

Papéis Avulsos de Zoologia

VARIAÇÕES DE CONTEÚDO DE DNA E VOLUME NUCLEARES
NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE OPERÁRIAS DE *MELIPONA*
QUADRIFASCIATA ANTHIDIODES LEP.
DURANTE A DIFERENCIAÇÃO PÓS-EMBRIONÁRIA
E CICLO SECRETOR¹

REGINA LÚCIA MORELLI SILVA DE MORAES²

ABSTRACT

The salivary glands of Melipona quadrifasciata anthidioides Lep. are formed by the thorax and head glands, each of them comprising secretory and duct zones.

The nuclei of the cells in both zones stained by the Feulgen Rossembeck's technique, were studied karyometrical and cytophotometrically during different pupae and adults stages of workers.

The duct region showed absence of polyploid nuclei in all the phases. Frequent mitotic figures from the beginning to the middle of pupation were also observed.

Regions in the head and thorax which will become secretory are originated from the remanent ducts of the larval salivary glands and present from the beginning of their development larger and more stained nuclei than those of the ducts, reflecting increase of the DNA content. In all the phases the higher levels of polyploidy and nuclear volumes were attained by the nuclei of the secretory thoracic cells. In this region the average nuclear volume increased at the beginning of adult life. This increase accompanied in larger proportion the increase in the average DNA content. In the thoracic secretory regions was detected a decrease in the average nuclear volume at the end of the adult life without being accompanied by a parallel decrease in the average DNA contents.

(1) Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. Biol. 71/452). Extraído da Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP.

(2) Departamento de Biologia. Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro. UNESP, 13.500 — Rio Claro — SP — Brasil.

In the secretory cells of the head the average nuclear volume remained constant in all the phases studied independently of the increase in the average DNA content at the end of pupation.

It was showed an ample variability of DNA contents and nuclear volume among consecutive euploid types in all the regions in the different phases studied.

INTRODUÇÃO

As alterações ocorridas nos núcleos em situações como diferenciação embrionária e funcional refletem-se entre outras, em variações no conteúdo de DNA e no tamanho dos núcleos.

Embora há aproximadamente 3 décadas passadas, Boivin e colaboradores tenham estabelecido a hipótese da constância do DNA sabe-se hoje que variações ocorrem, podendo ser induzidas sob várias condições capazes de produzir mudanças funcionais nas células (Pisi & Cavalli, 1955; Leeman, 1959; Durrant, 1962; Viola-Magni, 1965; Cleffman, 1968; Evans, 1968; Cullis, 1973) ou estarem relacionadas ao fenômeno de diferenciação (Yokomura, 1962; Nováková *et al.*, 1970; Brunori, 1971).

As variações de conteúdo de DNA, relacionadas a processos de multiplicação celular não constituem, por sua vez, exceções a hipótese da constância bem como os fenômenos da poliploidia e politenia. As exceções aparecem quando os ciclos de replicação não levam a aumentos geométricos do conteúdo de DNA, como já demonstrado em numerosas pesquisas (Govaert, 1965; Stick, 1962; Makerchaudani & Naylor, 1971; Silva de Moraes, 1972). O fenômeno poderia ser explicado tanto pela repressão total ou parcial do DNA, envolvendo cromossomas ou regiões cromossômicas (Rudkin, 1965; Sawaia & Alves, 1969; Lorick, 1970) como pela ocorrência de um DNA que não constitui parte integrante de genoma celular, o DNA metabólico (Breuer & Pavan, 1955; Rudkin & Corlette, 1957; Swift, 1962; Gabruszewycz-Garcia, 1964).

Desde há muito tempo estão sendo também pesquisadas as variações do volume nuclear e, em alguns tipos celulares foi estabelecida uma correlação direta entre volume e conteúdo de DNA dos núcleos. Entretanto tal correlação é refutada por muitos autores, baseados em análises experimentais realizadas tanto em células somáticas como em células germinativas (Schrader & Leuchtenberger, 1950; Leuchtenberger & Schrader, 1951; Alfert & Bern, 1951; Schreider *et al.*, 1966). Estes autores apoiam o conceito de interfase heterosintética, estabelecido por Bloch (1958), onde as variações no volume dos núcleos são mais dependentes de seu conteúdo em proteínas não histônicas do que da duplicação do DNA. Como demonstrado em alguns experimentos, as proteínas não histônicas funcionam como derrepessores da atividade gênica, a qual estaria reprimida pela associação entre proteínas histônicas e DNA (Market, 1954; Busch *et al.*, 1954; Frenster, 1965; Lallier, 1966). Baseado neste fato é esperado um hipermegetismo nas células com função secretora (Schreiber *et al.*, 1967).

Visto que os dados encontrados na literatura confirmam na maioria deles variações do conteúdo de DNA durante a diferenciação e atividade funcional das células, bem como aumento no volume nuclear

independente do aumento no conteúdo de DNA durante a atividade celular e, baseado no fato de que as variações na quantidade de DNA podem ou não ser acompanhadas por variações de volume, achamos de interesse a determinação dos valores de ambas as variáveis celulares nos núcleos das células das glândulas salivares do adulto de *Melipona*, a partir de uma fase correspondente à embrionária e durante o ciclo secretor.

As glândulas salivares de *Melipona* originam-se de remanescentes das glândulas de seda ou salivares larvais (Cruz-Landim & Mello, 1967) e durante a vida do adulto, tal como em todas as abelhas sociais, são representadas por estruturas pares situadas na cabeça e no tórax, denominadas respectivamente glândulas salivares da cabeça ou post-cerebrais e glândulas salivares torácicas. A porção salivar torácica, inicia sua formação na fase pré-pupal como referido anteriormente, adquirindo as extremidades distais dos dutos larvais um aspecto bastante irregular, sugerindo a projeção de algumas células. A medida que as pupas progridem em seu desenvolvimento ocorre a formação de agrupamentos celulares, distinguindo-se os dutos coletores. Nas pupas de olho marrom os túbulos secretores estão completamente formados e se assemelham muito àqueles encontrados nos adultos.

As glândulas salivares da cabeça, de acordo com as autoras, iniciam sua diferenciação em fase mais tardia da pupação em relação à porção torácica. Na pupa de olho branco forma-se a bolsa salivar, resultante de expansões dos dutos na região onde tais estruturas, provenientes do tórax, se fundem formando um duto único. Somente na pupa de olho vermelho é que as massas celulares se distanciam dos dutos excretores, colocando em evidência os canais coletores que conectam as massas celulares aos dutos excretores. Na pupa de olho marrom as células secretoras se distinguem perfeitamente daquelas dos dutos e na pupa pigmentada distingue-se um lúmen, formando os alvéolos glandulares. No fim da pupação, tanto as glândulas salivares da cabeça como as torácicas se acham completamente formadas, mas seus alvéolos e túbulos somente alcançam o tamanho máximo por volta dos 15 dias da vida do adulto, sendo que nos adultos recém emergidos os alvéolos são pequenos e praticamente sem luz.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

O estudo realizado restringiu-se aos núcleos das células das glândulas salivares presentes nas pré-pupas, pupas e adultos de operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.

Cada um desses estágios foi dividido em fases de acordo com o que se segue.

- 1) pré-pupa b (PPb)
- 2) Pupas
 - 2.1.) pupa de olho branco (POB)
 - 2.2.) pupa de olho vermelho (POV)
 - 2.3.) pupa de olho marrom (POM)
 - 2.4.) pupa de olho preto (POP)
 - 2.5.) pupa pigmentada (P. PIG)

3) Adultos

- 3.1.) operária jovem (Op. J.)
- 3.2.) operária de meia idade (Op. M.)
- 3.3.) operária velha (Op. V.)

A separação de pré-pupas baseou-se em caracteres morfológicos externos e na posição do indivíduo dentro do alvéolo. As pré-pupas menores e mais esbranquiçadas que as larvas, apresentam-se em posição vertical dentro do alvéolo, notando-se nesta fase, apesar de o indivíduo estar envolvido pela pele larval, que a cabeça já se diferencia nitidamente do resto do corpo, o que não ocorre na fase larval.

As pupas foram diferenciadas entre si baseando-se na quantidade de pigmentos que estão sendo sintetizados. As mais jovens apresentam-se totalmente desprovidas de pigmentação, sendo branco-leitosas e distinguem-se das pré-pupas por apresentarem a forma definitiva do adulto e terem abandonado a última acdise larval.

Como o início da pigmentação é notada em primeiro lugar nos olhos das pupas, estas foram designadas pela coloração dessas estruturas. A medida que progride o desenvolvimento pupal a quantidade de pigmentos aumenta, intensificando a coloração dos olhos. Somente no final do estágio pupal é que a pigmentação se distribui pelo corpo, recebendo a pupa a denominação de pupa pigmentada.

Na vida adulta nota-se que as operárias jovens apresentam pelos distribuídos pelo tórax em maior quantidade e mais claros e à medida que as operárias envelhecem os pelos tornam-se mais escuros e escassos. Com o envelhecimento aumenta também a intensidade de coloração das listras abdominais de cores amarela e preta. Além de tais caracteres, considerou-se para a separação dos adultos a atividade desempenhada por eles dentro da colméia, desde que esta se modifica com a idade. As operárias jovens podem ser coletadas na região de cria, as de meia idade na região dos potes de mel e as velhas voando fora da colônia.

Em todas as fases foram estudadas, tanto nas glândulas salivares da cabeça como nas torácicas, as regiões de duto escretor e secretor, excetuando-se as pré-pupas b, onde a glândula salivar da cabeça não se encontra diferenciada e as pupas de olho branco cuja glândula salivar na cabeça é representada somente pelos dutos e pela bolsa salivar.

Cada uma das fases foi representada por 3 indivíduos coletados no Apiário do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências *campus* de Rio Claro, sendo estudados em cada indivíduo 25 núcleos por região da glândula.

MÉTODOS

1. Técnica de preparação de lâminas para os estudos citofotométricos. Imediatamente após a coleta as pré-pupas foram colocadas no fixador em uso, enquanto a cabeça e tórax de todas as pupas e operárias jovens, antes de se proceder a fixação, foram separadas do abdomen e também entre si, permitindo que toda a técnica subsequente fosse aplicada somente à cabeça e ao tórax isolados em cada um dos indivíduos estudados.

Para as operárias de meia idade e operárias velhas, devido a presença de cutícula muito esclerotizada foi necessária a dissecação das glândulas em solução fisiológica.

Todo o material foi fixado em uma mistura de Carnoy, preparada com álcool absoluto (3 partes) e ácido acético (1 parte) e, posteriormente, transferido para dioxana a qual age como desidratante e amolecedor de cutícula, excetuando-se as glândulas dissecadas que foram desidratadas com o uso de uma bateria crescente de álcool.

Para a obtenção de lâminas permanentes seguiu-se o método usual de inclusão em parafina. Os cortes obtidos, com 7 μm de espessura, foram submetidos à reação de Feulgen Rossembeck, padronizando-se o tempo de hidrólise em HCL 1N em 10 minutos, a fim de que os resultados pudessem ser interpretados como originados de uma variação específica do DNA total.

2. Determinação do volume nuclear. A metodologia usada para o cálculo do volume nuclear baseia-se na determinação dos diâmetros dos núcleos, considerados elipsóides. De acordo com Mello e Takahashi (1969, 1971) em cada núcleo foram considerados 3 eixos, atribuindo-se ao 3.º eixo o mesmo valor do segundo. O valor do 1.º eixo, correspondente ao diâmetro maior e do 2.º correspondente ao diâmetro menor, foram obtidos em cada núcleo com o auxílio de uma ocular graduada, sendo transformados posteriormente em μm .

O volume para cada núcleo foi então calculado baseando-se na seguinte fórmula:

$$V. N = \frac{1}{6} \pi. D. d^2$$

3. Determinação do conteúdo de DNA. Para dosagem do DNA/núcleo foram realizadas medidas das extinções do DNA nuclear corado com Feulgen, em um citofotômetro Zeiss, sob um comprimento de onda de 560 μm .

Procurou-se corrigir o erro distribucional medindo-se com um plug pequeno 3 diferentes áreas dos núcleos, considerando-se a média das 3 medidas o valor da extinção.

O cálculo do DNA total por núcleo em unidades relativas baseou-se na fórmula utilizada por Frazer & Davidson (1953):

$$\text{DNA} = E. D. d.$$

onde,

E = valor da extinção

D = diâmetro maior e

d = diâmetro menor dos núcleos em μm .

4. Tratamento das medidas. Em virtude da não normalidade dos dados a análise de variância aplicada foi a de Kruskal Wallis e os resultados foram obtidos comparando-se a mesma região nos 3 indivíduos estudados em cada fase (tab. I).

Para o total de medidas obtidas por região, considerando os 3 indivíduos, foram calculadas as médias e o respectivo erro padrão tanto para o conteúdo de DNA (tab. II) como para volume nuclear (tab. III). Realizou-se ainda o estudo da variabilidade de ambas as

variáveis celulares através do cálculo dos coeficientes de variação (tab. IV), bem como foram determinados os coeficientes de correlação (r) com os respectivos testes de significância (t) entre a quantidade de DNA e volume obtido por núcleo (tab. V).

A ocorrência ou não de diferenças significativas em uma mesma região de fase para fase, tanto para DNA como para volume foi determinada também por análise de variância. No caso de serem encontradas diferenças significativas entre os dados a análise de variância foi complementada pelo teste de Duncan, que permite contrastar as médias e determinar onde ocorre a diferença. Como mostram as tabelas VI e VII as médias que não se distinguem por estes testes estão unidas por uma barra.

Todos os cálculos foram efetuados com o auxílio de uma calculadora eletrônica Sharp modelo CS-361, exceto os testes de Bartlett que foram realizados numa calculadora eletrônica MP, modelo 10.

As medidas cariométricas e citofotométricas por núcleo em cada região, nas diferentes fases foram utilizadas para a construção de histogramas de frequência.

RESULTADOS

Durante a fase de pré pupa b foram estudados somente os núcleos das células constituintes dos dutos torácicos e da futura região secretora torácica. Na fase de pupa de olho branco estudou-se na cabeça a região da bolsa salivar e dutos e no tórax a região de dutos e secretoras. Nas pupas de olho vermelho, marrom, preto, pupas pigmentadas e adultos jovens as análises restringiram-se às regiões secretoras da cabeça e tórax, uma vez que nos dutos os núcleos, estudados em um indivíduo representativo de cada fase, apresentaram valores para DNA e volume coincidentes com aqueles determinados nos núcleos dos dutos da glândula em fases anteriores do desenvolvimento (pré-pupa b e pupa de olho branco). Deve ainda ser lembrado que as regiões secretoras da cabeça em operárias de meia idade e operárias velhas apresentaram núcleos bastante irregulares, impedindo a determinação do conteúdo de DNA e volume nuclear, motivo pelo qual as análises dos núcleos nessas regiões não foram elaboradas, pois a realização das mesmas poderia conduzir a resultados errôneos. Portanto, nas operárias de meia idade e operárias velhas os estudos cariométricos restringiram-se aos núcleos das células das glândulas salivares torácicas.

As regiões estudadas diferem entre si no que diz respeito à organização das células e ao tamanho dos núcleos, apresentando as células dos dutos, em todas as fases, núcleos menores e mais regulares que aqueles das porções secretoras.

É importante ressaltar que a ocorrência de mitoses nas células dos dutos permitiu que a média dos menores valores para conteúdo de DNA, obtidos nos núcleos da região dos dutos fosse considerada o valor de $2n$, igual portanto, a 2,7 unidades relativas de DNA. O mesmo foi feito para determinação do volume de um núcleo diplóide, estabelecendo-se ser de $36 \mu\text{m}^3$ tal valor.

As medidas cariométricas e citofotométricas serão em primeiro lugar analisadas em cada fase isoladamente e, posteriormente, será

feita uma comparação dos valores para conteúdo de DNA e volume nuclear em uma mesma região de fase para fase.

Antes de se proceder a tal análise, o exame da tabela I permite dizer que, excetuando-se a região dos dutos torácicos presentes na pré-pupa b, no que se refere a volume nuclear e a região secretora do tórax de operárias de meia idade e velhas, no que se refere a conteúdo de DNA, em todos os outros casos não foram detectadas diferenças significativas ao nível de 1% quando foram comparadas as mesmas regiões nos 3 indivíduos analisados por fase de desenvolvimento, o que permitiu tomar uma média do conjunto de medidas por região nos 3 indivíduos.

1. Análises dos resultados de região para região em cada fase. Em todas as fases observou-se que as células da região de dutos apresentaram sempre conteúdo de DNA e volume nucleares menores que aqueles determinados nas células da região secretora da cabeça, apresentando ambas as variáveis celulares valores bem maiores na região secretora torácica quando comparados aos obtidos nas regiões de dutos e secretora da cabeça (tabela II e III).

A variabilidade dos valores para conteúdo de DNA e volume nuclear obtidos em cada região glandular nas diferentes fases é praticamente a mesmo como pode ser verificado pelos coeficientes de variação (tab. IV).

A correlação entre as 2 variáveis celulares em estudo é bastante baixa, embora significativa ao nível de 1% na grande maioria dos casos (tab. V).

2. Análise dos resultados em uma mesma região de fase para fase. 2.1. *Região de dutos da glândula salivar da cabeça e do tórax.* Na região de dutos os valores médios para conteúdo de DNA situaram-se ao redor de 4c (tab. II) e não diferem significativamente de fase para fase (tab. VI).

Diferença significativa também não é encontrada quando se compara o volume médio dos núcleos dessa região (tab. VII), estando esse valor médio mais próximo de 72 μm^3 (tab. III) na maioria dos casos, que corresponderia ao volume de um núcleo tetraplóide.

Em todas as fases a região dos dutos apresentou, como pode ser verificado pelos histogramas, núcleos com conteúdo de DNA variando de 2n a 4n e cujos volumes variaram desde 36 μm^3 , admitido corresponder ao volume de um núcleo diplóide até 72 μm^3 , volume este que um núcleo tetraplóide deveria apresentar.

2.2. *Região secretora da cabeça.* Esta região já apresenta núcleos poliplóides desde o início de seu desenvolvimento na fase de pupa de olho vermelho, atingindo os seus núcleos nível médio de ploidia próximo a 7n e esse permanece praticamente constante até a fase de pupa de olho preto (tab. II e VI). No entanto, na fase seguinte representada pela pupa pigmentada e conteúdo médio de DNA aumenta, atingindo um grau de ploidia próximo a 11n o qual não representada pela pupa pigmentada o conteúdo médio de DNA aumenta na região secretora da cabeça duas vezes, uma na fase de pupa de olho vermelho e outra na fase de pupa pigmentada (tab. VI), em relação aos dos dutos.

Pelos histogramas verifica-se que nas pupas de olho vermelho, marrom e preto (figs. 3, 4 e 5) de modo geral, os valores para

conteúdo de DNA abrangem intervalos entre $2n$ e $8n$ aproximadamente e nas pupas pigmentadas e operárias jovens (figs. 6 e 7) o conteúdo de DNA alcança valores desde $4n$ até $16n$. Já os valores para volume nuclear variam de 72 a $144 \mu\text{m}^3$ em todas as fases estudadas.

O volume nuclear médio, como verificado pela tabela III e tabela VII permanece constante desde a pupa de olho vermelho até a operária jovem, tendo o fato sido demonstrado por análises de variância complementadas pelo teste de Duncan. Esse volume nuclear corresponde aproximadamente ao volume que um núcleo com grau de ploidia $7n$ deveria apresentar. Portanto, o aumento do conteúdo de DNA na fase de pupa pigmentada não é acompanhado pelo aumento do volume médio nessa região da glândula.

Nota-se pela tabela V que à medida que a pupa envelhece os coeficientes de correlação diminuem, significando que o número de núcleos, nos quais o conteúdo de DNA e o volume variam proporcionalmente, diminui.

2.3. *Região secretora torácica.* De acordo com o teste de Duncan, verifica-se que o conteúdo de DNA nessa região permanece constante desde a fase de pré-pupa b até a fase de pupa de olho preto (tabela VI), equivalendo essas quantidades médias de DNA determinadas a um grau de ploidia aproximadamente igual a $11n$. Assim, considerando-se a quantidade de DNA de um núcleo diplóide igual a 2,7 unidades relativas, pode-se dizer que na região secretora torácica o valor médio para essa variável celular é, aproximadamente, 6 vezes maiores que aquele correspondente a um núcleo diplóide. Portanto, desde o início da diferenciação de tal região já ocorre poliploidização. Na pupa pigmentada, tal grau de ploidia aumenta (tabela II), alcançando valor médio aproximado de $18n$ o qual permanece constante nas fases da vida adulta estudadas (tabela VI).

Quanto ao volume nuclear, o valor médio deste, embora desde o início do desenvolvimento da porção secretora torácica seja maior que aquele detectado nos núcleos dos dutos, também não varia da fase de pré-pupa b até a fase de pupa de olho preto, como demonstrado pelo teste de Duncan (tabela VII), permanecendo nessas fases com valor correspondente a um núcleo $8n$. No entanto, na pupa pigmentada quando o nível de ploidia atinge valor $18n$ o volume aumenta para $279,46 \mu\text{m}^3$ que seria correspondente a um grau de ploidia $16n$, mas na operária jovem o volume nuclear médio alcança o valor de $461,56 \mu\text{m}^3$ que corresponderia ao volume de um núcleo $26n$. Nas fases posteriores, operárias de meia idade e operárias velhas, apesar de o nível de ploidia não se modificar em relação às fases anteriores, referindo-se então à pupa pigmentada e à operária jovem, o volume nuclear médio decresce de tal forma que atinge novamente valores correspondentes a um núcleo $8n$.

Também nessa região, considerando os conteúdos médios de DNA (tabela II) pode-se dizer que tal variável aumenta significativamente duas vezes, uma na pré-pupa b e uma na pupa pigmentada, em relação ao valor médio encontrado nos dutos. Os coeficientes de correlação, como mostrado na tabela V, na região secretora torácica permanecem praticamente constantes desde a fase de pré-pupa b até a fase de pupa pigmentada, excetuando a pupa de olho branco onde esta variável sofre um decréscimo notável. De pupa pigmentada para

a fase de operária jovem um outro decréscimo é novamente detectado e, a partir dessa fase, o coeficiente de correlação aumenta, alcançando o maior valor na fase de operária velha.

Está claro que, tanto o volume como o grau de ploidia variam de fase para fase dependendo da região da glândula, mas excetuando a região secretora torácica na operária jovem, onde se observa um hipermegetismo, o aumento se faz sempre em menor proporção que aquele do DNA (hipomegetismo).

De acordo com os histogramas verifica-se que os núcleos das células da região secretora torácica atingem valores para conteúdo de DNA desde $4n$ até $16n$ já na pré-pupa, o que se mantém nas fases de pupa de olho branco, vermelho, marrom e preto (figs. 1, 2, 3, 4 e 5). Nas pupas pigmentadas, operárias jovens, de meia idade e velhas os núcleos estudados variam em conteúdo do DNA desde $8n$ até $32n$ (figs. 6, 7 e 8).

Para o volume nuclear valores de $72 \mu\text{m}^3$ a $144 \mu\text{m}^3$ aproximadamente foram encontrados nos núcleos dessa região em todas as fases, exceto nas operárias jovens (fig. 7), onde os volumes aumentaram alcançando valores desde $288 \mu\text{m}^3$ até $576 \mu\text{m}^3$.

DISCUSSÃO

A fase pré-pupal é caracterizada pela ocorrência de histólise de determinadas estruturas larvais, sejam órgãos ou tecidos, e posterior reorganização de outras que permanecerão desempenhando funções semelhantes àquelas exercidas pelas anteriores durante toda a vida adulta. Para as glândulas de seda, presentes durante o estágio larval, a degeneração ocorre no estágio pré-pupal denominado pré-pupa a, enquanto que a organização das glândulas salivares do adulto inicia-se ao término desse estágio, na fase pré-pupa b.

Foi comprovado morfológicamente que as futuras regiões secretoras das glândulas salivares de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. originam-se em fases diferentes do desenvolvimento pós-embrionário. É sabido, então, que as glândulas salivares do tórax iniciam o desenvolvimento no final da fase pré-pupal, a partir de evaginações dos dutos das glândulas salivares larvais ou glândulas de seda, cujas porções secretoras degeneram no início desse mesmo estágio. No entanto, a organização da futura região da cabeça se faz mais tardiamente, ocorrendo durante a pupação. Tais aspectos foram demonstrados anteriormente por Cruz-Landim & Mello (1967).

O processo de diferenciação das glândulas salivares desde o momento em que se inicia, continua durante todo o desenvolvimento pupal e ao término dessa fase essas estruturas estão completamente formadas, iniciando suas atividades secretoras no adulto (Cruz-Landim & Mello, 1967).

Pelas análises citofotométricas e cariométricas tentou-se mostrar o comportamento nuclear das células secretoras e dutos durante o processo de diferenciação das glândulas salivares da cabeça e tórax e durante a fase ativa de secreção dos adultos, no que diz respeito a variações do conteúdo de DNA e volume nucleares.

Na região dos dutos, considerando dutos e bolsas salivares da cabeça e dutos torácicos, uma confirmação de que os menores valores para o conteúdo de DNA representam a condição diplóide do núcleo

na região dos dutos é a presença nessas regiões de mitoses indicando os dados que, enquanto alguns núcleos já completaram a duplicação do genoma outros ainda não a iniciaram, correspondendo tais núcleos às fases G_2 e G_1 respectivamente, do ciclo celular. Por sua vez, os valores intermediários entre $2n$ e $4n$ encontrados em alguns núcleos demonstram que os mesmos estão na fase S, isto é, em franca atividade autossintética de acordo com a terminologia de Bloch (1958). Portanto, o assincronismo na duplicação dos genomas anterior ao processo de mitose, explica a variabilidade dos dados encontrada para o conteúdo de DNA e volume nuclear, em se tratando de núcleos de células que constituem os dutos.

Considerando tanto a ausência de núcleos poliplóides na região dos dutos como a presença de mitose, detectadas também por Cruz-Landim & Mello (1967), em todas as fases estudadas, pode-se dizer que essa região cresce, não por aumento do tamanho das células, mas sim por um aumento do número de células através de mitoses. Desde que já está comprovado que a poliploidização somática se relaciona com o aumento do número de genes, provocando consequentemente uma intensificação da síntese protéica através de um aumento na produção de RNA mensageiro, a ausência de núcleos poliplóides na região dos dutos está de acordo com o esperado, considerando que essas células não apresentam função secretora.

Como já foi mencionado, as glândulas salivares nas abelhas sociais apresentam um único ciclo secretor durante a vida adulta (Cruz-Landim & Akahira, 1966). Portanto, no caso das glândulas salivares de *Melipona* seria esperada uma poliploidização somática dos núcleos das células secretoras, relacionadas com a intensificação da síntese protéica, somente na fase adulta. Todavia, ainda na fase de pré-pupa os núcleos das células da futura região secretora torácica já se apresentaram poliplóides quando comparados com aqueles dos dutos e o grau de poliploidia manteve-se aproximadamente constante nessa região nas fases de pupa de olho branco, olho vermelho, olho marrom e olho preto. Nas pupas pigmentadas os graus de ploidia dos núcleos da região secretora torácica alcançaram valores maiores, mantendo-se constantes na fase adulta, representada pelas operárias jovens, operárias de meia idade e operárias velhas. Portanto, aconteceu um ciclo de poliploidização ligado à diferenciação e um ciclo precedendo o início da atividade.

Em relação às glândulas salivares da cabeça, sabe-se que desde o início de sua diferenciação as células, que posteriormente terão função secretora, apresentaram também núcleos poliplóides, embora os graus de ploidia atingidos por esses núcleos sejam mais baixos que aqueles alcançados pelos núcleos da região futuramente secretora torácica, em todas as fases estudadas.

Em ambas as regiões, estudadas nas diferentes fases, foram sempre encontrados valores intermediários para conteúdo de DNA, o que pode ser explicado como no caso dos dutos, por um assincronismo na replicação do genoma durante o processo de poliploidização, mas não depois. A permanência dos valores intermediários após essa fase indica ou subreplicação ou a presença de DNA adicional.

Desde que as células secretoras das glândulas salivares de *Melipona* se originam a partir de células dos dutos, torna-se possível relacionar a poliploidização inicial observada com o processo de

diferenciação. A relação entre síntese de DNA e diferenciação celular é bem demonstrada principalmente em tecidos vegetais (Yokomura, 1962; Brunori, 1971; Evans & Cant'Hof, 1975). Nos animais, tal relação é também encontrada mesmo em tecidos sem função glandular, como no caso das células de Purkinje da córtex do cerebelo de rato (Nováková, 1970). Ainda entre os insetos, de acordo com Lipp (1953), a diferenciação dos tecidos depende do grau de ploidia alcançado pelas células.

O novo aumento do conteúdo médio de DNA nas glândulas salivares de *Melipona* ocorreu na fase de pupa pigmentada, tanto na região secretora da cabeça como naquela do tórax. Essa fase, considerada a fase final da pupação antecede o início do ciclo secretor, preparando-se as células para produzirem uma quantidade maior de secreção que aquela que seria produzida se os níveis de ploidia continuassem mais baixos.

É notório que durante a pupação e vida adulta, o conteúdo de DNA não aumenta em muitos casos em progressão geométrica. Conforme mencionado por Guimarães & Bloch (1975), a possível presença do DNA metabólico, que é um DNA adicional sintetizado de acordo com a intensidade da função celular explicaria tal fenômeno, no entanto, para explicar esse aumento não geométrico do conteúdo de DNA deve-se pensar também que, talvez, apenas partes do genoma sejam replicadas para economia das células.

Como é sabido, no nosso trabalho, cada fase do desenvolvimento de *Melipona* foi representada por três indivíduos diferentes. Análises de variâncias mostraram que diferenças significativas foram obtidas para os volumes dos núcleos na região dos dutos torácicos entre os 3 indivíduos estudados na fase da pré-pupa b, e que as operárias de meia idade e operárias velhas também diferiram entre si quanto ao conteúdo de DNA nuclear das células da região secretora torácica. No entanto, como mostram os respectivos histogramas embora os valores mais frequentes para volume na região dos dutos e para DNA nas regiões secretoras torácicas sejam bastante diferentes, o grau de variabilidade dessas variantes celulares é semelhante nos 3 indivíduos estudados por fase.

Uma grande quantidade de dados mostram que variações do conteúdo de DNA ocorrem em um mesmo indivíduo de tecido para tecido e em um mesmo tecido em diferentes indivíduos.

Em um mesmo tecido o conteúdo de DNA pode também variar de indivíduo para indivíduo conforme demonstram alguns trabalhos, dependendo da alimentação, temperatura e idade. Assim, investigações realizadas por Hensel & Hauschteck-Jungen (1974) em núcleos de células cerebrais de operárias adultas de abelhas demonstraram que variações do conteúdo de DNA ocorriam em dependência da idade. Os autores verificaram que os valores de DNA em abelhas com dois dias de idade mostravam um valor 30% mais baixo quando comparados às abelhas recém emergidas, enquanto que do segundo ao quarto dia o valor do conteúdo de DNA aumentou em 47%. Deve ser lembrado aqui que nesse trabalho a idade pode também ter sido uma das causas responsáveis pela diferença significativa do conteúdo de DNA, determinado na região secretora torácica entre os 3 indivíduos considerados operárias de meia idade e entre aqueles 3 considerados operárias velhas, desde que a seleção destes foi realizada em função

do tipo de atividade na colméia e de caracteres morfológicos, tais com intensidade de coloração do abdômen e quantidade de pelos torácicos. As operárias de meia idade, coletadas próximas aos potes de mel apresentavam bandas amarelo-forte e pelugem marrom sobre fundo castanho, mas de acordo com Kerr (não publicado) essa coloração persiste do 12.º ao 24.º dia. O mesmo é sugerido para operárias velhas que exercem função na coleta de alimentos, mas que apresentam pelugem marrom-escuro e bandas amarelo-forte sobre fundo preto desde o 25.º dia até o fim da vida.

Influência da temperatura no conteúdo de DNA nuclear foi demonstrada por Viola-Magni (1965) em células da medula adrenal de rato nas quais o conteúdo de DNA por núcleo diminui consideravelmente sob exposições intermitentes dos animais a baixas temperaturas, existindo indicações de que esse decréscimo é real e não devido a mudanças nas propriedades do DNA. De acordo com Risler (1959, in Grudmann, 1967) os núcleos da epiderme em *Aedes aegypti* são tetraplóides em larvas com alimentação normal, mas se o alimento da larva é reduzido os núcleos permanecem diplóides.

É lógico pensar então que, em se tratando de células glandulares, causas ambientais em geral podem também ser consideradas fatores que provocam uma hiper ou hipofunção glandular. Resta saber se nas glândulas salivares de *Melipona* na fase de operária de meia idade e operária velha tais fatores atuam a nível de DNA, tornando-se responsáveis em conjunto ou isoladamente, pelas variações detectadas numa mesma região de indivíduos para indivíduo dentro de uma mesma fase, para a qual desconhece-se com exatidão o tempo de duração.

Como já foi mencionado, ficou evidenciado pelo presente trabalho que os núcleos da futura região secretora da cabeça em todas as fases estudadas sempre apresentaram valores para o conteúdo de DNA mais baixos do que aqueles determinados para a região secretora torácica. Embora ambas as regiões sejam constituídas por células glandulares sabe-se que a glândula salivar da cabeça é responsável nas operárias adultas por uma secreção lipídica, enquanto que a glândula salivar torácica depende uma secreção protéica na mesma fase (Cruz-Landim, 1968). Talvez aqui, de acordo com a observação de Nováková *et al.*, (1970) em neurônios de ratos, a poliploidia dependa da função específica de cada tecido.

Deve ser ainda discutida a variação de volume encontrada nos núcleos das células secretoras da glândula salivar, tanto na cabeça como no tórax. Ficou demonstrado pelos diagramas que em ambas as regiões nem sempre o núcleo com maior conteúdo de DNA correspondeu o maior volume nuclear, sendo verificado ou um hipo ou um hipermegetismo.

O problema da relação entre DNA e volume nuclear tem sido discutido por vários autores. Desde o tempo de Jacobj (1925, in Vendrely & Vendrely, 1956) um grande número de pesquisadores têm considerado que o volume nuclear fornece uma indicação da quantidade de DNA. Recentemente Dorn (1974) mostrou que em células poliplóides do intestino médio e corpo gorduroso de *Polyxenus lagurus* L. (Diplopoda) o volume nuclear reflete o conteúdo de DNA. No entanto, Leuchtenberger & Schrader (1951) concluíram, após pes-

quisas realizadas em fígado de rato, que neste tecido não há correlação entre as duas variáveis celulares. Os mesmos autores em 1950 já haviam demonstrado que em *Arvelius* há 3 tipos de espermatócitos que diferem consideravelmente em volume e em seu conteúdo protéico, sendo o conteúdo de DNA o mesmo em cada um dos casos. Posteriormente, vários casos de desvio das relações entre DNA e volume nuclear foram descritos (Alfert & Bern, 1951; Fautrez, 1960; Schreiber *et al.*, 1966; Silva de Moraes, 1972).

A explicação para tais desvios foi dada por Bloem (1958), introduzindo o conceito de interfase heterossintética, onde ocorre duplicação das proteínas não histônicas acompanhadas pelo aumento do volume nuclear.

Com base nos valores médios para conteúdo de DNA (tabela II) e volume nuclear (tabela III) e nos resultados dos testes de Duncan obtidos por nós nas regiões secretoras das glândulas salivares de *Melâpona* (tabela VI e VII), pode-se dizer que na região secretora torácica o volume nuclear permaneceu constante desde a fase de pré-pupa b até a fase de pupa de olho preto. Na pupa pigmentada, o aumento de DNA é ainda acompanhado pelo aumento de volume. A partir dessa fase, inclusive, o conteúdo de DNA permanece constante enquanto que o volume nuclear sofre grandes modificações, aumentando muito na operária jovem e sofrendo um notável decréscimo nas operárias de meia idade e velhas, assumindo novamente valores tão baixos quanto aqueles das fases iniciais da pupação.

Desde que se sabe que a variação do volume nuclear em muitos casos independe da variação do DNA nuclear, estando na dependência das variações do RNA e das proteínas não histônicas (Bloch, 1958), que devem funcionar como derrepressores da atividade gênica (Market, 1954; Busch *et al.*, 1964; Frenster, 1965 e Lallier, 1966), pode ser afirmado que nas células glandulares torácicas a atividade secretora inicia-se na fase de pupa pigmentada que representa o final de pupação, alcançando uma atividade máxima na operária jovem. Aqui, o volume nuclear estaria sendo considerado como um fator representativo da intensidade da atividade de síntese protéica. De acordo com Ahren *et al.* (1968 a e b), as variações na forma do núcleo na zona fascicular da glândula adrenal de rato presumivelmente constituem também informações morfológicas de um aumento na atividade nuclear. Já é conhecido desde há muitos anos, conforme mencionado por Swift (1953), que os núcleos mudam em resposta a mudanças fisiológicas no organismo.

Nas operárias de meia idade e operárias velhas pode ser então sugerida uma possível ausência de atividade secretora nas células da porção salivar torácica, desde que o volume médio de seus núcleos diminui de tal modo que alcança valores próximos àqueles atingidos pelos núcleos das glândulas estudadas durante a pupação onde, conforme demonstrado por Cruz-Landim (1968), as células ainda não iniciaram a produção de secreção salivar, embora secretem o material da cutícula assim como os dutos. Relacionados esses fatos aos aspectos morfológicos inalterados da glândula, apresentados pelas operárias de meia idade e velhas, pode-se supor que a secreção produzida intensamente na fase de pupa pigmentada e operária jovem deve ficar acumulada na célula, sendo eliminada aos poucos, de acordo

com a necessidade. Cabe dizer ainda que a diminuição notável do volume nos núcleos das glândulas de tais operárias coincide com o máximo de heterocromatinização e colorabilidade do material nuclear.

A região torácica apresentou, em quase todas as fases estudadas, núcleos cujos conteúdo de DNA e volume variaram proporcionalmente (tabela V), excetuando-se as fases de pupa de olho branco, operária jovem e operária de meia idade, onde entre essas variáveis a correlação não foi significativa ao nível de 1%.

Na pupa de olho branco, uma vez que nesta fase não há ainda função secretora (Cruz-Landim & Mello, 1967), a diminuição brusca do coeficiente de correlação pode ser devida à muda recente do estágio larval para o pupal, sendo necessário atividade celular mais intensa para secretar a cutícula, perdida durante o processo de muda. A nova diminuição na operária jovem deve refletir, além da secreção da cutícula, pois uma muda ocorre na passagem de pupa para imago (Cameron Jay, 1963), também uma atividade celular intensa na síntese de substâncias que compõem a secreção glandular. Os coeficientes de correlação baixos nessas fases indicam que, na grande maioria dos núcleos, não ocorre variação proporcional entre DNA e volume nuclear. Sabe-se, de acordo com Bloch (1958), que tal fato se registra numa interfase do tipo heterossintético, isto é, onde há produção de RNA *m* para a posterior síntese de proteína. Entretanto, não se pode afirmar com base na variação de tais coeficientes, que nas outras fases as células não desempenhem função secretora alguma.

No que diz respeito à glândula salivar da cabeça, torna-se difícil explicar o comportamento geral dos núcleos em relação ao conteúdo de DNA e volume nucleares apresentados em todas as fases estudadas, uma vez que, nas fases de operárias de meia idade e operárias velhas não foi possível realizar estudos cariométricos e citofotométricos nas células secretoras da referida glândula nos cortes obtidos, em virtude do aspecto observado. No entanto, pode-se sugerir que nesse caso a poliploidização encontrada relaciona-se com a diferenciação e com a função específica do tecido, que é a produção por suas células de secreção lipídica. Com base na variação do volume nuclear não se tem indicações morfológicas da fase em que se inicia a atividade nuclear, concluindo-se com base no aumento médio de DNA que esta atividade se inicia na fase de pupa pigmentada, abrangendo também a fase de operária jovem onde provavelmente termina de acordo com o aspecto alterado dessa região nas operárias de meia idade e operárias velhas. A degeneração dessas glândulas é caracterizada por picnose, ou seja, heterocromatinização dos núcleos.

Pela diminuição do coeficiente de correlação na região secretora da cabeça de fase para fase, atingindo os valores mais baixos na pupa pigmentada e operária jovem, pode-se confirmar as conclusões anteriores, baseadas nas variações do conteúdo de DNA, de que ocorre atividade celular na pupa pigmentada e que esta continua na operária jovem.

Ficou estabelecido pelo trabalho realizado nas glândulas salivares de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. a ocorrência de núcleos poliplóides desde o início da diferenciação das regiões secretoras das referidas estruturas, podendo-se dizer que nos núcleos dessas células

foram observados 2 ciclos de replicação, um quando da diferenciação e outro precedendo o início do funcionamento. Nos dutos, os núcleos poliploides se fizeram ausentes.

A presença de células com vários graus de ploidia nas diferentes regiões das glândulas salivares, findos os processos de multiplicação e poliploidização não constitui fato novo, pois, como referido por White (1973) em alguns tecidos somáticos de determinados insetos ou todas as células são poliplóides ou então apresentam o que foi denominado mixoploidia, condição esta em que células com vários graus de ploidia coexistem em um mesmo tecido.

Os valores intermediários que permanecem entre duas classes euplóides consecutivas durante a vida adulta nas regiões secretoras, após a estabilização dos níveis médios de ploidia pode significar um comportamento celular assíncrono no que diz respeito à produção de secreção, lembrando que as células secretoras das glândulas salivares do adulto apresentam um ciclo secretor único que pode ser específico para cada célula. Na presença de tal assincronismo, pode-se supor que esse fato seja também responsável por diferenças encontradas entre indivíduos estudados nessa fase, embora não seja excluída a influência de outros fatores já mencionados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Dra. Carminda da Cruz Landim, a quem sou especialmente grata.

REFERÊNCIAS

- Ahrén, Chr., G. Hansson & P. Hedner, 1968a. Nuclear shape variations in the fascicular zones of the rat adrenal gland. 1. Effect of corticotrophin. *Acta Endocrinol.*, 59: 652-658.
- Ahrén, Chr., G. Hansson & P. Hedner, 1968b. Nuclear shape variations in the fascicular zones of the rat adrenal gland. 2. Effect of unilateral adrenalectomy with hypophysectomy. *Acta Endocrinol.*, 59: 660-667.
- Alfert, M. & H. A. Bern, 1951. Hormonal influence on nuclear synthesis. I. Estrogen and uterine gland cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 37: 202-205.
- Bloch, D. P., 1958. Changes in desoxyribonucleic complex during the cell cycle. In "*Frontiers of Cytology*" (Palay, Ed.). New Haven Univ. Press, 113-166.
- Boivin, A., R. Vendrely & C. Vendrely, 1948. L'acide desoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 226-1061.
- Breuer, M. E. & C. Pavan, 1955. Behavior of polytene chromosome of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*, 7: 371-386.
- Brunori, A., 1971. Synthesis of DNA and mitosis in relations to cell differentiation in the roots of *Vicia faba* and *Lactuca sativa*. *Cytologia*, 24 (2): 209-215.

- Busch, H., W. C. Stabruck, E. J. Singh & T. Suk Ro, 1964. Chromosomal proteins. The role chromosome in development. Ed. M. Locke. Academic Press, New York, pp. 51-71.
- Cameron Jay, S., 1963. The development of honeybee in their cells. *J. Apic. Res.* 2 (2): 117-134.
- Cleffman, G., 1968. Regulierung der DNS — Menge in Makronucleus von *Tetrahymena*. *Exp. Cell. Res.*, 50: 193-207.
- Cruz, C. da C., 1968. Histoquímica e ultraestrutura das glândulas salivares de abelhas (Hymenoptera, Apoidea). *Arq. Zool. São Paulo*, 17 (3): 113-166.
- Cruz-Landim, C. da & Y. Akahira, 1966. Influências da alimentação no desenvolvimento de algumas glândulas de *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latr. (Hym., Apoidea). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 19 (6): 63-78.
- Cruz-Landim, C. da & M. L. S. Mello, 1967. The post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apoidea). II. Development of the salivary glands system. *J. Morph.*, 123 (4): 481-502.
- Cullis, C. A., 1973. DNA amounts in the nuclei of *Paramecium bursaria*. *Chromosoma*, 40: 127-133.
- Dorn, A., 1974. Nuclear volume and DNA levels in *Polyxenus lagurus* L. (Diplopoda, Penicillata) during post-embryonic development. *Entomology Abstracts*, 5 (2): 16.
- Durrant, A., 1962. The environmental induction of heritable changes in *Linum*. *Heredity*, 17: 27-61.
- Evans, G. M., 1968. Nuclear changes in flax. *Heredity*, 23: 25-38.
- Evans, L. S. & J. V. Vant'Hof, 1975. Is polyploidy necessary in higher plants? *Amer. J. Bot.*, 62 (10): 1060-1064.
- Fautrez, J., 1960. Correlation between volume of the nucleus and its DNA content. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 66: 210-224.
- Frenster, J. H., 1965. Nuclear polyanions as derrepressors of synthesis of ribonucleic acid. *Nature.*, 206: 600-683.
- Gabrusewycz-Garcia, N., 1964. Cytological and autoradiographic studies in *Sciara coprophila* salivary gland chromosomes. *Chromosoma*, 15: 312-344.
- Govaert, J., 1957. Étude quantitative de la teneur en acide desoxyribonucleique des noyaux des cellules somatiques et germinatives chez *Fasciola hepatica*. *Arch. Biol.*, 68: 165-200.
- Grundmann, E., 1967. Citologia general. Introducción a la morfologia funcional de la célula. Editorial Labor S.A., 451 pp.
- Guimarães, R. C. & D. P. Bloch, 1975. O DNA metabólico. *Ciênc. Cult.*, 27 (6): 655-664.
- Hensel, W. & E. Hauschteck-Jungen, 1974. DNA — Feulgen value in brain cells of the adult worker honeybee dependent on age. *Experientia*, 30: 1424-1425.

- Lallier, R., 1966. Morphogenetic effects of acidic glycoproteins on the development of sea urchin eggs. *Nature*, 211: 99.
- Leeman, L., 1959. La teneur en DNA de la medulla — surrénale après injections d'insuline chez le rat blanc. *Exp. Cell. Res.*, 16: 686-688.
- Leuchtenberger, C. & F. Schrader, 1951. Relationship between nuclear volume, amount of intranuclear protein and DNA in various rat cells. *Biol. Bull.*, 101: 95-98.
- Lipp, C., 1953. Über hewwachstum endomitosem um funktionzyklen in der tricogen zellen von *Corixa punctata* Felig. *Chromosoma* 5: 454-486.
- Lorick, G., 1970. Differential DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic chromosome sets of *Planacoccus citri*. *Chromosoma*, 32: 11-30.
- Maherchaudani, N. J. & J. M. Naylor, 1971. Variability in DNA content and nuclear morphology of the aleurone cells of *Avena fatua* (Wild Dats). *Can. J. Genet. Cytol.*, 13: 578-584.
- Market, C. L., 1954. The role of chromosomes in development. Ed. M. Locke. Academic Press, New York, pp. 1-9.
- Nováková, V., W. Sandritter & G. Schlueter, 1970. DNA content of neurons in the fat central nervous system. *Exp. Res.*, 60: 454-456.
- Pisi, E. & G. Cavalli, 1955. Teneur en acide désoxyribonucléique et activité mitotique dans le rein du rat blanc dans diverses conditions expérimentales. *Arch. Biol. (Liège)*, 66: 439-482.
- Rudkin, G. T. & S. L. Corlette, 1957. Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 43: 964-968.
- Rudkin, G. T., 1965. The structure and function of heterochromatin. Proc. XI Intern. Cong. Gen., 2: 359-374. Oxford, New York, Pergamon Press.
- Sauaia, H. & M. A. R. Alves, 1969. Nonreplication of DNA in heterochromatin of the ovary nurse cells of sciarid. *Exp. Cell. Res.*, 55: 127-128.
- Schrader, F. & C. Leuchtenberger, 1950. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Exp. Cell. Res.* 1: 421-452.
- Schreiber, G., N. M. B. Melucci, S. E. Gerken, Y. X. Sant'Anna, L. A. Fallieri & F. O. Amorin, 1966. Pesquisa de Citologia Quantitativa. XIX. DNA e volume nuclear nos tecidos somáticos dos vertebrados. *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.* 33 (1): 135-150.
- Schreiber, G., M. R. Schreiber & L. A. Fallieri, 1967. Interfase autossintética e heterossintética nas glândulas de *Aplysia brasiliiana* Rang. *Ciência e Cultura*, 19: 473-474.
- Silva de Moraes, R. L. M., 1972. Conteúdo de DNA e volume nuclear nas glândulas de seda de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. durante o desenvolvimento larval. Dissertação apresentada ao Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre. 54 pp.

- Stick, H. F., 1962. Variation of DNA content in embryonal cells of *Cyclops strennus*. *Exp. Cell. Res.*, 26: 136-143.
- Swift, H., 1953. Quantitative aspect of nuclear nucleoproteins. *Intern. Rev. Cytol.*, 2: 1-76.
- Swift, H., 1962. In "The molecular control of cellular activity". J. M. Allen, Editor, McGraw-Hill, New York, p. 73.
- Vendrely, R. & C. Vendrely, 1956. The results of cytophotometrics in the study of the desoxyribonucleic acid (DNA content of the nucleus). *Intern. Rev. Cytol.*, 5: 171-194.
- Viola-Magni, M. P., 1965. Changes in the DNA content of adrenal medulla nuclei of rats intermittently exposed to cold. *J. Cell. Biol.*, 25: 451-433.
- White, M. J. D., 1973. The chromosome. Ed. Chapman and Hall (London), 214 pp.
- Yomomura, E., 1962. Cytophotometrical study of DNA in root tips of *Vicia faba*. *Int. J. Cyt.*, 24 (4): 424-430.

LEGENDA DAS FIGURAS

Distribuição de freqüência dos valores para conteúdo de DNA e volume nuclear nas diferentes regiões, estudadas nas diferentes fases.

- Fig. 1 (p. 270). Glândula salivar de pré-pupa b.
- Dutos torácicos, considerando os 3 indivíduos isoladamente.
 - Dutos torácicos, considerando os 3 indivíduos em conjunto.
 - Região secretora torácica.
- Fig. 2 (p. 271). Glândula salivar de pupa de olho branco.
- Dutos e bolsa salivar da cabeça.
 - Dutos torácicos.
 - Região secretora torácica.
- Fig. 3 (p. 272). Glândula salivar de pupa de olho vermelho.
- Dutos da cabeça.
 - Dutos do tórax.
 - Região secretora da cabeça.
 - Região secretora do tórax.
- Fig. 4 (p. 273). Glândula salivar de pupa de olho marrom.
- Dutos da cabeça.
 - Dutos torácicos.
 - Região secretora da cabeça.
 - Região secretora torácica.
- Fig. 5 (p. 274). Glândula salivar de pupa de olho preto.
- Dutos da cabeça.
 - Dutos torácicos.
 - Região secretora da cabeça.
 - Região secretora torácica.

Fig. 6 (p. 275). Glândula salivar de pupa pigmentada.

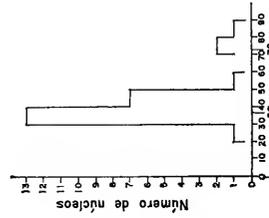
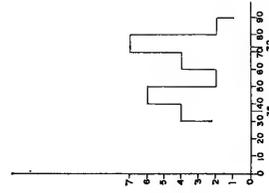
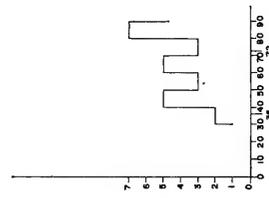
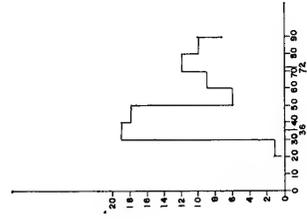
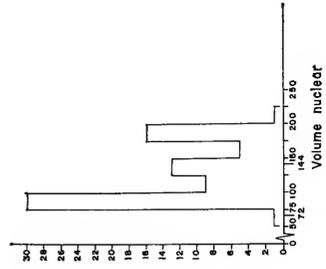
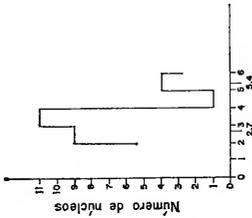
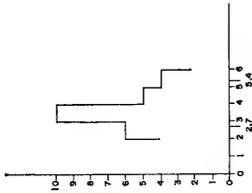
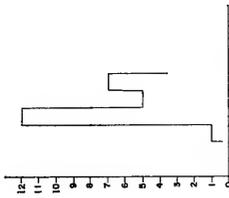
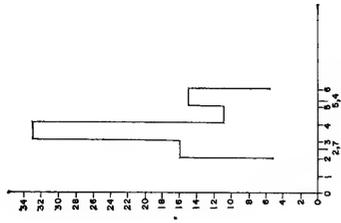
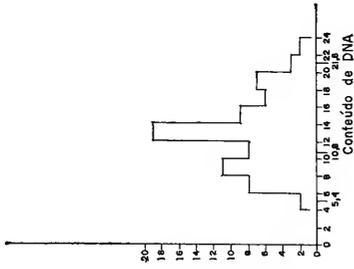
- a Dutos da cabeça.
- b Dutos torácicos.
- c Região secretora da cabeça.
- d Região secretora do tórax.

Fig. 7 (p. 276). Glândula salivar de operária jovem.

- a Dutos da cabeça.
- b Dutos torácicos.
- c Região secretora da cabeça.
- d Região secretora do tórax.

Fig. 8 (p. 277).

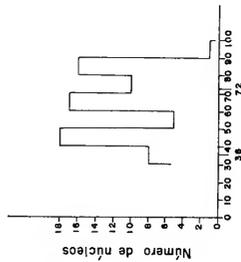
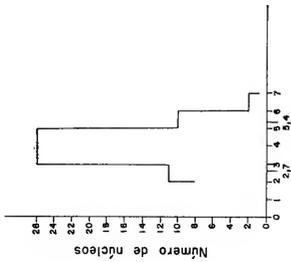
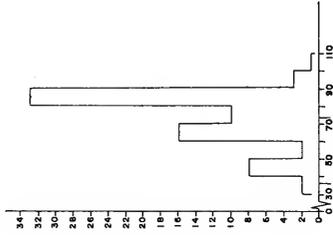
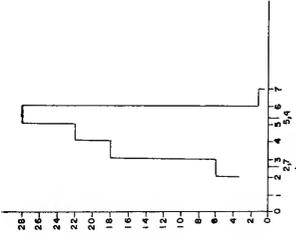
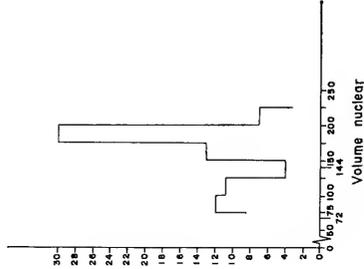
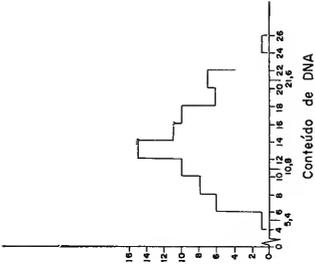
- a Região secretora do tórax de operária de meia idade.
- b Região secretora do tórax de operária velha.



C

B

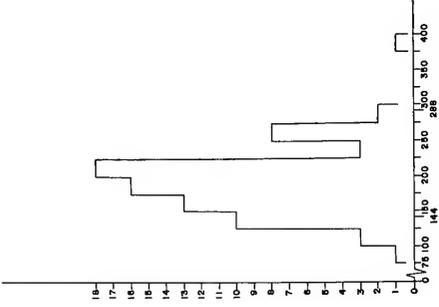
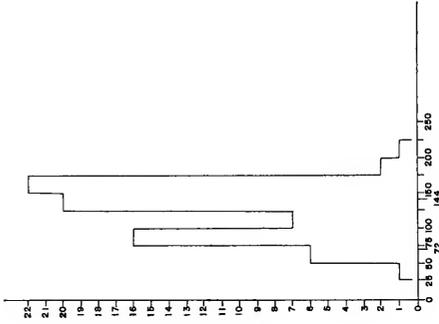
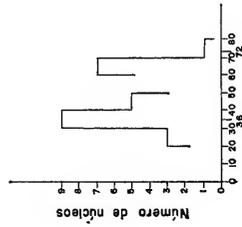
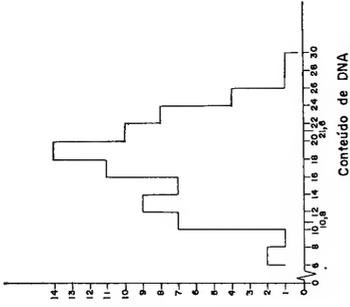
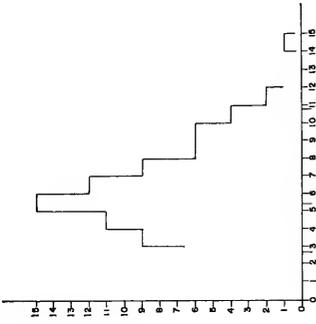
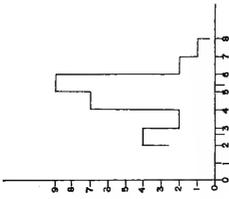
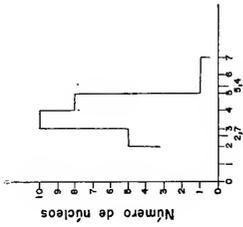
A



C

B

A

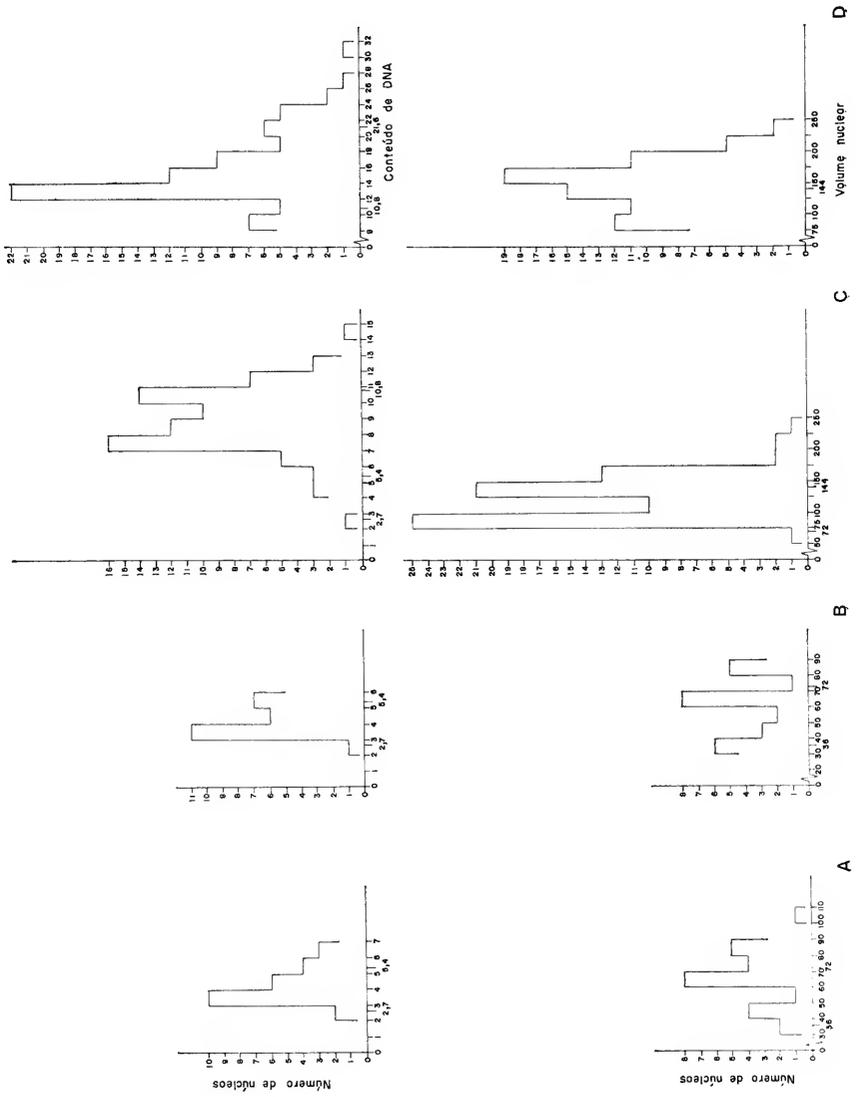


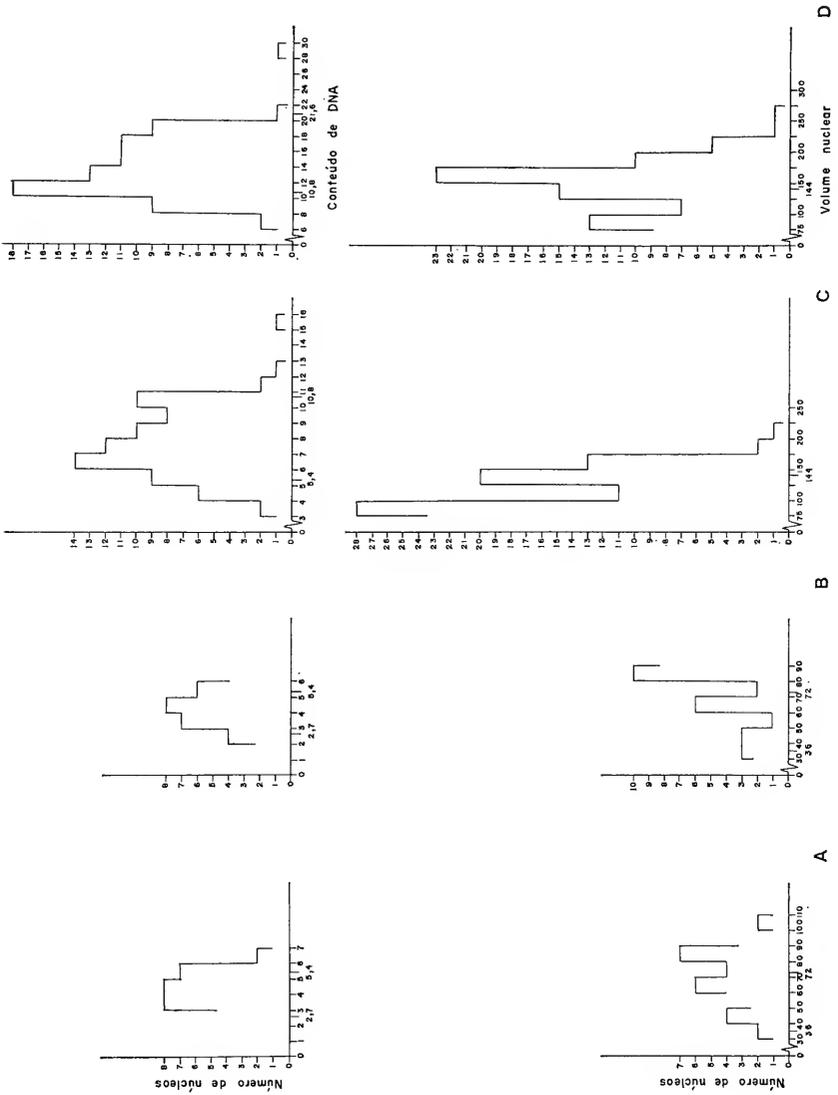
A

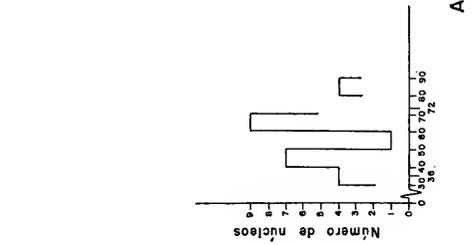
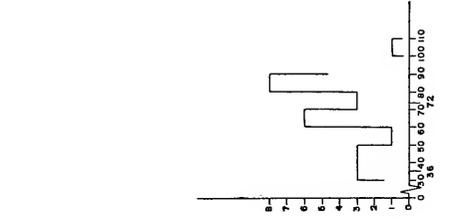
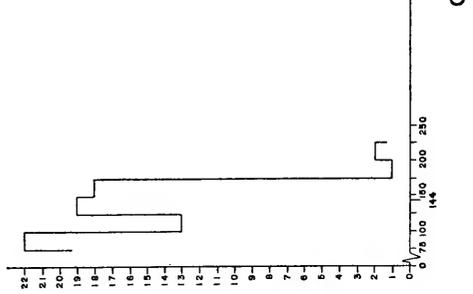
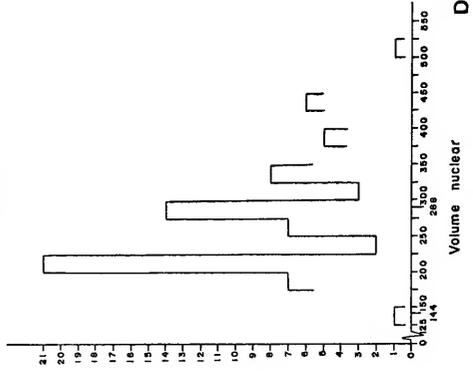
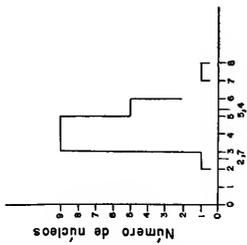
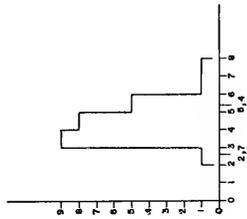
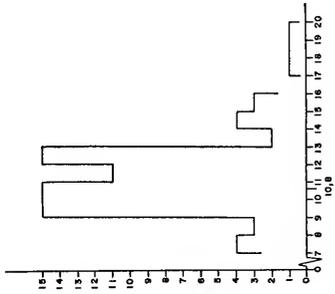
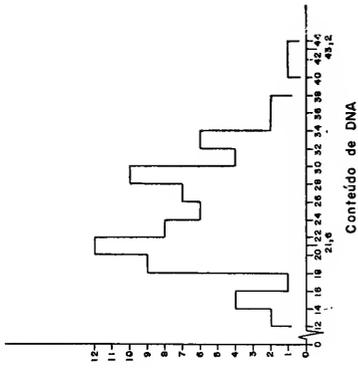
B

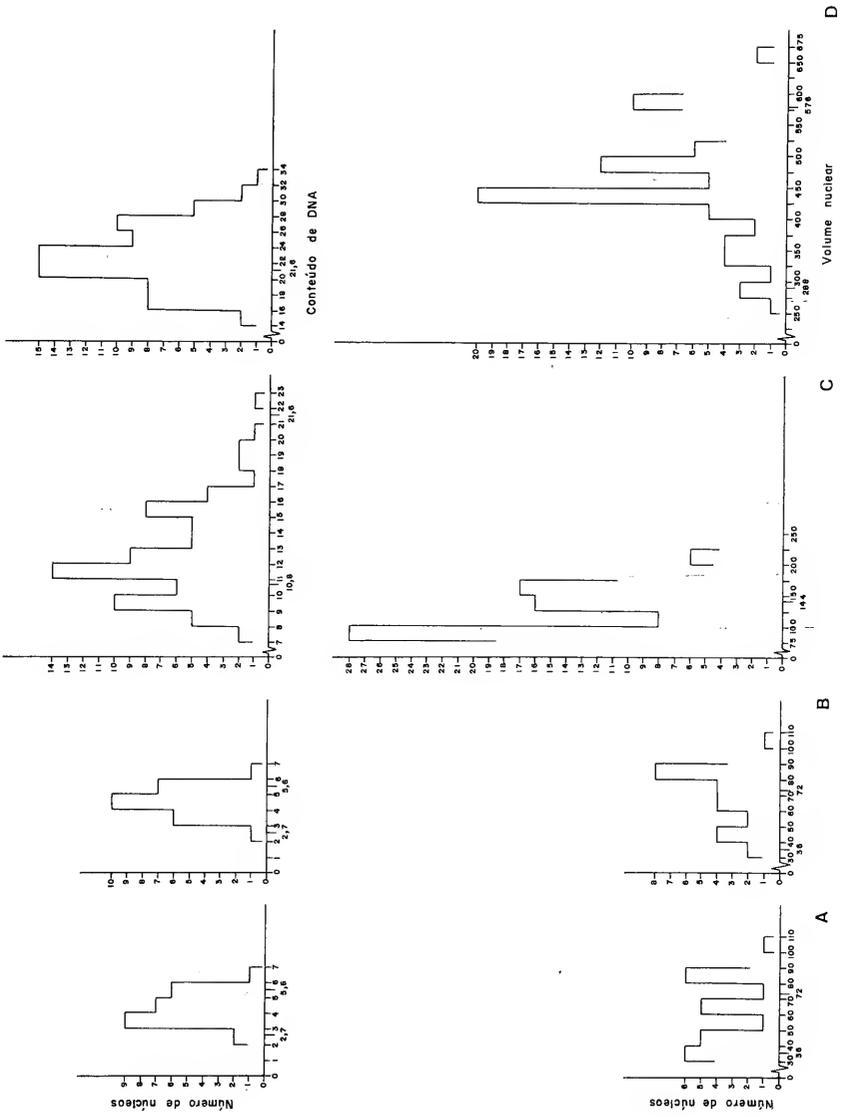
C

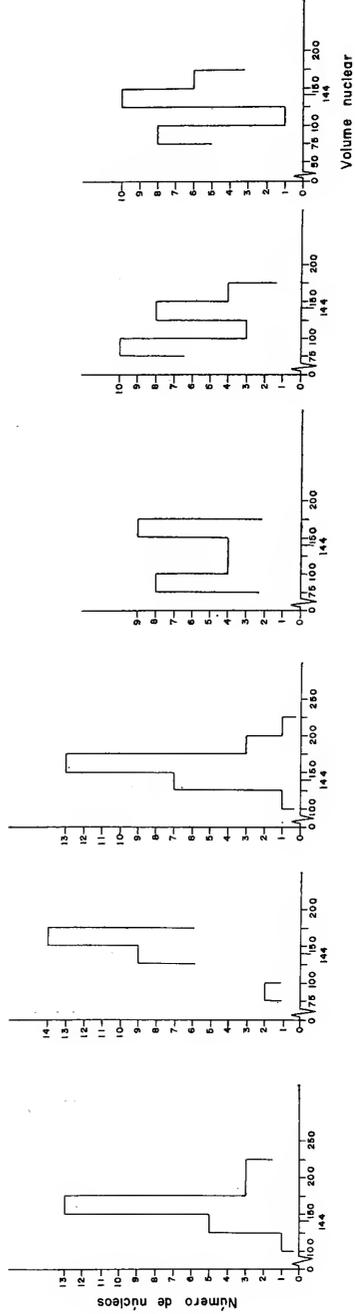
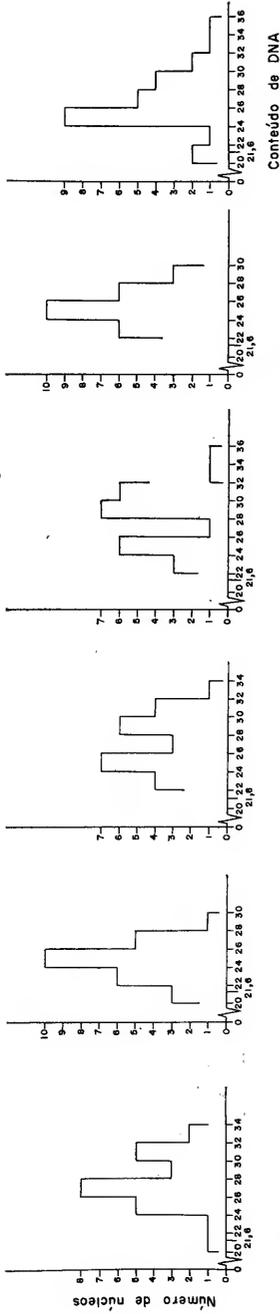
D











B

A

TABELA I Resultado da análise de variância de Kruskal - Wallis (H) para conteúdo de DNA e volume nuclear entre os três indivíduos estudados por fase, considerando as diferentes regiões das glândulas salivares.

Fases	GLÂNDULAS				SALIVARES				
	C A B E Ç A				T Ó R A X				
	DUTO E BOLSA SALIVAR		SECRETORA		DUTO		SECRETORA		
	DNA	V.N.	DNA	V.N.	DNA	V.N.	DNA	V.N.	
PPb						7.77	17.08	5.66	1.72
POB	8.05	3.29			0.16	5.99	8.90	2.91	
POV			1.92	3.40			1.78	1.60	
POM			3.00	8.35			2.24	4.25	
POP			2.46	2.04			2.47	5.26	
Ppig			5.16	1.57			1.72	4.52	
Op.j.			1.64	2.55			5.16	1.86	
Op.m.							18.82	4.24	
Op.v.							10.02	4.42	

$$\chi^2 (2; 0.01) = 9.21$$

TABELA II - Média e erro padrão da média do conteúdo de DNA ($\bar{Q} \pm sq$) em unidades relativas nas diferentes fases do desenvolvimento e regiões da glândula, considerando os três indivíduos em conjunto.

Fases	GLÂNDULAS		SALIVARES	
	CABEÇA		TÓRAX	
	DUTO	SECRETORA	DUTO	SECRETORA
	$\bar{Q} \pm sq$	$\bar{Q} \pm sq$	$\bar{Q} \pm sq$	$\bar{Q} \pm sq$
PPb	-	-	3.80 ± 0.10	13.00 ± 0.50
POB	3.96 ± 0.10	-	4.46 ± 0.10	13.89 ± 1.12
POV	3.64 ± 0.20	6.53 ± 0.26	4.67 ± 0.28	17.58 ± 0.54
POM	4.30 ± 0.20	8.86 ± 0.24	4.23 ± 0.17	15.69 ± 0.53
POP	4.60 ± 0.20	7.75 ± 0.26	4.12 ± 0.20	13.77 ± 0.46
Ppig	4.32 ± 0.22	11.47 ± 0.28	4.57 ± 0.22	25.14 ± 0.74
Op.J.	4.18 ± 0.22	12.70 ± 0.37	4.63 ± 0.17	22.86 ± 0.46
Op.M.	-	-	-	26.65 ± 0.33
Op.V.	-	-	-	26.81 ± 0.36

TABELA III - Média e erro padrão da média do volume nuclear ($V \pm vq$) nas diferentes fases do desenvolvimento e regiões da glândula, considerando os três indivíduos em conjunto.

Fases	GLÂNDULAS		SALIVARES	
	CABEÇA		TÓRAX	
	DUTO	SECRETORA	DUTO	SECRETORA
	$V \pm vq$	$V \pm vq$	$V \pm vq$	$V \pm vq$
PPb	-	-	55.52 ± 1.94	126.94 ± 4.27
POB	61.62 ± 1.88	-	71.63 ± 1.61	154.52 ± 4.35
POV	47.04 ± 3.07	124.20 ± 3.97	69.33 ± 3.27	189.25 ± 5.90
POM	65.25 ± 3.37	121.19 ± 4.15	58.44 ± 3.34	144.45 ± 9.08
POP	68.33 ± 3.63	117.17 ± 3.50	66.34 ± 3.20	144.70 ± 4.56
Ppig	57.33 ± 2.99	124.01 ± 3.42	66.89 ± 3.44	279.46 ± 9.92
Op.J.	59.61 ± 3.92	126.07 ± 4.42	67.37 ± 3.30	461.56 ± 9.72
Op.M.	-	-	-	149.30 ± 3.32
Op.V.	-	-	-	122.80 ± 2.75

TABELA IV - Coeficientes de variação obtidos para conteúdo de DNA e volume nuclear entre os três indivíduos estudados por fase, considerando as diferentes regiões das glândulas salivares.

Fases	GLÂNDULAS				SALIVARES			
	CABEÇA				TÓRAX			
	DUTO E BOLSA SALIVAR		SECRETORA		DUTO		SECRETORA	
	DNA	V.N.	DNA	V.N.	DNA	V.N.	DNA	V.N.
PPb					2.61	3.49	3.80	3.36
POB	2.52	3.05			2.24	2.24	8.06	2.81
POV			3.98	3.19			3.07	3.11
POM			2.70	3.40			3.37	6.28
POP			3.67	2.98			3.34	3.15
Ppig			2.44	2.75			2.94	3.54
Op.J.			2.91	3.36			2.01	2.10
Op.m.							1.23	2.19
Op.v.							1.34	2.23

TABELA V - Coeficiente de correlação (r) entre conteúdo de DNA e volume nuclear e respectivos testes de significância (t) nas diferentes regiões da glândula salivar do adulto, considerando os três indivíduos em conjunto estudados por fase.

Fases	GLÂNDULAS				SALIVARES			
	CABEÇA				TÓRAX			
	DUTO E BOLSA SALIVAR		SECRETORA		DUTO		SECRETORA	
	r	t	r	t	r	t	r	t
PPb					0.76	10.02	0.51	5.06
POB	0.57	5.91			0.45	4.30	0.20	1.74
POV			0.61	6.56			0.55	5.62
POM			0.40	3.73			0.55	5.62
POP			0.42	3.96			0.42	3.96
Ppig			0.33	2.99			0.53	5.34
Op. J.			0.37	3.41			0.05	0.43
Op. m.							0.27	2.40
Op. v.							0.64	7.12

$t_{(73; 0,01)} = 2.66$

TABELA VI - Comparação dos valores médios do conteúdo de DNA nuclear em unidades relativas, obtidos em cada região da glândula salivar nas diferentes fases, pelo teste de Duncan.

REGIÕES	F A S E S								
	PPb	POB	POV	POM	POP	Ppig	Op. J.	Op. M.	Op. V.
DUTOS CABEÇA		3.96	3.64	4.30	4.60	4.32	4.18		
DUTOS TORÁCCIOS	3.80	4.46	4.67	4.23	4.12	4.57	4.63		
SECRETORA CABEÇA			6.53	8.86	7.75	11.47	12.70		
SECRETORA TÓRAX	13.00	13.89	17.58	15.69	13.77	25.14	22.86	26.65	26.81

TABELA VII - Comparação dos valores médios do volume nuclear, obtidos em cada região da glândula salivar nas diferentes fases, pelo teste de Duncan.

REGIÕES	F A S E S								
	PPb	POB	POV	POM	POP	Ppig	Op. J.	Op. M.	Op. V.
DUTO CABEÇA		<u>61.62</u>	<u>47.04</u>	<u>65.25</u>	<u>68.33</u>	<u>57.33</u>	<u>59.61</u>		
DUTO TÓRAX	<u>55.52</u>	<u>71.63</u>	<u>69.33</u>	<u>58.44</u>	<u>66.34</u>	<u>66.89</u>	<u>67.37</u>		
SECRETORA CABEÇA			<u>124.20</u>	<u>121.19</u>	<u>117.17</u>	<u>124.01</u>	<u>126.07</u>		
SECRETORA TÓRAX	<u>126.94</u>	<u>154.52</u>	<u>189.25</u>	<u>144.45</u>	<u>144.70</u>	279.46	461.56	<u>149.30</u>	<u>122.80</u>

