

NUMERO DE CELULAS NOS CISTOS OVARIANOS DE SCAPTOTRIGONA POSTICA LATR. (HYMENOPTERA, APIDAE)¹

Marina A. Staurengo Da Cunha*

SUMARIO

Rainhas de *Scaptotrigona postica* apresentam 64 cistócitos, de acordo com a regra $N = 2^n$. As operárias apresentam desvios desta regra, sendo $N = 36, 43, 49, 53, 55, 59$ e 63 células, evidenciando uma assincronia na sexta

divisão mitótica que precede a meiose e diferenciação. Somente cistos com 63 células formarão ovócitos maduros.

SUMMARY

Queens of the stingless bees *Scaptotrigona postica* present B (number of cystocytes) = 64, according the rule $N = 2^n$. The workers present an exception to the 2^n rule, with $N = 36, 43, 49, 53, 55, 59$ e 63 cells, which shows a

loss of synchrony at the sixth mitotic division that precede meiosis and differentiation. Only cysts with 63 cells will form mature eggs.

INTRODUCAO

Rainhas e operárias de *Scaptotrigona postica* apresentam ovários do tipo meroístico politrófico.

Na rainha os 4 ovariólos de cada ovario são filamentos longos com folículos em estágios progressivos de maturação e cada ovariolo individualmente é capaz de produzir muitos ovos. A operária também apresenta ovariólos funcionais, mas estes contém apenas um ou dois folículos em desenvolvimento. Dos oito ovócitos potenciais, apenas um ou dois completam o desenvolvimento transformando-se em ovócitos maduros (Staurengo da Cunha, 1977).

O ovócito juntamente com as células nutritivas formam no germário um complexo estrutural e funcional denominado cisto. A maneira de formação do cisto foi descrita para diversos insetos (Telfer, 1975) e em particular para *Drosophila melanogaster* (King, 1970) mostrando que o ovócito e as células nutritivas descendem de uma única célula germinativa chamada cistoblasto (Brown & King, 1964). Este sofre mitoses e diferenciação, e origina um certo número de cistócitos que permanecem agrupados e unidos num sincício por pontes citoplasmáticas, em virtude da ocorrência de mitoses com citocineses incompletas (King & Mills, 1962).

O resultado das divisões mitóticas do cistoblasto é um cisto com 2^n células, com o valor de n sendo o número de vezes que um cistoblasto se divide, e que é constante para cada espécie. Portanto as divisões mitóticas são sincrônicas e após a cisto completar um certo número de divisões ocorre diferenciação.

Desvios desta regra tem sido relatados, inclusive para *Apis*, onde Engels (1968) encontrou o número 48, mas não encontrou mais do que 5 pontes intercelulares, corresponde a $N = 2^5 = 32$. O autor aceita a hipótese segundo a qual a metade das células sofrem uma nova divisão.

Assim, o objetivo deste trabalho é determinar o número de células por folículo e portanto o número de mitoses sofridas pelo cistoblasto antes da diferenciação, afim de detectar possíveis anomalias no decorrer da ovogênese e explicar a maturação de apenas 1 ou 2 ovócitos. Trabalhos complementares sobre ultraestrutura do germário estão sendo efetuados afim de comparar o ovogênese deste inseto com a de outros bem estudados.

MATERIAL E METODOS

Operárias adultas de *Scaptotrigona postica* foram dissecadas em solução de Ringer para insetos. Os ovários foram retirados e classificados em 6 estágios de desenvolvimento: a) estágio 0 - ovário não desenvolvido, ovariólos sem sinal de constrições transversais; b) estágio I - ovariólos bem individualizados, início da individualização do vitelário por constrições transversais, câmara-ovocítica em esbôco. O ovócito é distinguível na porção terminal do folículo; c) estágio II - ovariólos divididos em zonas (germário e vitelário) pelas constrições - transversais, início da deposição do vitelo; d) estágio III - ovariólos com zonas e câmaras bem distintas grande quantidade de vitelo no ovócito; e) estágio IV - ovariolo bem desenvolvido com o folículo assumindo a forma e aparência de ovos; f) estágio V - ovário em degeneração, exibindo corpos lúteos em algumas áreas. Inclui folículos abortivos de todos os estágios, sem estrutura definida; dissolução dos limites do epitélio folicular-ovócito, e vitelo disperso por todo o folículo.

Os ovários assim classificados foram submetidos a uma variedade de técnicas, sendo a que produziu os melhores resultados foi a desenvolvida por Nokkala (Nokkala & Puro, 1976; Puro & Nokkala, 1977) para tecidos submetidos à esmagamento e que foi por nós modificada. Os ovários são pré-tratados com KCl 0.075 M, que além de dilatar os núcleos celulares, torna o ovário maleável, sendo possível sua manipulação sem haver quebras.

Os detalhes do procedimento consistem em: dissecar os ovários em solução fisiológica de Ringer; pré fixar numa solução aquosa de KCl 0.075M por 6 a 12 minutos e em seguida fixar em Carnoy 6:3:1. Lavar em álcool 50%, 30% e água destilada, durante 30 min., 5 min. e 1 min. Passar para HCl 1N a temperatura ambiente durante 30 min., e em seguida hidrolisar a 60°C por 8 min. Corar com reativo de Schiff por 5 a 7 min. (a concentração ótima foi obtida por Nokkala usando 1g de fucsina básica, 15 ml de HCl 1 N e 1,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ para 200 ml da solução corante). Lavar em água destilada por 5 min. e transferir para uma lâmina, colocar uma gota de ácido acético 45% e com auxílio de duas agulhas finas remover tecidos extras, separar as células e contar. Secar, diafanizar rapidamente e montar em bálsamo.

Para fins de comparação, ovários de rainhas de *Scaptotrigona postica* também foram preparados segundo este mesmo método.

Ovários pertencentes a todos estes estágios também foram fixados em formol-cálcio de Baker e processados segundo a técnica histológica rotineira e corados com hematoxilina Delafield-eosina.

1. Pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 300, 841 - 80) e pela FINEP (Proc. B74-80-74).

2. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências - UNESP, Caixa Postal 178, 13.500 Ríó Claro - SP, Brasil.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o procedimento utilizado para evidenciar as células foi o tratamento dos ovários totais, pela reação de Feulgen (Figs 1a 4) o número de células foi obtido indiretamente pela contagem do número de núcleos presentes nas câmaras-nutritivas, e acrescidos de 1 correspondente ao ovócito (Figs. 3 e 4) quando observados sob microscópio estereoscópico.

As operárias de *S. postica* possuem 2 ovários com 4 ovariólos cada. Como o desenvolvimento é assíncrono e apenas dois ovócitos de cada ovário, completam o desenvolvimento, teremos nos dois ovários, 8 ovariólos contendo 8 folículos em diferentes estágios de maturação (Fig. 1 e 2). Então, podemos contar o número de células: somente no folículo de maior desenvolvimento presente num mesmo ovário, e/ou nos folículos dos 8 ovariólos dos dois ovários.

Ao efetuarmos a contagem do número de núcleos somente no folículo de maior desenvolvimento presente num ovário, encontramos sempre o número 63.

Ao contarmos o número de núcleos nos 8 folículos dos dois ovários, verificamos que: sempre o folículo mais desenvolvido, sem considerar o estágio apresentou o maior número de células; e este número sempre foi 63, e os outros folículos continham sempre um número inferior. Por exemplo, no folículo mais adiantado encontramos 63 células, nos sete restantes foram encontrados valores inferiores. Estes valores variaram entre 36 e 63 e se encontram registrados na tabela 1.

Tabela 1 - Número de células presentes nos folículos ovarianos de *S. postica* em diferentes estágios

O	I	II	IIIa	IIIb	IV
—	—	36	36 (2)	36 (4)	—
—	43 (2)	43	43 (2)	43 (2)	43 (2)
49 (3)	49 (3)	49	49 (3)	49 (5)	49 (2)
—	—	53 (2)	53 (2)	53 (3)	—
—	—	—	—	55 (3)	55 (2)
—	59	59 (2)	59 (2)	59 (5)	—
—	63	63 (3)	63 (5)	63 (4)	—

Onde () = número de folículos contados

O maior valor de N foi 63, e apareceu nos estágios II, IIIa e IIIb. Este número resulta de pelo menos 6 divisões mitóticas dos cistócitos, antes da diferenciação do ovócito, das quais cinco são sincrônicas.

Ainda há necessidade de fazermos as seguintes considerações: foram efetuadas poucas contagens de núcleos nos folículos dos estágios O e I. Muitas contagens foram iniciadas mas não puderam ser levadas a término devido ao tamanho reduzido da câmara nutritiva e dos núcleos. Estes se coravam fracamente e muitas vezes se confundiam com os núcleos das bainhas envolventes, difíceis de serem isoladas nestes estágios. Embora o estágio IV continha ovos prontos ou quase prontos, na maioria das vezes não foi possível contar o número de núcleos pois estes já continham aspecto de degeneração, se apresen-

tando como massas picnóticas, mas em alguns casos pudemos contar os valores encontrados na tabela 1.

A ovogênese neste inseto é um processo bastante lento, produzindo um ovócito funcional entre 10º e 15º dia de idade da operária, ou um ovócito nutritivo entre o 10º e 30º dia (Staurengo da Cunha, 1976). O ovariolo com o ovócito em desenvolvimento, passa por doze estágios de desenvolvimento durante o processo da ovogênese; cinco destes ocorrem no germário, compreendendo: ovogônia, cistoblasto, cistócito G₁, cistócito G₂, cistócito G₃; e sete estágios ocorrem no vitelário e compreendem: O, I, II, IIIa, IIIb, IV e V da vitelogênese (Staurengo da Cunha, 1980).

A primeira fase da ovogênese chamada pré-meiose, ocorre na porção apical da região G₁ do germário. As células nutritivas e o ovócito ainda não estão diferenciados.

As ovogônias primitivas originam, por mitoses de citocineses completas duas células, uma que se comporta como ovogônia, crescendo para se dividir novamente, e outra que passa a ser denominada cistoblasto. O cistoblasto por mitoses, de citocineses incompletas dá origem a cistos com grupos de células (os cistócitos) cada vez menores, e que se localizam na porção anterior da região G₁ do germário.

Koch & King (1966) encontraram nesta região em *Drosophila melanogaster*, duas células isoladas, três grupamentos de duas células, dois grupamentos de quatro células, um grupamento de oito células e um grupo de dezesseis células. Como nas operárias de *S. postica* o número de ovos formados no vitelário é bem menor que o de outros insetos, somente um grupamento, com um número definido de células é visível nesta região (Staurengo da Cunha, 1977 e 1980).

Como os cistócitos se originam do cistoblasto por uma série de mitoses, constante para a espécie, e sincrônicas dentro do cisto, na maioria dos insetos estudados, os valores de N (número de cistócitos) observados seguem a regra 2ⁿ. Assim, o número final de cistócitos por cisto é: 2 células em *Labidura riparia* (Zinmeister, 1973); 8 células em *Hyalophora cecropia* (King & Aggarwal, 1965), em *Anopheles gambiae* (Fiil, 1976), em *Ephesia kuhniella* (Guellin, 1975) e em *Bombyx mori* (King & Akai 1971), 16 células em *Drosophila melanogaster* (Kock & King, 1966) em *Nasonia vitripennis* (King & Richards, 1969) e 32 células em *Habrobacon juglandis* (King & Cassidy, 1973) evidenciando que o cistoblasto sofreu 1, 3, 4 e 5 mitoses respectivamente para originar o cisto.

Nas operárias de *S. postica*, encontramos cistos com diferentes números de células (36, 43, 49, 53, 55 e 63) como pode ser observado na tabela 1. O número encontrado em rainhas desta mesma espécie é sempre 64, mostrando que ocorrem 6 mitoses durante a formação do cisto, sendo o número N = 2ⁿ conforme o esperado. Na operária, esta condição não se verifica, mas ainda ocorrem 6 divisões, uma vez que o número esperado para 5 divisões (32) foi ultrapassado pelo menor número encontrado (36). Isso indica que todos os cistócitos passaram pela quinta divisão mitótica, mas nem todos entraram na sexta. Verificou-se portanto, uma assincronia na sexta divisão, ou seja, na última que precede a diferenciação entre células nutritivas e ovócito.

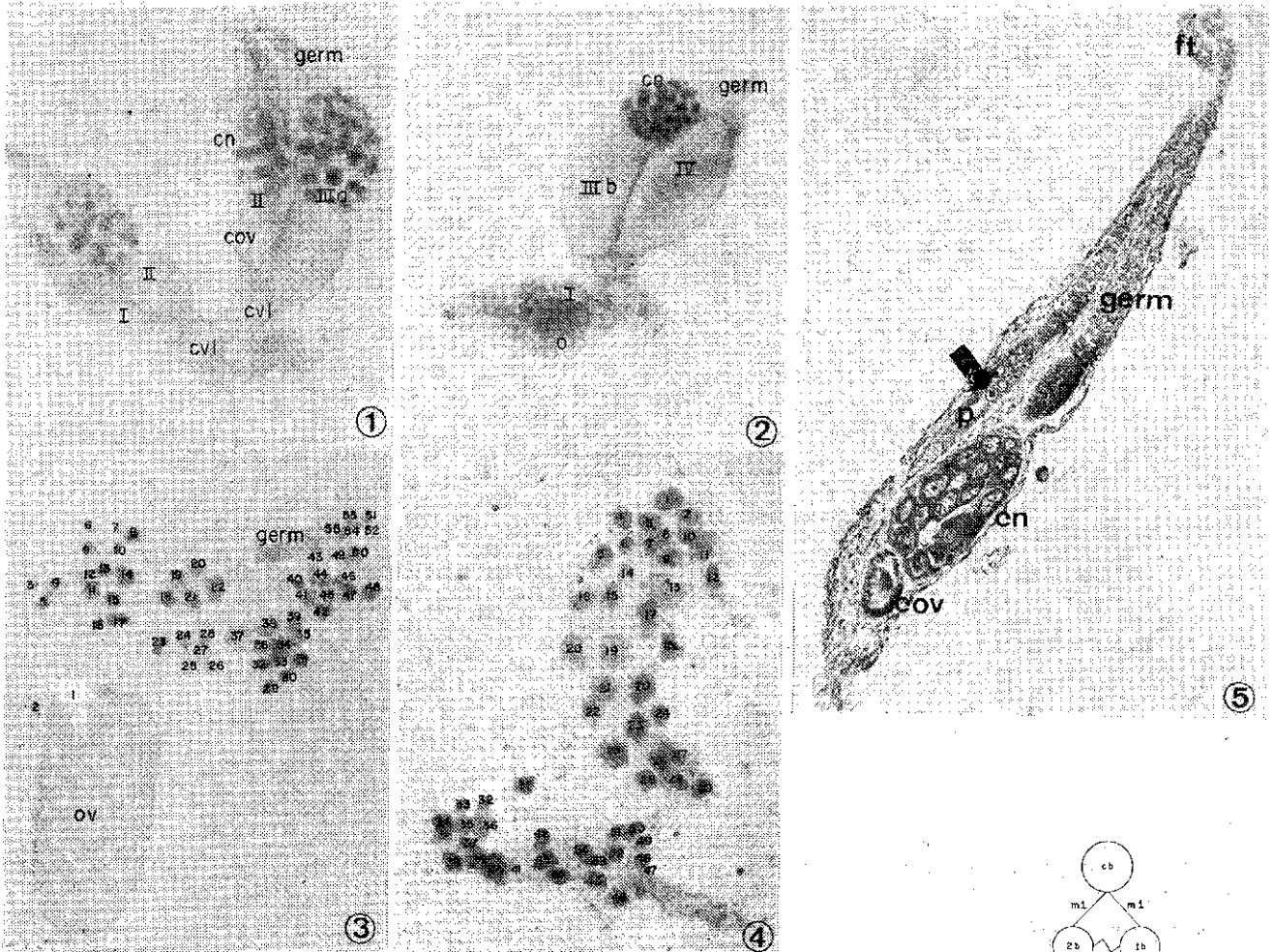
Nas rainhas onde o número de cistócitos é igual a 64 se encontram 63 células nutritivas na câmara-nutritiva do vitelário. As operárias de *S. postica* apresentam apenas 62 células nutritivas e não 63, que é o número esperado. Se o ovócito é determinado pelo número de pontes citoplasmáticas e ele ligado (Koch et al., 1967) haverá duas células que potencialmente poderão ser o ovócito dentro do cisto como pode ser visto pelo esquema da figura 6. Poderíamos pensar que uma de las degenera. Apesar de ter sido observada a degeneração celular no germário, (Staurengo da Cunha, 1980), isto ocorreu esporadicamente e sua distribuição não poderia justificar esta afirmativa. Neste caso, é mais fácil pensar que um dos ovócitos potenciais (pró-ovócito) provavelmente não sofre a sexta di-

visão mitótica ou seja, que no caso da operária, na sexta mitose, sempre pelo menos uma célula do cisto não se dividirá.

E provável que aqui ocorra o mesmo fenômeno que Rousset (1978 a, b) descreveu para *Chrysopa perla*. Duas células após a quinta divisão mitótica indicam a prófase meiótica, mas somente uma ultrapassa o estado paquíteno e início do zigoteno, enquanto a outra juntamente com as células originárias das seis mitoses definitivas se diferenciam em células nutritivas.

Em cortes histológicos verificamos repetidamente a presença de uma célula nutritiva maior do que as demais, e sempre colocada sobre o ovócitos. E provável que esta célula diferente (Fig. 5), seja o segundo pró-ovócito que não sofreu a sexta divisão mitótica.

No esquema da filiação dos cystócitos em operárias de *S. postica* (Fig. 6) caracterizamos esse condição, sendo o número de cystócitos $N = 63$ células, onde 62 células são nutritivas e uma é o ovócito (1 g) porque um dos pró-ovócitos não sofreu a sexta divisão. Destas células nu-



FIGS. 1 e 2 - Preparações totais de ovários de operárias de *S. postica* em diferentes estágios do desenvolvimento, antes de se separar as células e se proceder a contagem. Nota-se sempre um ovaríolo mais desenvolvido em cada ovário (seta). Germário (germ), câmara nutritiva (cn), câmara do ovócito (cov) e oviduto lateral (ovl).

FIG 3 - Ovócito (1) e núcleos de células nutritivas (2 a 55) após a separação e contagem, perfazendo um total de 55 células. Germário (germ) e ovócito (ov).

FIG. 4 - 54 núcleos das células nutritivas de uma câmara nutritiva.

FIG. 5 - Secção histológica do ovário exibindo dois ovaríolos, com as diferentes regiões: filamento terminal (ft); germário (germ); câmara nutritiva (cn); câmara de ovócito (cov) e pedicelo (p). A seta aponta no ovaríolo de menor desenvolvimento, uma célula diferente das demais.

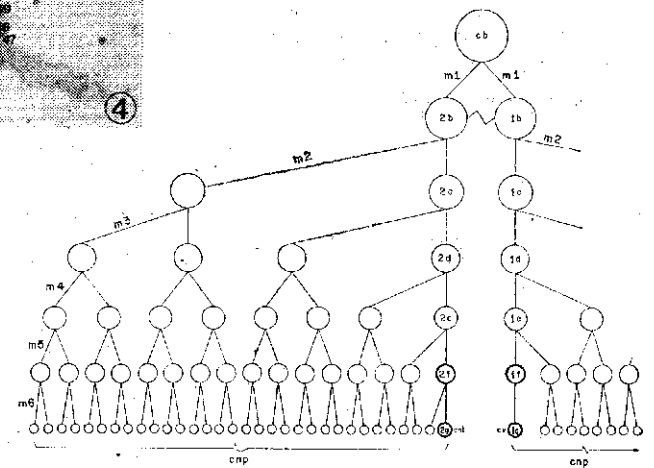


FIG. 6 - Esquema de sequência de mitoses no cisto da operária de *S. postica*. Cistoblasto (cb), mitose (m), ovócito (ov), célula nutritiva precoce (cnp), célula nutritiva tardia (cnt).

tritivas, 61 são denominadas células nutritivas precoces e uma é denominada célula nutritiva tardia (2 g). Esta seria célula que iniciou o programa meiótico, mas retornou o caminho seguido pelas demais células nutritivas.

É interessante frisar que a assincronia é tanto maior nos cistos quanto menor probabilidade de que estes alcancem a maturidade. Como já ficou dito, nos dois ovários, apenas um ou dois ovos se formarão. Somente os cistos que dão origem a estes ovos alcançam 63 células. Nos cisto restantes ocorrem os números anômalos diferentes de 63.

A literatura traz alguns relatos de desvios da regra 2ª para o número de cystócitos e possíveis explicações. São os casos de: *Chrysopa perla* (Rousset, 1978a) com 12 a 14 cystócitos, de *Apis* (Engels, 1968) com 48 células, e do mutante *fes* de *Drosophila melanogaster* (Johnson & King, 1972) com 3, 5, 6, 7, 9 e 11 cystócitos. Nenhuma das explicações dadas por estes autores aplica-se ao caso de *S. postica* uma vez que não efetuamos cortes em série para microscopia eletrônica e nem a coloração utilizada para microscopia óptica serviu para tornar visível as delicadas pontes intercelulares. No presente trabalho, portanto, a única tentativa de explicação para os números anômalos de N, é a dada para o número 63. Não parece que se possa aplicar aqui, para os outros números, nem a semelhança com a mutação - *fes* que causa citocineses completas (Johnson & King, 1972), nem a do número diferencial de mitoses para células diferentemente colocadas no cisto (Rousset, 1978a) sem maiores estudos. Naturalmente a sincronia da divisão é promovida por alguma substância desencadeadora do fenômeno, e que tem livre trânsito pelos cystócitos dada a existência das pontes intercelulares. Pode-se pensar que as células colocadas na periferia do cisto sejam menos acessíveis, mas então porque 1 ou 2 cistos do mesmo ovário alcançam 63 células? A produção da substância reguladora se acha diminuída em cistos que não alcançarão a maturidade?

As operárias de *S. postica* possuem 8 ovaríolos, e ocorre início de desenvolvimento do ovócito em todos; mas somente um ovócito alcança a maturidade, e foi verificado que somente neste último caso, o folículo contém 63 células; e os sete folículos restantes contêm os números anômalos de células. É possível que, logo que o primeiro folículo alcança o número definitivo de células, seja liberado um estímulo que provoque a parada do desenvolvimento dos outros cistos que permanecem estacionários.

Agradecimientos

Sou grata á Dra. Carminda da Cruz Landim pela orientação segura em muitos aspectos deste trabalho, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa de Pesquisador a mim concedida.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BROWN, E.H. & R.C. KING, 1964. Studies on the events resulting in the formation of an egg chamber in *Drosophila melanogaster*. *Growth*, 28:41 - 81.
- ENGELS, W., 1968. Extraocytäre Komponenten des Eiwachstums bei *Apis mellifica*. I. Trophicytäre RNS - Zufubr. *Insectes Soc.*, 15:271 - 268.
- FIIL, A., 1976. Oogenesis in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Tiss. Res.*, 167:23 - 35.
- GUELIN, M., 1975. Différenciation de l'ovocyte et des trophocytes; au cours de la méiose de l'ovaire d'*Ephesia kuhniella*, Z. (Lépidoptères). *C.R. Acad. Sci. Paris D.*: 280:1091-1094.
- JOHNSON, J.H. & R.C. KING, 1972. Studies of *fes*, a mutation affecting cystocyte cytokinesis, in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Bull.*, 143:525-547.
- KING, P.E. & J.G. RICHARDS, 1969. Oogenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Proc. R. ent. Soc. Lond.* (4), 44(10-12): 143-157.
- KING, R.C., 1970. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, N. York and London, 227 pp.
- KING, R.C., 1975. The cell cycle and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Results and Problems in cell differentiation*, 7:85 - 121.
- KING, R.C. & S.K. AGGARWAL, 1965. Oogenesis in *Hyalophora cecropia*. *Growth*, 29:17 - 83.
- KING, R.C. & H. AKAI, 1971. Spermatogenesis in *Bombix mori*. I. The Canal system joining sister spermatocytes. *J. Morphol.*, 134: 47 - 55.
- KING, R.C. & J.D. CASSIDY, 1973. Ovarian development in *Habrobacon juglandis* (Ashmead) (Hym., Braconidae). II. Observations on growth and differentiation of component cells of egg chamber and their bearing upon interpretation of radio-sensitivity data from *Habrobacon* and *Drosophila*. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 2(2):117 - 136.
- KING R.C. & R.P. MILLS, 1962. Oogenesis in adult *Drosophila*. XI. Studies of some organelles of the nutrient stream in egg chambers of *D. melanogaster* and *D. willestoni*. *Growth*, 26: 235 - 253.
- KOCH, E.A. & R.C. KING, 1966. The origin and differentiation of the egg chambers of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.*, 119: 283 - 304.
- KOCH, E.A.; P.A. SMITH & R.C. KING, 1967. The division and differentiation of *Drosophila* cystocytes. *J. Morphol.*, 124:143 - 166.
- NOKKALE, S. & J. PURO, 1976. Cytological evidence for a chromocenter in *Drosophila melanogaster* oocyte. *Hereditas*, 83:265-268.
- PURO, J. & S. NOKKALA, 1977. Meiotic segregation of chromosomes in *Drosophila melanogaster* oocytes - A cytological approach. *Chromosoma*, 63:273 - 286.
- ROUSSET, A., 1978a. La formation des cystes dans l'ovariole de *Chrysopa perla* (L.) (Neuroptera: Chrysopidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 7(1) : 45 - 57.
- ROUSSET, A., 1978b. La différenciation des cellules germinales dans l'ovariole de *Chrysopa perla* (L.) (Neuroptera: Chrysopidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 7(1) : 59 - 71.
- STAURENGO DA CUNHA, M.A., 1976. Aspectos morfológicos do desenvolvimento ovariano de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hym., Apidae). Tese de Mestrado - USP, 147pp.
- STAURENGO DA CUNHA, M.A., 1977. Ovarian development in *Scaptotrigona postica* Latr. (Hym., Apidae). I Morphological study. *Dusenía*, 10(4):205 - 215.
- STAURENGO DA CUNHA, M.A., 1980. Dinâmica da ovogênese em operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 185 pp.
- TELFER, W.H., 1975. Development and physiology of the oocyte nurse cell syncytium. *Adv. Insect Physiol.*, 11:223 - 319.
- ZINSMEISTER, P.P., 1973. RNA and protein synthesis in the earwing ovary. *J. Insect Physiol.*, 19:1765 - 1770.