.; SANE, S. P. Wing rotation and the aerodynamic basis of insect flight. **Science**, v. 284, n. 5422, p. 1954–1960, 1999.
- DOUGLASS, J. K. & STRAUSFELD, N. J. Anatomical organization of retinotopic motion-sensitive pathways in the optic lobes of flies. **Microscopy Research and Technique**, v. 62, n. 2, p. 132–150, 2003b.
- DOUGLASS, J. K. & STRAUSFELD, N. J. Retinotopic pathways providing motion-selective information to the lobula from peripheral elementary motion detecting circuits. **Journal of Comparative Neurology**, v. 457, n. 4, p. 326–344, 2003a.
- EGELHAAF, M.; GREWE, J.; KARMEIER, K.; KERN, R.; KURTZ, R.; & WARZECHA, AK. Novel Approaches to Visual Information Processing in Insects: Case Studies on Neuronal Computations in the Blowfly. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- ESCH HE, BURNS JM. Distance estimation by foraging honeybees. **J. Exp. Biol.** 199:155–162, 1996.
- ESCH, H.E, ZHANG S, SRINIVASAN MV, TAUTZ J. Honeybee dances communicate distances measured by optic flow. **Nature** 411:581–583, 2001.
- ESTEVEES, I M. **Gerador de estímulos naturalísticos para pesquisar o sistema visual da moscas**. Dissertação apresentada no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.
- FARROW, K.; Haag, J.; Borst, A. Input organization of multifunctional motion-sensitive neurons in the blowfly. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 30, p. 9805–9811, 2003.
- FERNANDES, N. M. **Acuidade visual e codificação neural da mosca *Chrysomya megacephala***. 102 p. Tese (Doutorado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.
- FRANCESCHINI, N. **Retinal mosaic of the fly compound eye**. In: ALI, M. A. (Ed.). Photoreception and vision in invertebrates. New York: Plenum Press, 1982. v. 74.
- FRYE, M. A. & DICKINSON, M. H. Fly flight: a model for the neural control of complex behavior. **Neuron**, v. 32, n. 3, p. 385–388, 2001.
- FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA, G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revista de Microbiologia**: 15(3), p.170-174, 1984.

- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, G. Processos Auto-Organizados: **Efeitos de substâncias químicas que agem no sistema nervoso sobre o desenvolvimento e padrão de dispersão larval pós-alimentar de dípteros (Calliphoridae e Muscidae)**. Dissertação de mestrado, UNESP – Rio Claro, 202 f., 2006.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.
- GROSSBERG, S., GOVINDARAJAN, K. K., WYSE, L. L. & COHEN, M. A. Artstream: a neural network model of auditory scene analysis and source segregation. **Neural Networks**: 17, p.511–536, 2004.
- GUIDO, R. C.; SLAETS, J.F.W.; KOBERLE, R. ; ALMEIDA, L.O.B.; PEREIRA, J.C.. A new technique to construct a wavelet transform matching a specified signal with applications to digital, real time, spike, and overlap pattern recognition.. **Digital Signal Processing**, San Diego, v. 16, n. 1, p. 24-44, 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As míases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revista Brasileira de Zoologia**: 1 (4) : 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HAAG, J.; BORST, A. Electrical coupling of lobula plate tangential cells to a heterolateral motion-sensitive neuron in the fly. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 53, p. 14435–14442, 2008.
- HAAG, J.; BORST, A. Recurrent network interactions underlying flow-field selectivity of visual interneurons. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5685–5692, 2001.

- HAAG, J.; VERMEULEN, A.; BORST, A. The intrinsic electrophysiological characteristics of fly lobula plate tangential cells: Iii. visual response properties. **Journal of Computational Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 213–234, 1999.
- HARDIE, R. C. Electrophysiological analysis of fly retina. Comparative properties of r1-6 and r7 and r8. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, v. 129, p. 19–33, 1979.
- HARDIE, R. C. Functional organisation of the fly retina. **Progress in Sensory Physiology**, v. 5, p. 1–79, 1985.
- HAUSEN, K. **Monokulare und binokulare bewegungsauswertung in der lobula plate der fliege. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft**, p. 49–70, 1981.
- HAUSEN, K. Motion sensitive interneurons in the optomotor system of the fly. 2. the horizontal cells - receptive-field organization and response characteristics. **Biological Cybernetics**, v. 46, n. 1, p. 67–79, 1982a.
- HAUSEN, K. Motion sensitive interneurons in the optomotor system of the fly .1. the horizontal cells - structure and signals. **Biological Cybernetics**, v. 45, n. 2, p. 143–156, 1982b.
- HAUSEN, K. **The lobula-complex of the fly: Structure, function and significance in visual behaviour**. In: ALI, M. (Ed.). Photoreception and Vision in invertebrates. New York: Plenum Press, 1982c. (NATO ASI Series, v. 74).
- HAUSEN, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol**, 33: 149-168, 1988.
- HOMBERG, U. Multisensory Processing in the Insect Brain. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- HOUGHTON, C.; SEN, K. A new multineuron spike train metric. **Neural Computation**, v. 20, n. 6, p. 1495–1511, 2008.
- HUSTON, S. J.; KRAPP, H. G. Visuomotor transformation in the fly gaze stabilization system. **PLoS Biology**, v. 6, n. 7, p. 1468–1478, 2008.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- JONASSON, B. & SALDEEN, T. – Citalopram in fatal poisoning cases. **Fosensic Science International** 126 (2002) 1-6, 2002.
- KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM 2000. **Principles of Neural Science**, 4th ed. McGraw-Hill, New York

- KARMEIER K, TABOR R, EGELHAAF M, KRAPP HG. Early visual experience and the receptive-field organization of optic flow processing interneurons in the fly motion pathway. **Vis Neurosci.** 2001 Jan-Feb;18(1):1-8, 2001.
- KIM, S. P., SANCHEZ, J. C., ERDOGMUS, D., RAO, Y. N., WESSBERG, J., PRINCIPE, J. C. & NICOLELIS, M. Divide-and-conquer approach for brain machine interfaces: nonlinear mixture of competitive linear models. **Neural Networks:** 16, 865–871, 2003.
- KOCH C. & LAURENT G. Complexity and the nervous system. **Science**, 284:96-98, 1999.
- KRAPP, H. G. Sensory integration: neuronal adaptations for robust visual self-motion estimation. **Current Biology**, v. 19, n. 10, p. R413–R416, 2009.
- KURTZ, R. et al. Adaptation accentuates responses of fly motion-sensitive visual neurons to sudden stimulus changes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological sciences**, v. 276, n. 1673, p. 3711–3719, 2009.
- LAND, M. F.; COLLETT, T. S. Chasing behavior of houseflies (*Fannia canicularis*) - description and analysis. **Journal of Comparative Physiology**, v. 89, n. 4, p. 331–357, 1974.
- LANE NJ Structure and components of the nervous system. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, vol 5. Pergamon Press Oxford New York, pp 1–47, 1985.
- LAUGHLIN, S. B. Principles of sensory coding and processing: general introduction. **Journal of Experimental Biology**, v. 146, p. R1–R8, 1989.
- LAUGHLIN, S. B. **The roles of the parallel channels in the early visual processing by the arthropod compound eye.** In: ALI, M. A. (Ed.). Photoreception and vision in invertebrates. New York: Plenum Press, 1982. v. 74.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência.** 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, v. 1. 698 p, 2005.
- LEWICKI, M. S. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. **Network-Computation in Neural Systems**, v. 9, n. 4, p. 53–78, 1998.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.

- McKENNA, T M; MCMULLEN, T A. & SHLESINGE, M A. The Brain as a Dynamic Physical System, **Neuroscience** 60, 587-605, 1994.
- NEMENNAN, I., Lewen, G D, Bialek, W, & Steveninck, R R R. Neural coding of natural stimuli: information at sub-millisecond resolution. **Plos Computational Biology**, v. 4, n. 3, p. 1–12, 2008.
- NICOLELIS M.A.L. The amazing adventures of robotrat. **Trends in Cognitive Sciences**, Volume 6, Number 11, 1 November, pp. 449-450(2), 2002.
- NICOLELIS, M.A., RIBEIRO, S. Multielectrode recordings: the next steps. **Curr Opin Neurobiol.** Oct;12(5):602-6, 2002.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.** Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. **In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- OZTOPA,E.; IMAMIZUB, H.; CHENGA, G.; KAWATOA, M. A COMPUTATIONAL MODEL OF ANTERIOR INTRAPARIETAL (AIP) NEURONS. **NEUROCOMPUTING** 69: 1354–1361, 2006
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- PURVES, D; AUGUSTINE, G J; FITZPATRICK, D; HALL, W C; LAMANTIA, A S; MCNAMARA, J O & S. WILLIAMS, M. **Neuroscience**. Third editor, Hardcover: Sinauer Associates, p. 832, 2004.
- RAPP, P. E.; ZIMMERMAN, I. D.; ALBANO, A. M.; DEGUZMAN, G. C.; GREENBAUN, N. N. Dynamics of spontaneous neural activity in the simian motor cortex: The dimension of chaotic neurons. **Physics Letters A**, Volume 110, Issue 6, p. 335-338, 1985.
- RIEKE, F.; Warland, D; Steveninck, RR; and Bialek, W. **Spikes: exploring the neural code**. Cambridge, MA, USA: MIT Press, 1999.

- RIND, F. C. Bioinspired Sensors: From Insect Eyes to Robot Vision. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481–485, 1997.
- SAS Institute Inc., **SAS User's Guide: Statistics**, Version, 8th Edition, Cary, NC, USA, 2001.
- SCHWEMER, J. **Visual pigments of compound eyes structure, photochemistry, and regeneration**. In: STAVENGA, D. G.; HARDIE, R. C. (Ed.). Facets of vision. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1989. p. 112–133.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SPAVIERI, D. L. **Effect of temperature and light on the representation of motion information in the fly's visual system**. 2009. 89 p. Thesis (Doctoral) - Ludwig-Maximilians Universität, München, 2009.
- SRINIVASAN MV, ZHANG S, ALTWEIN M, TAUTZ J. Honeybee navigation: nature and calibration of the “odometer.” **Science** 287:851–853, 2000.
- STAVENGA, D.G. Modern Optical Tools for Studying Insect Eyes. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- STEVENINCK, R. D. R. V.; BIALEK, W. Real-time performance of a movement-sensitive neuron in the blowfly visual system: coding and information transfer in short spike sequences. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 234, n. 1277, p. 379–414, 1988.
- STEVENINCK, R. R. V. ; LEWEN, G D ; STRONG, S. P. ; KOBERLE, R. ; BIALEK, W. . Reproducibility and variability in neural spike trains. . **Science**, Estados Unidos, v. 275, p. 1805-1807, 1997.
- STRAUSFELD, N. J. **Functional neuroanatomy of the blowfly's visual system**. In: ALI, M. A. (Ed.). Photoreception and vision in invertebrates. New York: Plenum Press, 1982. v. 74.
- STRONG, S. P. ; KOBERLE, R. ; STEVENINCK, R. R. V. ; BIALEK, W. . Entropy and Information in Neural Spike Trains. **Physical Review Letters**, Estados Unidos, v. 80, p. 197-200, 1998.

- SUKONTASON KL, CHAIWONG T, PIANGJAI S, UPAKUT S, MOOPHAYAK K, SUKONTASON K. OMMATIDIA of blow fly, house fly, and flesh fly: implication of their vision efficiency. **Parasitol Res**; 103(1): 123-31, 2008.
- TATLER, B.; O'CARROLL, D. C.; LAUGHILIN, S. Temperature and the temporal resolving power of fly photoreceptors. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, v. 186, n. 4, p. 399–407, 2000.
- VOGT, K. Is the fly visual pigment a rhodopsin. Zeitschrift Für Naturforschung C: **Journal of Biosciences**, v. 38, n. 3-4, p. 329–333, 1983.
- VOGT, K.; KIRSCHFELD, K. Chemical identity of the chromophores of fly visual pigment. **Naturwissenschaften**, v. 71, n. 4, p. 211–213, 1984.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WAGNER H. Flight performance and visual control of the flight of the free-flying housefly (*Musca domestica*). II. Pursuit of targets. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B** 312:553–579, 1986.
- WAGNER, H. **Aspects of the free flight behaviour of houseflies (*Musca domestica*)**. In: GEWECKE, M.; WENDLER, G. (Ed.). Insect locomotion. Berlin, Hamburg: Paul Parey, p. 223–232, 1985.
- WEHRHAHN, C.; POGGIO, T.; BULTHOFF, H. Tracking and chasing in houseflies (musca) - an analysis of 3-d flight trajectories. **Biological Cybernetics**, v. 45, n. 2, p. 123–130, 1982.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WORM, K., DRAGSHOLT, C., KRINGSHOLM, B., Citalopram concentrations in samples from autopsies and living persons, **Int. J. Leg. Med.** 111, 188-190, 1998.
- YU CR, POWER J, BARNEA G, O'DONNELL S, BROWN HE, OSBORNE J, AXEL R, GOGOS JA. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. **Neuron**. 27;42(4):553-66, 2004.
- ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 267 p, 1965.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL

Inúmeros são os trabalhos científicos realizados com dípteros, devido ao grande número de espécies descritas, fácil manutenção sob condições experimentais, rápida produção de grande número de descendentes, além de diversas espécies apresentarem importância agrícola como agentes polinizadores ou como pragas agrícolas (ANDERSON *et al.*, 1982; SULAIMAN *et al.*, 1988, 1989), outras poderem também ser vetoras de doenças, apresentando importância médico/veterinária (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983; FURLANETTO *et al.* 1984; PESSOA & MARTINS, 1988; MARCONDES, 2001; STONEHOUSE *et al.*, 2004) e até algumas espécies com importância forense, como indicadoras do tempo decorrido desde a morte até a descoberta do corpo (GUIMARÃES *et al.*, 1978; PESSOA & MARTINS, 1988; CATTS & GOFF, 1992; MARCONDES, 2001; STONEHOUSE *et al.*, 2004).

Dentre os dípteros que apresentam importância médico-veterinária, forense e até agrícola, destaca-se a mosca-varejeira *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), que é um inseto com desenvolvimento holometábolo, apresentando quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2011). E cada uma destes estágios possui múltiplos canais sensoriais que extraem a informação do meio externo e a convertem em respostas comportamentais e memória (HOMBERG, 2005).

Diversos trabalhos já foram realizados observando detalhes nas diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, como por exemplo: estudos de morfologia larval (ISHIJIMA, 1967; QUEIROZ & CARVALHO, 1987), avaliação de taxas de incremento de massa durante o desenvolvimento sob influência de alterações na temperatura (MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 1996; VÉLEZ & WOLFF, 2008), tabelas de vida e duração dos diferentes estágios (GABRE *et al.*, 2005; WELLS & KURAHASHI, 1994), influência de substâncias químicas na taxa de incremento de massa durante o desenvolvimento (BOUREL *et al.*, 2001; CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997), influência da densidade/competição/predação durante o desenvolvimento larval (VON ZUBEN, 1995; ROSA *et al.*, 2006), além de processos de dispersão larval pós-alimentar (GOMES *et al.*, 2006) e análises aerodinâmicas e neurofisiológicas do voo, durante respostas a estímulos visuais (LAND & COLLET, 1974; BUELTHOFF *et al.*, 1980; HAUSEN, 1982; WEHRHAHN *et al.*, 1982; WAGNER, 1985; DICKINSON *et al.*, 1999; FRYE, 2001; BORST & HAAG, 2002; FERNANDES *et al.*, 2010), dentre outros.

Como se pode perceber, a maior parte dos trabalhos com este díptero envolve aspectos morfológicos, biológicos ou ecológicos de diferentes fases do desenvolvimento, e poucos trabalhos procuram compreender alguns aspectos fisiológicos de *C. megacephala*. Pelo

exposto, a compreensão de tópicos relacionados à fisiologia desta espécie é de extrema importância, auxiliando na melhor compreensão de aspectos comportamentais e da biologia que vierem a ser considerados, em outros estudos que venham a ser realizados com esta espécie.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo contribuir para um melhor conhecimento de alguns processos fisiológicos de *C. megacephala*, sob a influência de diferentes tratamentos nas diferentes fases de seu ciclo de vida, focando em três áreas de estudo da fisiologia: metabolismo energético, termorregulação e neurofisiologia sensorial.

Os resultados do presente estudo (Capítulo 2) mostraram que os tratamentos causaram alterações distintas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*, sendo que o tratamento Diazepam e o tratamento fotoperíodo de 24h (Claro) retardaram o ganho de massa por unidade de tempo, quando comparados com o Controle-Dieta. Já os tratamentos Controle-Carne, Citalopram e Escuro aceleraram o ganho de massa por tempo, quando comparados com o Controle-Dieta.

No entanto, as taxas metabólicas sofreram alterações distintas em cada fase da vida dessas moscas. Foram observadas alterações principalmente na fase de 1^o instar do estágio larval, fase na qual o indivíduo possui maior consumo de O₂ em relação a todas as outras fases de seu ciclo de vida; no entanto, serão necessários mais experimentos avaliando a presença de outras vias metabólicas associadas a este grande aumento na taxa de metabolismo observada.

Este alto metabolismo observado na fase larval de *C. megacephala*, reflete em grandes conversões de energia, que devido à segunda lei da termodinâmica, gera entropia, a qual é dissipada neste sistema, na forma de calor. Tal dissipação de temperatura foi considerada no Capítulo 3, em que consta que durante o estágio larval, pode-se observar que a presença de larvas aumentou de forma distinta a temperatura do conjunto agregado+substrato alimentar, de acordo com cada efeito do tratamento.

Foi observado que a presença de drogas (Citalopram e Diazepam) aumentou a temperatura média em relação ao controle-dieta, principalmente nos primeiros dias do desenvolvimento (Figuras 1 e 2 – Capítulo 3), talvez devido a alterações de processos metabólicos ou vias de desintoxicação presentes durante o início do desenvolvimento larval, quando grande parte das drogas ainda estava presente. No entanto, na presença de drogas, o metabolismo larval durante as primeiras horas do desenvolvimento foi significativamente menor do que o observado no Controle-dieta (Figura 2 – Capítulo 2), indicando que o

aumento da temperatura do conjunto agregado+substrato alimentar, neste caso, não está relacionado a processos de conversão de energia, ou seja, vias metabólicas. Dentre as variáveis observadas no conjunto agregado+substrato alimentar, a perda de água nos diferentes frascos pode ter acarretado temperaturas diferentes, uma vez que a maior evaporação reduziria a temperatura do conjunto; no entanto, a perda de água foi praticamente idêntica nos frascos com presença de drogas e no controle (Figura 3 – Capítulo 3).

É importante ressaltar também que as duas drogas, além dos efeitos psicotrópicos (Citalopram e Diazepam, respectivamente, antidepressivo e ansiolítico), apresentam efeitos antibióticos, ou seja, efeito inibitório (do antidepressivo e do ansiolítico utilizados) sobre o crescimento de microrganismos (BATAI *et al.*, 1999; NEAL *et al.*, 2001; KRUSZEWSKA *et al.*, 2006), os quais auxiliam no processo de assimilação dos nutrientes por larvas de moscas (HOBSON, 1931, 1932), principalmente no 1º ínstar. Sabe-se que a nutrição larval de moscas-varejeiras foi estudada inicialmente por HOBSON (1932) e MACKERRAS & FRENEY (1933), que detectaram a importância de microrganismos como fatores promotores de crescimento no substrato de alimentação larval, como por exemplo, a flora bacteriana normal.

Assim, a redução da flora bacteriana no conjunto agregado+substrato alimentar, na presença de drogas, reduziria o metabolismo avaliado nestes tratamentos; no entanto, é importante considerar que estas drogas podem agir em processos de termogênese no corpo das larvas, tópico que não foi objeto de investigação no presente trabalho.

A alteração de fotoperíodo também aumentou a temperatura média do conjunto quando se compara com o controle-dieta, sendo que o metabolismo larval dos indivíduos na presença / ausência constante de luz foi idêntico ao observado no controle-dieta.

Após a obtenção e análise dos resultados obtidos no presente trabalho, alguns detalhes também merecem ser comentados em relação à metodologia que foi utilizada, como por exemplo, o fato de em alguns casos, o agregado poder ter ficado mais próximo ao sensor e/ou mais na superfície do substrato. Isto pode ter sido analisado como um aumento da temperatura do conjunto agregado+substrato alimentar ou superficial (respectivamente); porém, na verdade, poderia estar auxiliando nas trocas de calor e dissipação térmica quando da obtenção do dado, ou seja, o resultado (maior temperatura) poderia estar sendo mascarado em partes, pela proximidade do agregado em relação ao sensor, ou ainda por um comportamento larval de alimentação mais próximo à superfície. No entanto, vale ressaltar também que foram feitas repetições, e tal resultado foi constatado novamente em todos os tratamentos, ou seja, o aumento ou diminuição da temperatura, dependendo do tratamento, se repetiram quando foi realizado novamente o experimento.

Já as larvas de *C. megacephala* que se desenvolveram em carne apresentaram uma grande aceleração da fase larval, com um metabolismo significativamente maior que todos os outros tratamentos (durante os dois primeiros instares larvais), o que refletiu na maior termogênese, ou seja, a temperatura do conjunto larvas+carne foi muito maior do que em todos os outros tratamentos.

Na fase de pupa, podem-se observar alterações em relação aos tratamentos: os indivíduos que emergiram antes (Diazepam e Controle-Carne) apresentaram um metabolismo maior que o Controle-Dieta. A incidência constante da luz também aumentou o metabolismo específico na fase de pupa.

Já no caso do metabolismo observado nos adultos, pode-se observar um aumento no escopo metabólico em torno de 15º dia de vida, talvez relacionado com o período de reprodução da espécie, uma vez que as fêmeas já estariam maduras sexualmente (LINHARES, 1988).

Foram observadas algumas diferenças no metabolismo de repouso e de atividade dos adultos, quando se compara os tratamentos (Figura 4 – Capítulo 2). O tratamento Escuro foi o que mais mostrou alterações metabólicas em comparação com outros tratamentos avaliados, tanto no metabolismo de repouso quanto no escopo. Os indivíduos deste tratamento somente tiveram contato com luz no momento da experimentação, e consequentemente, esta informação eletromagnética gerou respostas comportamentais que refletiram no metabolismo destes adultos, tornando-os mais ativos e consequentemente aumentando o consumo de O₂ por tempo. Vale a pena ressaltar também que os dados de metabolismo obtidos para os diferentes tratamentos, poderiam sofrer alterações caso o indivíduo sendo analisado ficasse em atividade de voo durante todo o experimento. A ausência de luz faz os indivíduos ficarem em repouso, e a presença de luz poderia ter ocasionado indivíduos em atividade de voo ou parados, dado este que é mais complicado de ser padronizado. Desta forma, foi definido que seria considerado o metabolismo de atividade espontânea, uma vez que a atividade do indivíduo na presença de luz não pode ser padronizada.

Assim, na análise dos adultos, pode-se concluir que a atividade de *C. megacephala* é bastante dependente da luz, e apresentou dois picos ao longo do dia, sendo o primeiro logo após a presença da luz e, o segundo, horas antes da luz se apagar, talvez devido à própria temperatura do ambiente ser um fator limitante aos adultos quando a T°amb se torna bastante alta. Este último fato também foi comprovado, pois acima de temperaturas de 25 °C, a atividade dos adultos é reduzida. Este comportamento de atividade durante o dia foi observado nos indivíduos com fotoperíodo de 12h (Controle-dieta, Citalopram e Diazepam).

Em relação à atividade nos tratamentos com drogas e fotoperíodo, foram observadas alterações na temperatura corpórea principalmente nos tratamentos em que havia a presença ou ausência total de luz durante todo o desenvolvimento, em comparação ao controle (12h fotoperíodo – dieta), ou seja, a luz alterou o ciclo circadiano da espécie.

A alteração do ciclo circadiano teve influência da presença e ausência constante da luz durante todo o desenvolvimento, o que pode ter acarretado alterações na percepção sensorial (visão) desta espécie. Foi também observado que a análise da neurofisiologia do neurônio H1 do sistema visual de *C. megacephala*, mostrou algumas semelhanças e alterações sob influência dos tratamentos e da variação da idade dos indivíduos. Por exemplo, foi possível observar que o tempo de resposta praticamente não apresentou diferenças significativas nos diferentes tratamentos e também considerando a idade dos adultos avaliados, ou seja, a resposta do neurônio H1 não sofreu influência do tratamento no qual o adulto foi gerado.

No entanto, tanto a presença quanto a ausência constante de luz geraram algumas alterações no padrão de resposta do neurônio H1, com ambos reduzindo as taxas de disparo; o intervalo entre os spikes desses tratamentos foi maior nas moscas mais jovens e a primeira resposta do tratamento Escuro tendeu a ser maior que a observada nos outros tratamentos. Ou seja, a luz constantemente presente ou ausente influencia diretamente em alguns padrões de resposta do neurônio H1, talvez pela alteração de fatores anteriores como, por exemplo: sensibilidade das células receptoras, ou vias neurais anteriores de processamento da informação que podem alterar o tempo da resposta do H1.

Já nos tratamentos na presença de droga, podem-se constatar reduções na taxa de disparo, principalmente redução na frequência de disparos nos indivíduos mais jovens, talvez por ainda sofrerem influências das substâncias químicas em seu corpo, uma vez que estas drogas estavam presentes no estágio larval. Além disto, quando se avaliou o tempo dos primeiros disparos do neurônio H1 após o estímulo, o tempo observado no tratamento Diazepam foi aquele mais retardado de todos, talvez pela própria função ansiolítica desta substância.

Pode-se constatar também que quanto maior a idade das moscas, maior é a taxa de disparo observado; porém, o tempo de resposta parece não ter grandes alterações com o aumento da idade desses dípteros.

Em relação ao efeito da temperatura sobre os adultos de *C. megacephala*, foi possível perceber que a atividade é bastante alterada, reduzindo em temperaturas acima de 25 °C e abaixo de 15 °C, sendo que seu pico ocorria em torno de 25 °C. No presente trabalho, foi descrito um interessante comportamento de termorregulação destes indivíduos, que foi

definido como arrefecimento pelo fluxo salivar, no qual o indivíduo podia reduzir sua $T^{\circ}\text{corp}$ sob condições de altas temperaturas ou durante momentos de inatividade, após o início da ausência de luz no ambiente.

No entanto, apesar da grande quantidade de resultados inéditos apresentados neste trabalho, são necessários mais estudos visando avaliar mais detalhadamente os efeitos das substâncias químicas, do fotoperíodo e do substrato alimentar no metabolismo, nas células e a nível molecular ao longo das diferentes fases do desenvolvimento de *C. megacephala*, para uma melhor compreensão dos efeitos gerados neste desenvolvimento.

CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo, observando o desenvolvimento deste inseto sem comparações entre os tratamentos, mostraram que existe uma grande alteração no metabolismo e no perfil térmico ao longo dos diferentes estágios do ciclo de vida de *C. megacephala* e em alguns aspectos da neurofisiologia sensorial durante sua fase de adulto.

No aspecto metabólico, foi observado que o estágio larval, principalmente o 1º instar, apresenta o maior consumo de O_2 em relação a todos os outros estágios da vida desse díptero, o que é refletido no perfil térmico, no qual grande quantidade de calor é dissipada durante este estágio.

O ciclo de atividade dos adultos de *C. megacephala* é influenciado pelo fotoperíodo e temperatura do ambiente, sendo que esta espécie utiliza comportamentos de termorregulação quando ocorre aumento da temperatura ambiental ou alterações na presença e ausência de luz.

Alteração da qualidade do substrato alimentar:

- o desenvolvimento de *C. megacephala* em carne bovina é muito mais acelerado que o observado em todos os outros tratamentos, sendo que esta aceleração é também observada no aumento do metabolismo destes indivíduos principalmente no estágio larval e também no calor produzido e dissipado durante este estágio, comparado com todos os outros tratamentos;

- a qualidade nutricional e a decomposição da carne é muito mais acelerada que a observada na dieta, o que fornece maior quantidade de fontes alimentares que podem ser assimilados com maior facilidade pelo estágio larval de *C. megacephala*.

Presença das drogas:

- a presença de drogas gerou respostas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*: aumentou (com o Citalopram) ou reduziu (com o Diazepam) o ganho de massa por tempo;

- a presença das drogas reduziu o metabolismo nos primeiros instares larvais;
 - o metabolismo e mortalidade dos adultos foram alterados em relação ao controle-dieta;
 - a presença das drogas aumentou a temperatura do conjunto agregado larval+substrato alimentar;

- a presença das drogas não modificou a atividade ao longo do dia,
 - a taxa de disparos do neurônio H1 foi reduzida nos adultos mais jovens, e no tratamento Diazepam foi observado o maior atraso na resposta dos primeiros spikes;

Alteração do fotoperíodo:

- também gerou respostas nas diferentes fases do ciclo de vida de *C. megacephala*: redução (no Claro) ou aumento (no Escuro) do ganho de massa, durante o desenvolvimento larval;

- não alterou o metabolismo nos primeiros instares larvais,
 - gerou grandes alterações no metabolismo dos adultos em repouso e durante atividades espontâneas;

- o ciclo de atividade foi drasticamente alterado, e consequentemente, causou alterações na temperatura de porções do corpo de *C. megacephala* ao longo do dia,

- ambos os tratamentos (Claro e Escuro) reduziram as taxas de disparo neurais, sendo que o intervalo entre os spikes desses tratamentos foi maior nas moscas mais jovens e a primeira resposta do tratamento Escuro tendeu a ser maior que a observada nos outros tratamentos;

Referências Bibliográficas

- BATAL, I., M. KERENYI & M. TEKES. The impact of drugs used in anaesthesia on bacteria. **Eur. J. Anesthesiol.** 16: 425–440, 1999.
- BORST, A.; HAAG, J. Neural networks in the cockpit of the fly. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, v. 188, n. 6, p. 419–437, 2002.

- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BUELTHOFF, H.; POGGIO, T.; WEHRHAHN, C. 3-d analysis of the flight trajectories of flies (*drosophila melanogaster*). Zeitschrift Fur Naturforschung C: **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 9-10, p. 811–815, 1980.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- DICKINSON, M. H.; LEHMANN, F. O.; SANE, S. P. Wing rotation and the aerodynamic basis of insect flight. **Science**, v. 284, n. 5422, p. 1954–1960, 1999.
- FERNANDES, N. M. **Acuidade visual e codificação neural da mosca *Chrysomya megacephala***. 102 p. Tese (Doutorado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.
- FRYE, M. A. & DICKINSON, M. H. Fly flight: a model for the neural control of complex behavior. **Neuron**, v. 32, n. 3, p. 385–388, 2001.
- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA , G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GABRE, R. M.; F. F. ADHAM & H. CHI. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologica** 27: 179–183, 2005.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, L. ; ZUBEN, C. J. V. ; GODOY, W. A. C. . A review of post-feeding larval dispersal in blowflies: implications for forensic entomology.. *Naturwissenschaften*, Alemanha, v. 93, p. 207-215, 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.

- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HAUSEN, K. Motion sensitive interneurons in the optomotor system of the fly. 2. the horizontal cells - receptive-field organization and response characteristics. **Biological Cybernetics**, v. 46, n. 1, p. 67–79, 1982.
- HOBSON, R. P. Studies on the Nutrition of Blow-Fly Larvae: I. Structure and Function of the Alimentary Tract. **J. Exp. Biol.**, 8:109-123, 1931.
- HOBSON, R. P. Studies on the Nutrition of Blow-Fly Larvae: II. Role of the Intestinal Flora in Digestion. **J. Exp. Biol.**, 9:128-138, 1932.
- HOMBERG, U. Multisensory Processing in the Insect Brain. Editado: CHRISTENSEN, T. A. **Methods in Insect Sensory Neuroscience**. Publicado por CRC Press, p. 422, 2004.
- ISHIJIMA H. Revision of the third stage larvae of synantropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). **Japan J Sanit Zool** 18: 47-100, 1967.
- KRUSZEWSKA, H., ZAR BA, T., TYSKI, S. Estimation of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. **Acta Pol. Pharm.**, 63(5):457-60, 2006.
- LAND, M. F.; COLLETT, T. S. Chasing behavior of houseflies (*Fannia canicularis*) - description and analysis. **Journal of Comparative Physiology**, v. 89, n. 4, p. 331–357, 1974.
- LINHARES, A.X. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. **Revta bras. Ent.** 32 (3/4): 383-392, 1988.
- MACKERRAS, M. J. & FRENEY, M. R. Observations on the nutrition of Australian blowflies. **J. exp. Biol** 10, 237-46, 1933.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; CARRARO, M.V.; MARTINS, C.; MOREIRA, O.I.; CRUZ, M. & SERAFIN, I. Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4):793-798, 1996.
- NEAL, C.P., FREESTONE, P.P.E., MAGGS, A.F., HAIGH, R.D., WILLIAMS, P.H. & LYTE, M. Catecholamine inotropes as growth factors for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology Letters** 194:163-169, 2001.
- O'BRIEN, C. & B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.

- PESSÔA, S. B. & MARTINS A. V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara, 11ª edição, Rio de Janeiro, p. 872, 1988.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- QUEIROZ, S.M.P. & CARVALHO, C.J.B. DE. Chave pictórica e descrição de larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em Vazadouros de Resíduos Sólidos Domésticos em Curitiba, Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 16(2):265-288, 1987.
- ROSA, G. S., CARVALHO, L. R., REIS, S. F., GODOY, W. A. C. The Dynamics of Intraguild Predation in *Chrysomya albiceps* Wied. (Diptera: Calliphoridae): Interactions between Instars and Species under Different Abundances of Food. **Neot. Ent.** 35: 775-780, 2006.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481-485, 1997.
- STONEHOUSE, J., MUMFORD, J., POSWAL, A. MAHMOOD, R., MAKHDUM, A. H., CHAUDHARY, Z. M., BALOCH, K. N., MUSTAFA, G. & MCALLISTER, M. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: tephritidae). **Crop Protection**, 23: 293-296, 2004.
- TRIPLEHORN, C. A. & JOHNSON, N. F. Estudo dos Insetos. Editora: Cengage Learning. 808p. 2011.
- VÉLEZ, M.C. & WOLF, M. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 48:41-47, 2008.
- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)**. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.
- WAGNER, H. **Aspects of the free flight behaviour of houseflies (*Musca domestica*)**. In: GEWECKE, M.; WENDLER, G. (Ed.). Insect locomotion. Berlin, Hamburg: Paul Parey, p. 223-232, 1985.
- WEHRHAHN, C.; POGGIO, T.; BULTHOFF, H. Tracking and chasing in houseflies (musca) - an analysis of 3-d flight trajectories. **Biological Cybernetics**, v. 45, n. 2, p. 123-130, 1982.

WELLS, J.D. & KURAHASHI, H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera:Calliphoridae) development: Rate, variation, and the implications for forensic entomology. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, 45(4):303-309, 1994.

ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 267 p, 1965.

APÊNDICE A

VARIAÇÃO DO METABOLISMO ESPECÍFICO, ABSOLUTO E MASSA AO LONGO DO CICLO COMPLETO DE
DESENVOLVIMENTO DE *C. MEGACEPHALA*, NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.

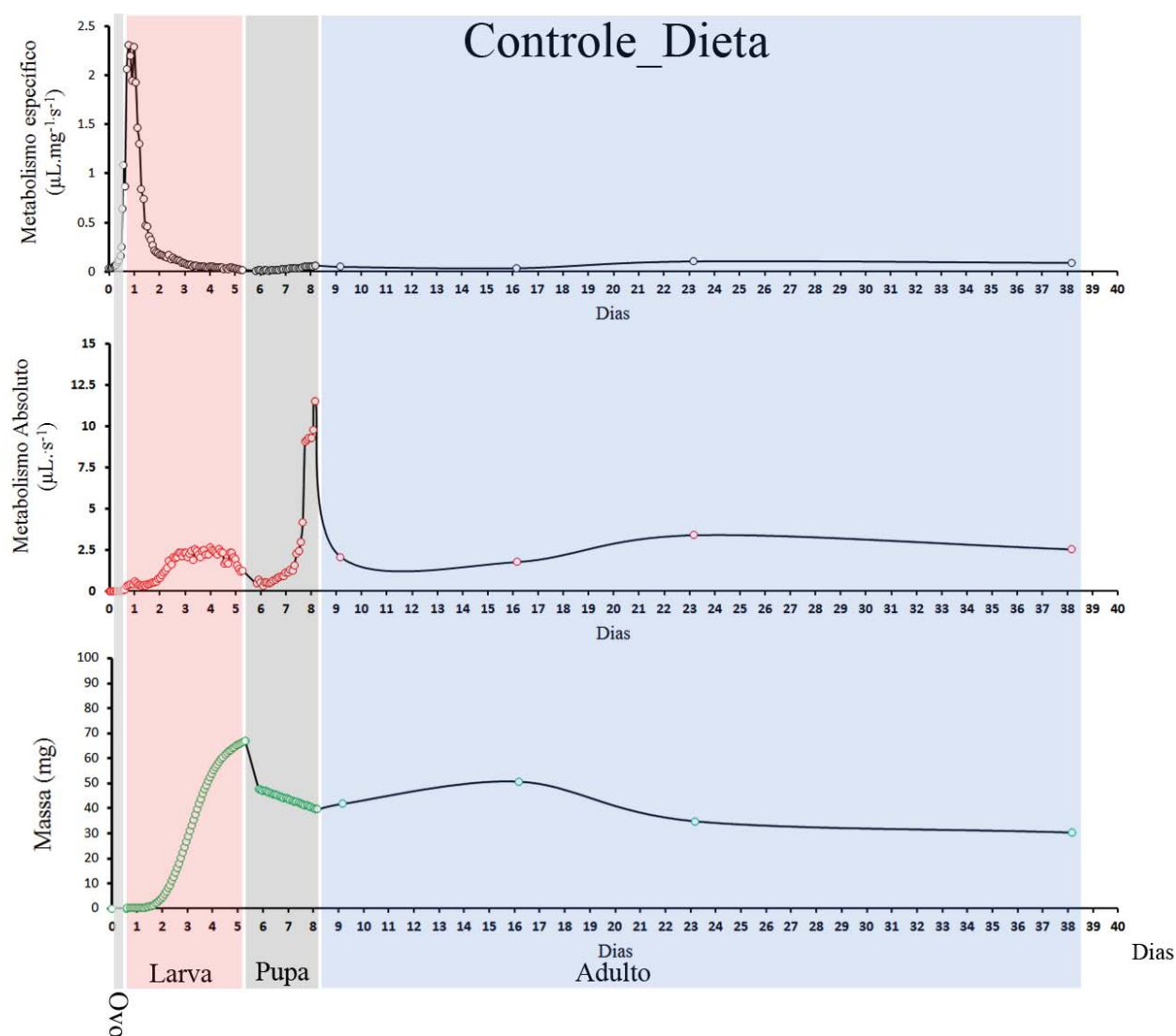


FIGURA 1. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala* no tratamento Controle-Dieta.

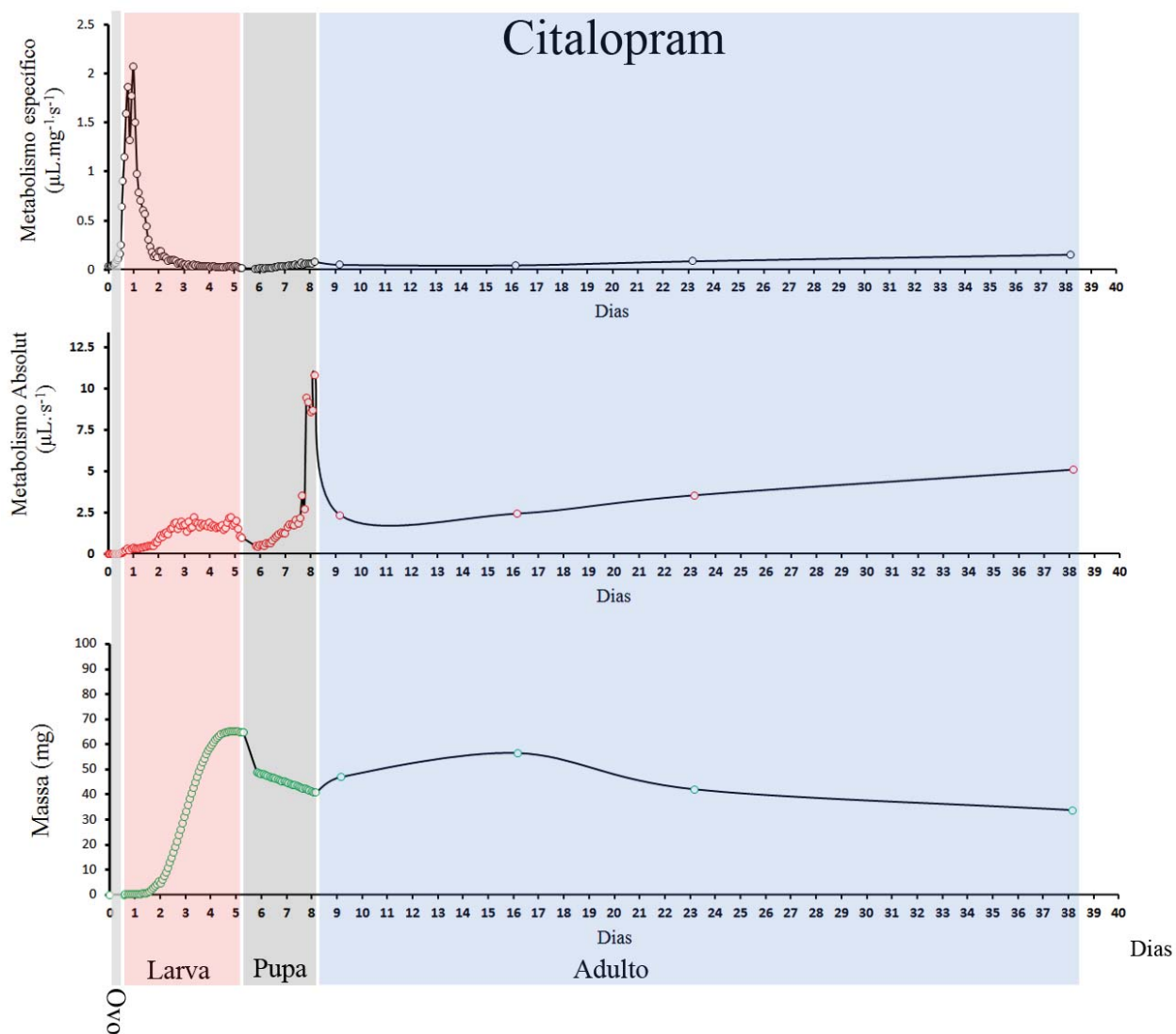


FIGURA 2. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala* no tratamento Citalopram.

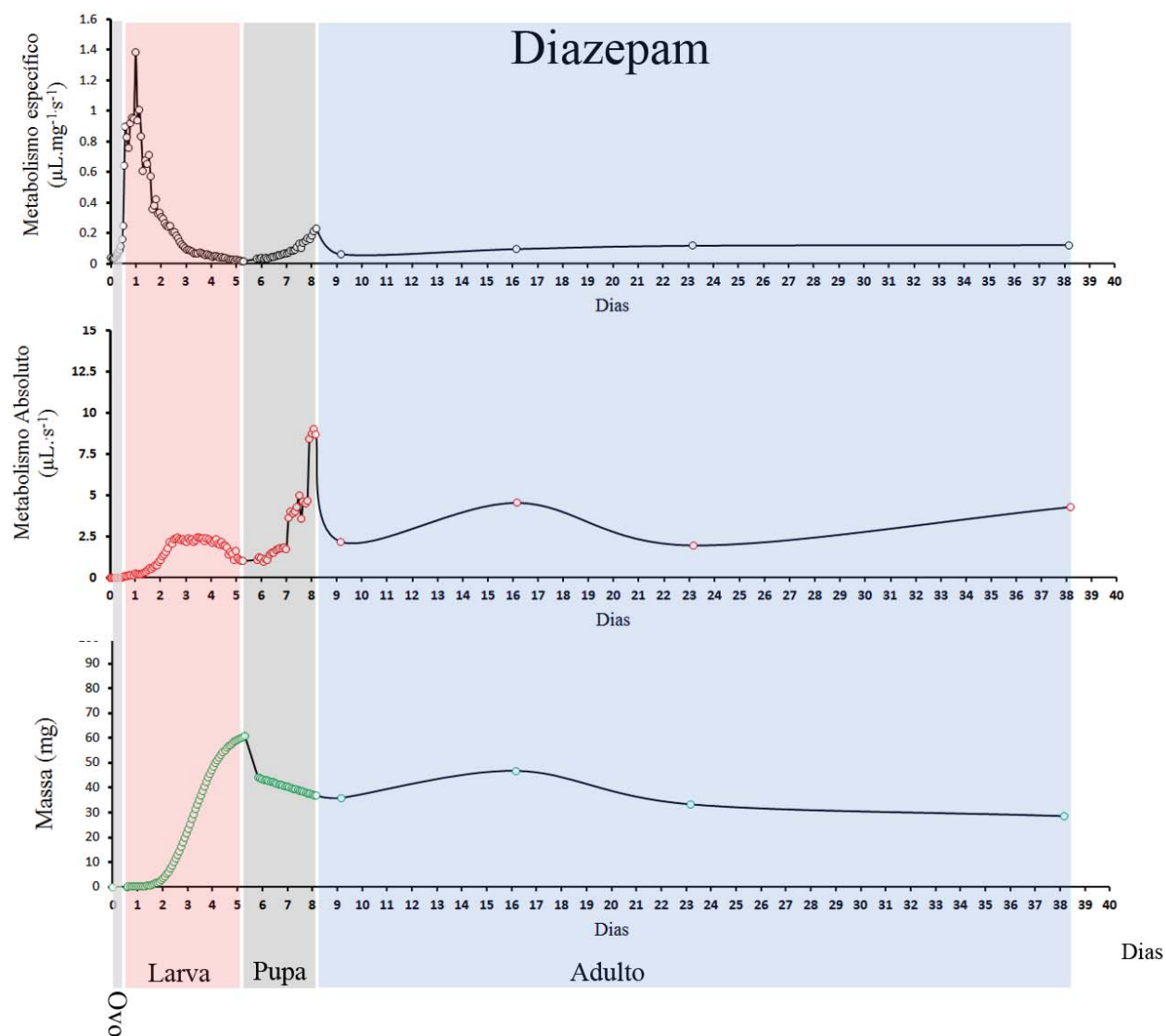


FIGURA 3. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala* no tratamento Diazepam.

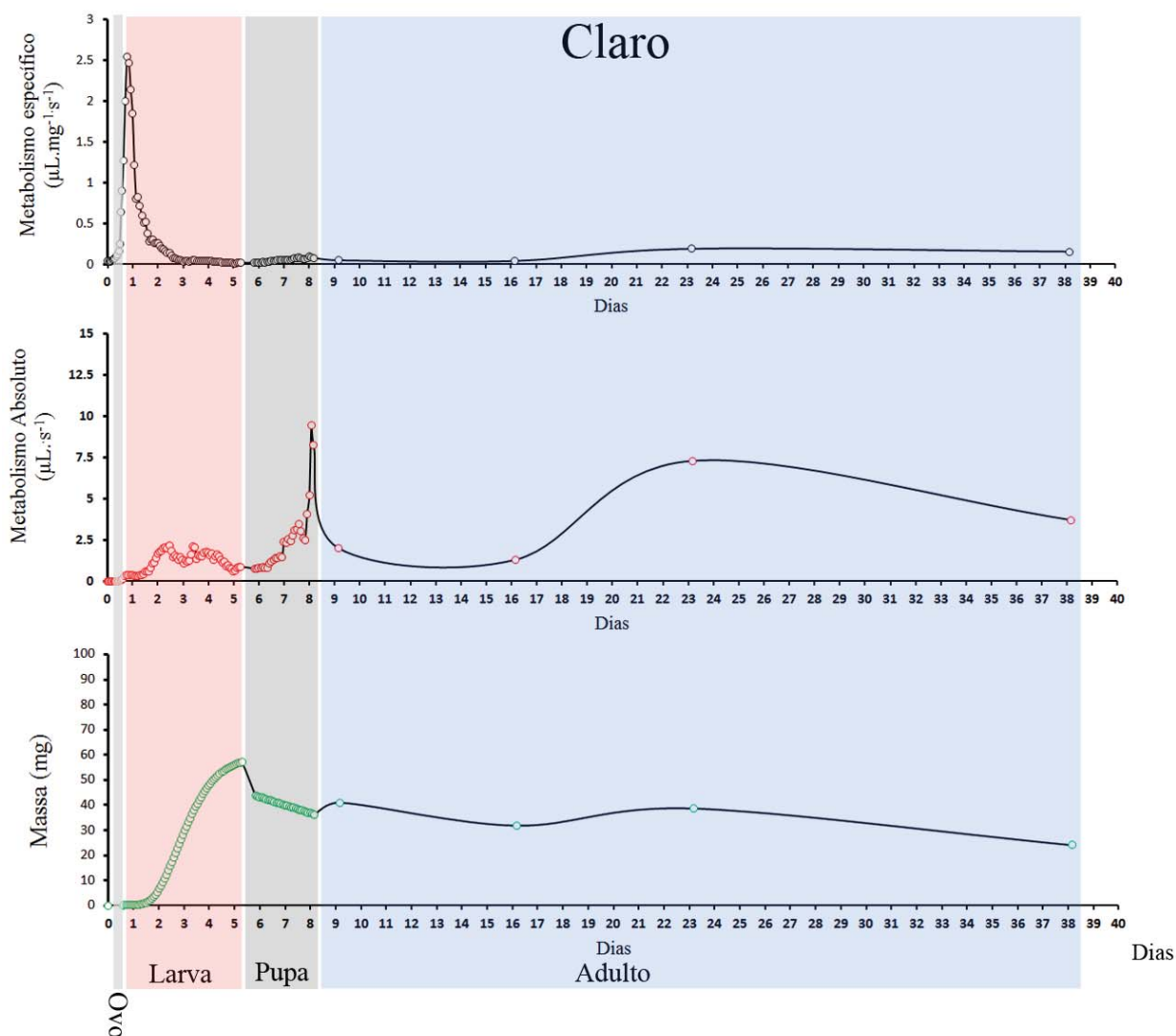


FIGURA 4. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala* no tratamento Claro.

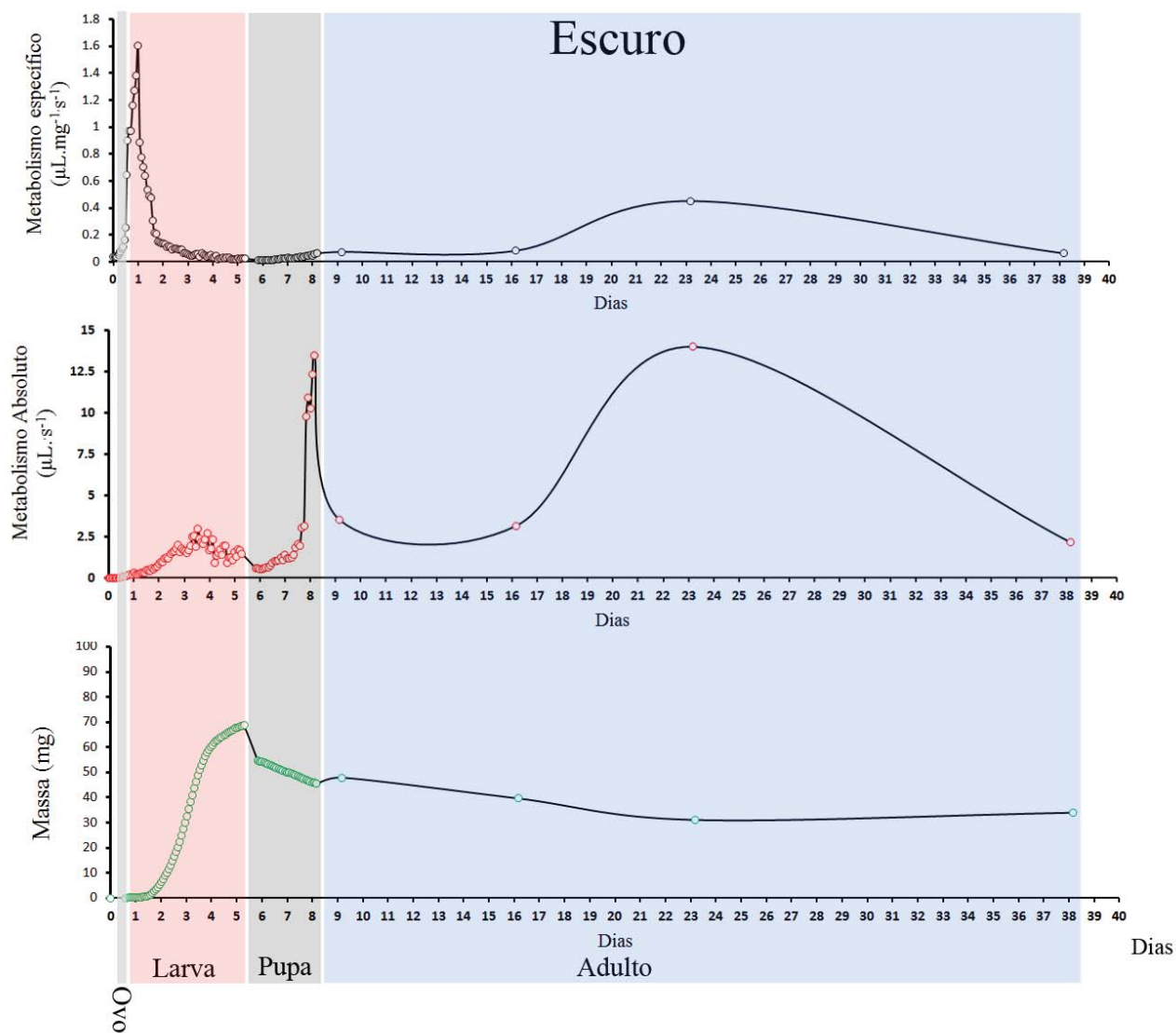


FIGURA 5. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala* no tratamento Escuro.

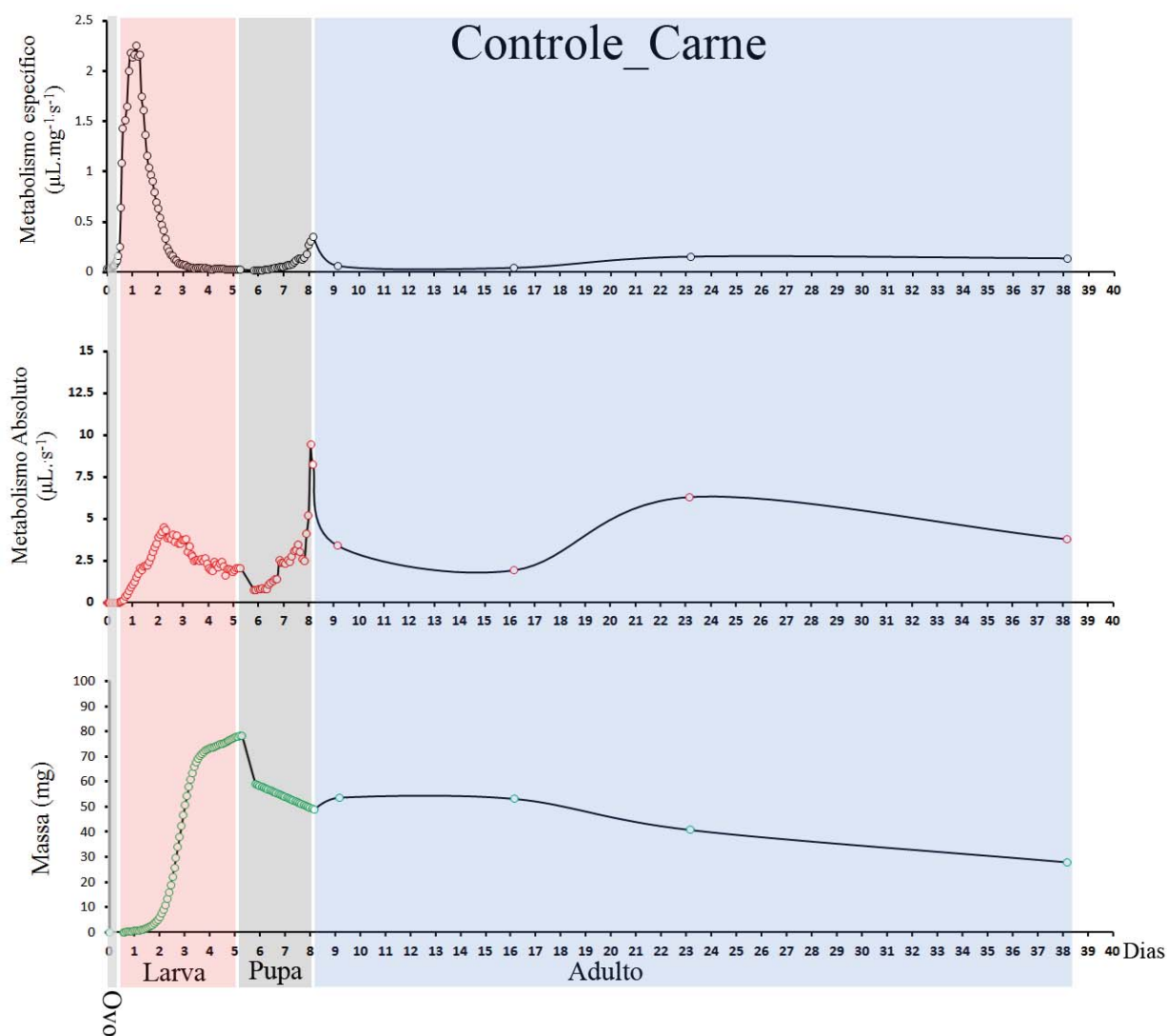


FIGURA 6. Variação do metabolismo específico, absoluto e massa ao longo do ciclo completo de desenvolvimento de *C. megacephala* no tratamento Controle-Carne.