

Relação entre o desenvolvimento dos ovários e atividade dos
Corpora Allata de operárias de *Frieseomelitta silvestri languida*
(Hymenoptera, Apidae).¹

Marina A. Staurengo da Cunha²

Rubens Alves da Cunha³

Marcia A. de Lima Pimentel²

ABSTRACT

Interaction between ovarian development and corpora allata activity in Frieseomelitta silvestri languida workers (Hymenoptera, Apidae). In the absence of the queen, a few workers of F. s. languida developed their ovaries forming nevertheless, only one follicle with a single oocyte which was unable to form yolk spheres. They never showed signals of degeneration or resorption. The corpora allata were homogeneous during all the 5 months of orphanage studied. Its activity might be low but constant, able to maintain the follicle entire, but unable to promote the yolk spheres assembly.

A dominância da rainha sobre as operárias numa colônia pode ser medida pelo grau de desenvolvimento dos ovários destas quando na sua presença ou ausência. Esta dominância pode ser exercida tanto física, como quimicamente através da liberação de feromônios, que são substâncias químicas que influenciam o comportamento e a fisiologia das operárias.

Em *Apis mellifera*, as operárias não desenvolvem os ovários na presença da rainha, só o fazendo na sua ausência (GROOT & VOODG, 1954). Sabe-se que o desenvolvimento dos ovários das operárias é controlado pelo feromônio ácido trans-9-ceto-2-decenóico, produzido pelas glândulas mandibulares da rainha e distribuído entre as operárias pelo contato e pela atividade de trofalaxis entre operárias (VELTHUIS, 1972). Este feromônio inibe o desenvolvimento dos ovários das operárias por inibir a produção de hormônio juvenil (HJ) pelos corpora allata (CA) (LUSCHER & WALKER, 1963; WILSON, 1971). Tanto que em colônias onde as rainhas foram retiradas obtiveram-se operárias poedeiras (OMONS, 1914; VELTHUIS, 1976 *apud* CREWE & VELTHUIS, 1980), e algumas destas operárias podem se tornar o que Sakagami denominou de "falsas rainhas" (HESS, 1972; VELTHUIS, 1970 *apud* CREWE & VELTHUIS, 1980).

¹ Trabalho realizado com auxílio do CNPq e FINEP.

² Departamento de Biologia – IB – UNESP, 13500 - Rio Claro - SP.

³ Departamento de Estatística, Matemática Aplicada e Computacional, IGCE – UNESP, 13500 Rio Claro - SP.

Assim, a presença das operárias poedeiras ou “falsas rainhas” pode inibir o desenvolvimento dos ovários das operárias.

Além das glândulas mandibulares na cabeça, *Apis* exhibe ou tras fontes de feromônios, entre elas, as glândulas abdominais terçais de Renner & Baumann (VELTHUIS & ES, 1964; VELTHUIS, 1967, 1970).

No caso dos Meliponíneos, a dominância da rainha não é tão evidente, pois, em certas espécies as operárias desenvolvem os ovários e põem ovos mesmo na presença da rainha, caso bem estudado de *Scaptotrigona postica* (SAKAGAMI et al., 1963; BEGO, 1974; CUNHA, 1977).

Também CAMPOS (1977) demonstrou que no meliponíneo *Leurotrigona muelleri* o HJ aplicado topicamente induz o desenvolvimento dos ovários das operárias na presença da rainha, condição na qual, estariam normalmente inibidos.

Ainda não está claro se os meliponíneos produzem uma substância semelhante à “substância da rainha”. Geralmente as glândulas mandibulares das rainhas destas abelhas são menores que as das operárias, e as glândulas abdominais são mais desenvolvidas que em *Apis* (CRUZ-LANDIM, 1967).

CUNHA et al. (1986) verificaram que algumas poucas operárias órfãs do meliponíneo *Frieseomelitta silvestri languida* desenvolvem um ovaríolo com um folículo cujo ovócito era incapaz de entrar em vitelogênese. Estudando também as glândulas produtoras de feromônios das rainhas desta espécie foi impossível relacionar a ação destas glândulas sobre o desenvolvimento dos ovários das operárias, em parte devido ao assincronismo no desenvolvimento e aparecimento das glândulas, como também da grande longevidade das operárias (CUNHA et al., 1988). Concluiu-se também que somente o produto das glândulas produtoras de feromônios das rainhas não é suficiente para inibir o desenvolvimento dos ovários das operárias desta espécie, uma vez que eliminando-se a fonte inibidora (rainha) algumas operárias entram em processo de diferenciação. Como este não se completa o problema poderia estar no nível de HJ produzido pelos CA.

Procurou-se neste trabalho relacionar o desenvolvimento dos ovários com a atividade dos CA em operárias de *F. s. languida*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas operárias adultas de *Frieseomelitta silvestri languida* sempre coletadas em três fases da vida: recém nascidas ou jovens; meia-idade ou da área de cria; forrageiras ou campeiras, levando-se em conta o grau de esclerotinização do corpo e o tamanho do abdomen (CUNHA et al., 1986).

As operárias foram obtidas de colônias normais, isto é, com uma rainha fecundada e ativa presente, e de colônia órfã. Neste caso coletou-se a rainha e em seguida as operárias aos 12, 25, 45, 70 e 150 dias após a retirada da rainha.

Os órgãos a serem estudados, cabeça-para glândulas mandibulares e corpora allata, e abdomen — para ovários, foram fixados em Bouin alcoólico por 24 horas. Em seguida foram colocados por 10 minutos em água de Javel para amolecer a quitina, desidratados na série alcoólica e incluídos em parafina.

Secções com espessura de $7\mu\text{m}$ foram submetidas à coloração dupla pela Hematoxilina de Harris e Eosina (HE), e montadas em Permount. As lâminas foram observadas e fotografadas com fotomicroscópio Zeiss.

Para avaliação da atividade dos corpora allata obtiveram-se as medidas do maior e menor volume de cada corpus allatum direito e esquerdo utilizando-se a fórmula:

$$V = \alpha^3 \frac{1}{6} \pi ab^2 \quad \text{onde:}$$

- V = volume da glândula (μm^3)
- α = aferição do microscópio (μm^2)
- a = maior diâmetro da glândula
- b = menor diâmetro da glândula
- π = constante

A aferição microscópica foi feita com auxílio de uma régua e os valores dos volumes convertidos em μm^3 . A variável raiz cúbica dos volumes médios dos corpora allata foi analisada através do procedimento de análise da variância para duplas classificações (LI, 1969) seguida do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (SOKAL & ROHLF, 1981).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

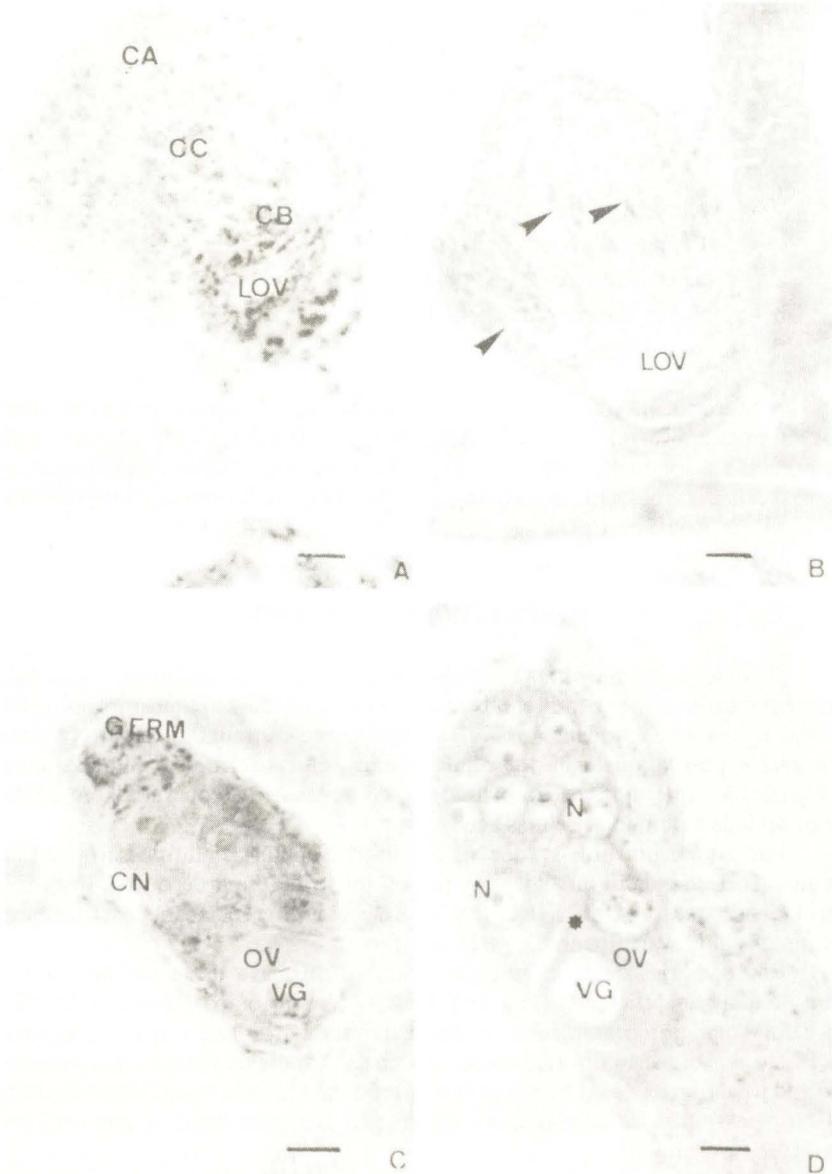
Os ovários das operárias mantidas tanto em colônias normais, como órfãs apresentaram-se sempre indiferenciados. Neste caso, eles aparecem como duas massas celulares circundadas por uma membrana peritonial externa. Na massa ovariana é possível distinguir as células basais, células centrais e células apicais. A figura 1A exibe uma secção histológica de um ovário de operária com 12 dias de orfandade exibindo as células acima.

Por esta figura nota-se que os ovários das operárias adultas são mantidas na fase correspondente ao de pré-pupa ou início de pupa de outros insetos. É nesta época que segundo KING (1970) ocorre a diferenciação dos filamentos terminais e dos ovaríolos em *D. melanogaster*.

Em operárias de *F. s. languida* apareceu um caso deste em uma abelha com 45 dias de orfandade (Fig. 1B). Observa-se aqui o aparecimento de pilhas de células nas porções apical e mediana da massa ovariana e que corresponde ao início da formação dos filamentos terminais. A individualização dos ovaríolos é obtida pela secreção da túnica própria, que é uma membrana acelular depositada entre as pilhas de células que migram para a região basal, e que está bem visível nesta figura.

Além deste, apareceram mais 3 casos de ovaríolos já diferenciados, em abelhas de 6, 12 e, 50 dias de orfandade, e que se encontram descritos em

CUNHA et al. (1986). As figuras 1C e 1D exemplificam dois casos de diferenciação dos ovariolos; um deles (Fig. 1C) apresenta uma secção de ovário de abelha com 150 dias de orfandade. O germário e o vitelário são bem desenvol-



vidos sendo que neste último a câmara nutritiva apresenta células nutritivas bem desenvolvidas, e a câmara-do-ovócito contém um ovócito com uma vesícula germinal muito grande. No segundo caso (Fig. 1D) representado por uma secção de ovário de abelha com 6 dias de orfandade, já o estágio de desenvolvimento do ovário se encontra mais adiantado, pois as células nutritivas contém núcleos grandes e nucléolos bem proeminentes, provavelmente bem ativas na produção de RNA, como acontece com o meliponíneo *Scaptotrigona postica* (CUNHA, 1985). A câmara-do-ovócito se conecta com a câmara-nutridora pelo delta alimentar e contém um ovócito grande com uma vesícula germinal bem proeminente. Nestes dois casos (Figs. 1C e 1D), as células foliculares não aparecem bem desenvolvidas, pelo menos na figura 1D esperava-se um epitélio mais desenvolvido, do tipo cúbico.

Os CA de *F. s. languida* correspondem a estruturas pares de forma arredondada ou elíptica, localizadas dorso-lateralmente em relação ao esôfago e associadas à porção distal dos corpora cardiaca (Figs. 2A, 2B). Elas são envolvidas por uma membrana acelular e internamente os limites celulares não são definidos, tendo o aspecto de um sincício. Os núcleos apresentam membrana nuclear e cromatina bem nítidos (Fig. 2C).

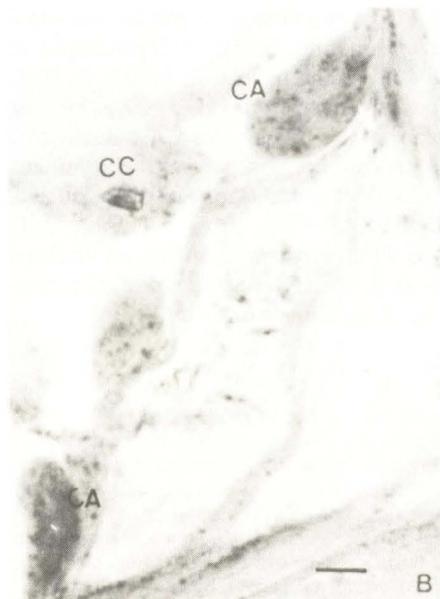
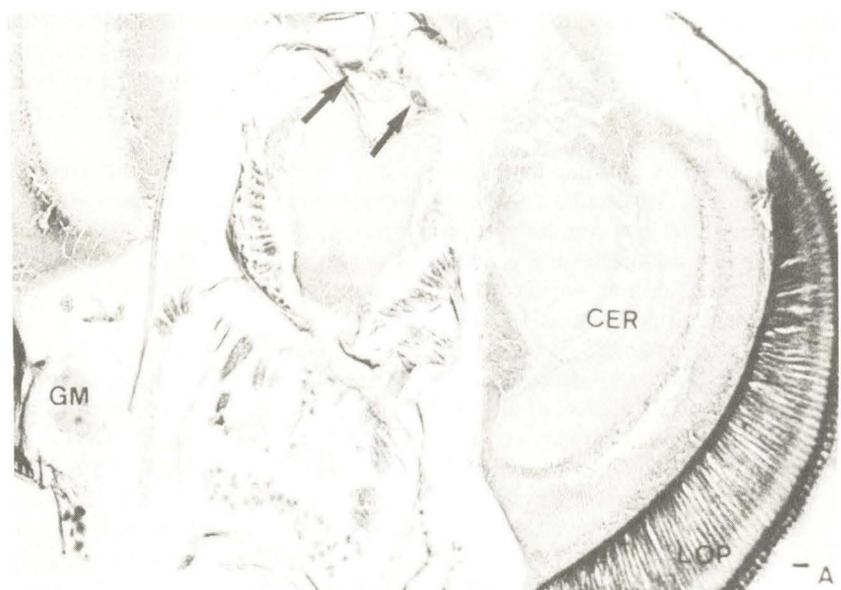
Para grande número de autores o grau de atividade dos CA pode ser estimado através da variação do volume dos mesmos e pela relação núcleo-citoplasmática. Outros como KERR et al (1975), KAHN (1983) usam somente o volume glandular para estimar esta atividade. PIMENTEL (1985) usando a variação volumétrica dos CA e suas relações núcleo-citoplasmáticas, para o meliponíneo *S. postica* verificou que as glândulas eram mais volumosas aos 15º. e 25º. dias de vida da operária adulta. Além disso, nas fases que precediam os ciclos de atividades (15 e 25 dias), os núcleos ocupavam preferencialmente a periferia da glândula, sendo o centro provavelmente ocupado pela secreção. A autora relacionou estes picos com a produção de ovos funcionais e tróficos respectivamente. A partir desta data tornaram-se evidentes sinais de degeneração da glândula, como presença de vacúolos e espaços intercelulares. BEIG & BALDISSERA (1975) já haviam demonstrado que em operárias de *Plebeia (Plebeia) droryana* havia uma correlação semelhante entre volume dos CA e desenvolvimento ovariano. No entanto, este não é um fato comum para os meliponíneos, pois em *Melipona quadrifasciata anthidioides* esta correlação não foi evidenciada (AKAHIRA et al., 1967; BEIG & BALDISSERA, 1974).

Com relação ao volume dos CA de *F. s. languida*, a análise da variância (Tabela I) mostrou que não há diferenças significativas ao nível de 0,05 entre o volume médio dos CA de abelhas jovens, de meia idade e velhas.

FIG. 1 – Secções histológicas de ovários de operárias adultas de *F. s. languida*.

A. Ovário indiferenciado contendo as seguintes células: apicais (CA), centrais (CC), basais (CB) e, o lúmen do oviduto (LOV); B. Ovário em diferenciação, com a túnica própria (setas) sendo depositada; C e D. Ovários com um ovaríolo individualizado, sendo que D se encontra num estágio de desenvolvimento mais avançado. Germário (GERM), folículo com células nutritivas (CN) e ovócito (OV) com a vesícula germinal (VG). Em D – núcleos das células nutritivas bem ativas, delta alimentar (*) e ovócito rodeado por um epitélio folicular inconspícuo (setas). Barra = 10 µm.

Como o volume dos CA independe das idades, na seqüência da análise estatística procurou-se verificar se havia diferenças quanto ao tempo de orfanidade. A Tabela II mostra que o volume médio dos CA torna-se diferenciado a partir dos 45 dias e que apesar de não ser possível estabelecer picos de produção de HJ, os CA não se mantêm homogêneo durante o tempo.



Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhas	2	18,063	9,315	1,829
Entre colunas	5	136,552	27,310	5,362 *
Resíduo	10	50,930	5,093	
Total	17	205,545		

TABELA I: Análise da variância

*significativo ao nível de 0,05

Linhas: idades (abelhas jovens, de meia idade e forrageiras)

Colunas: dias de orfandade (12, 25, 45, 70 e 150).

	C	12	25	45	70	150
C	X					
12	6	X				
25	6	4	X			
45	9*	9*	9*	X		
70	9*	5,5	5	9*	X	
150	9*	9*	9*	7,5*	9*	X

TABELA II: Escores do Teste Wilcoxon-Mann-Whitney

*Significativo ao nível de 0,05

C = controle (operárias na presença de rainha)

12, 25, 45, 70, 150 = dias de orfandade.

Como não foram vistos sinais de degeneração da glândula e nem dos ovários nesta espécie de meliponíneo concluímos que os CA são sempre ativos e produzem uma quantidade de HJ o suficiente para a diferenciação do ovócito e manutenção do folículo, mas não é o suficiente para a produção de esferas de vitelo proteico.

FIG. 2 – Secções histológicas da cabeça de operárias jovens de *F. s. languida*

A. Secção da cabeça exibindo na sua porção superior a posição dos corpora allata (setas) em relação ao cérebro (CER) e lobo óptico (LOP); B. Detalhe dos corpora allata (CA) e cardíaca (CC); C. Detalhe do corpus allatum exibindo núcleos (N) bem ativos. Barra = 10 µm.

Atentando para o ovário verifica-se que o estágio de desenvolvimento mais avançado que foi encontrado é aquele representado pela figura 1D. Neste caso as células nutritivas tem aparência de células nutritivas de outros insetos onde constataram-se aumento do volume nuclear e amplificação gênica (RIBBERT & BIER, 1967; CAVE, 1982) e casos de sub-replicação de bases redundantes (RENKAVITZ & KUNZ, 1975). Estudos comparativos da morfologia dos cromossomos e síntese de RNA mostraram que uma função importante das células nutritivas é suplementar as funções do ovócito produzindo RNA para ser armazenado no ovo (ZALOKAR, 1965; BIER et al., 1967). Para realizar esta função estas células sofrem replicação endomitótica atingindo graus elevados de ploidia (JACOB & SIRLIN, 1959). Assim, durante a vitelogenese, as células nutritivas aumentam grandemente o conteúdo de DNA disponível para transcrição de RNA. Este material flui para o ovócito via pontes intercelulares que ligam as células nutritivas entre si, e via delta alimentar que liga as células nutritivas ao ovócito.

Atentando-se para a morfologia das células nutritivas, do delta alimentar, do ovócito e da vesícula germinal verifica-se que eles se assemelham ao dos outros insetos com ovaríolos meroísticos politróficos e que são capazes de completar a vitelogenese, o crescimento e maturação do ovócito. Somente as células foliculares não se mostraram como o padrão sem contudo mostrar sinais de degeneração.

As células foliculares formam um epitélio simples que rodeia o ovócito numa espécie de câmara. Os estudos demonstram que o epitélio folicular desempenha um importante papel na vitelogenese dos insetos: ou secretando a paravitelogenina que juntamente com a vitelogenina constitui a maior parte da fração proteica acumulada nos ovócitos vitelogênicos, ou reunindo os precursores de vitelo primariamente em suas células para repassá-las ao ovócito, ou permeando a passagem dos precursores de vitelo presentes na hemolinfa. Neste último caso o epitélio pode facilitar a passagem de substâncias através de espaços intercelulares durante a vitelogenese. A permeabilidade é encerrada no final do processo pela formação de zônulas de oclusão (revisão de TELFER et al., 1982).

Provavelmente o HJ deve atuar sobre o epitélio folicular promovendo a formação dos espaços intercelulares, mas no caso das operárias de *F. s. languida* o título deste não é suficiente alto para provocar este fenômeno, mas também não é tão baixo, uma vez que o folículo se diferencia e assim se mantém por até cinco meses (que foi o tempo estudado) sem entrar em degeneração. Processos degenerativos nunca foram encontrados nem nos ovários e nem nos CA. A análise estatística também revelou que os CA não são homogêneos durante este tempo, devendo portanto serem mais ou menos ativos, produzindo suficiente HJ para a manutenção do folículo sem contudo possibilitar a entrada dos precursores das esferas de vitelo via espaços intercelulares.

REFERÊNCIAS

- AKAHIRA, Y.; D. BEIG, & W. E. KERR, 1967 – Corpora allata in Brazilian stingless bees. *J. Hokkaido Univ. Educ.*, 18:24-42.
- BEGO, L. R., 1974 – Estudos sobre regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* L. com especial referência a aspectos morfofuncionais (Hym., Apidae). Tese de Mestrado, F. F. C. L. Ribeirão Preto - SP.
- BEIG, D. & S. BALDISSERA., 1975 – Controle endócrino nos Meliponídeos. II. Atividade dos corpora allata e desenvolvimento dos ovários em *Plebeia (Plebeia) droryana* (Hym., Apidae). *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 47(2): 311-317.
- BEIG, D. & S. BALDISSERA., 1974 – Controle endócrino nos Meliponídeos. I. Atividade dos corpora allata e desenvolvimento dos ovários de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hym., Apidae) *Ciênc. e Cult.*, 26(12): 1155-1160.
- BIER, K., W. KUNG, & D. RIBBERT., 1967 – Struktur und function der oocyten-chromosomen und nukleolen sowie der extra-DNS während der oogenese panoistischer und meroistischer insekter. *Chromosoma*, 23:214-254.
- CAMPOS, L. A. O., 1977 – O papel do hormônio juvenil nas abelhas: seu papel na diferenciação das castas e nos aspectos do controle social. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina - USP, Ribeirão Preto - SP.
- GROOT, A. P. & S. VOOGD., 1954 – On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifera* L.). *Experientia*, 10(9): 384-389.
- JACOB, S. & J. L. SIRLIN., 1959 – Cell function in the ovary of *Drosophila*. I. DNA classes in nurse cell nuclei as determined by autoradiography. *Chromosoma*, 10:210-228.
- KERR, W. E.; Y. AKAHIRA & C. A. CAMARGO, 1975 – Sex determination in bees. IV. Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics*, 81:749-756.
- KHAN, M. A., 1983 – Control of corpus allatum activity in the adult colorado potato beetle. *Pudoc (Wageningen)*. The Netherlands, p. 91.
- KING, R. C., 1970 – *Ovarian development in Drosophila melanogaster*. Academic Press, NY, USA.
- LI, C. C., 1969 – *Introducción a la Estadística Experimental*. Ediciones Omega S. A., Barcelona.
- LUSCHER, M. & I. WALKER., 1963 – Zur frage der Wirkungsweise der koniginnenpheromone bei der honigbiene. *Rev. Suisse Zool.*, 70: 304-311.
- PIMENTEL, M. A. L., 1985 – Estudo do sistema neuroendócrino em abelhas *Scaptotrigona postica* L. (Hym., Apidae). Tese de Mestrado, UNESP - Rio Claro - SP.
- RENKAWITZ, R. & W. KUNG., 1975 – Independent replication of the ribosomal RNA genes in the polytrophic-meroistic ovaries of *Calliphora erythrocephala*, *Drosophila hydei* and *Sarcophaga barbata*. *Chromosoma*, 53:131-50.

- RIBBERT, D. & K. BIER., 1969 – Multiple nucleoli and enhanced nucleolar activity in the nurse cells of insect ovary. **Chromosoma**, 27:178-197.
- SAKAGAMI, S. F.; D. BEIG., R. ZUCCHI & Y. AKAHIRA., 1963 – Occurrence of ovary – developed workers in queenright colonies of stingless bee. **Revta bras. Biol.**, 45(3): 165-182.
- SOKAL, R. R. & F. J. ROHLF., 1981 – **Biometry**. W. H. Freeman Co., San Francisco.
- TELFER, W. H.; E. HUEBNER & D. S. SMITH, 1982 – The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius*. In King, R. C. & Akai, H. (Eds.). **Insect Ultrastructure**, Plenum Press, NY, vol. I, cap. 5, p. 118-149.
- VELTHUIS, H. H. W., 1972 – Observations on the transmission of queen substances in the honey bee colony by the attendants of the queen. **Behaviour**, 41:2-22.
- VELTHUIS, H. H. W., 1967 – On abdominal pheromones in the queen of the honey bees. Proc. 21st Int. Beek. Cong. (College Park, Maryland) p. 472.
- VELTHUIS, H. H. W. & J. van ES, 1964 – Some functional aspects of the mandibular glands of the queen honeybee. **J. Apic. Res.**, 3:11-16.
- ZALOKAR, M., 1960 – Sites of ribonucleic acid and protein synthesis in *Drosophila*. **Exp. Cell. Res.**, 19:184-196.
- WILSON, E. O., 1971 – **The insects societies**. Belknap Press, Cambridge, MA.