

José Ricardo Penteado Falco

**Alterações celulares pós-fecundação e com o envelhecimento em
glândulas da espermateca de rainhas de *Apis mellifera*
(Hymenoptera:Apoidea).**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
mestre em Ciências Biológicas, área de
Biologia Celular.**

1995

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
José Ricardo Penteado Falco
e aprovada pela Comissão Julgadora.

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Falco, Jose Ricardo Penteado

F181a Alteracoes celulares pos-fecundacao e com o envelhecimento em
glandulas da espermateca de rainhas de Apis mellifera
(Hymenoptera : Apoidea / Jose Ricardo Penteado Falco. - -
Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Maria Luiza Silveira Mello.

Dissertacao (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Citoquimica. 2. Abelhas. 3. Himenoptero. 4. Glandulas-
Envelhecimento. I. Mello, Maria Luiza Silveira.

II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

III. Titulo.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	1/UNICAMP
F.º	181a
V.º	1
E.º	
T.º	24 609
PRCO	433/95
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/05/95
N.º CPD	

Am. 00069234-2

José Ricardo Penteado Falco

**Alterações celulares pós-fecundação e com o envelhecimento em
glândulas da espermateca de rainhas de *Apis mellifera*
(Hymenoptera:Apoidea).**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
mestre em Ciências Biológicas, área de
Biologia Celular.**

Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello

1995

AGRADECIMENTOS

Em especial, a quem mais contribuiu para a minha formação científica:
Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Silveira Mello;

Ao Departamento de Biologia Celular-IB/UNICAMP,

Aos membros da banca prévia examinadora : Prof(a). Dr(a). Iara Maria Silva de Luca, Prof. Dr. Benedito de Campos Vidal, e Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares,

Ao Departamento de Biologia, IB/UNESP-Rio Claro, nas pessoas do Prof. Dr. José Chaud Neto, e do técnico em apicultura Sérgio Pascon, pelas abelhas rainhas gentilmente cedidas,

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina, USP-Ribeirão Preto, nas pessoas do Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares pelas abelhas rainhas gentilmente cedidas, e da Prof(a). Dr(a). Catarina S. Takahashi pela avaliação do relatório anual de mestrado,

Ao Centro de Apicultura Tropical de Pindamonhangaba (SP) nas pessoas de Etelvina , Joel e Celso, pelas abelhas rainhas cedidas, e

Aos órgãos financiadores, CAPES e CNPq,

E a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, abaixo mencionados :

Prof. Dr. Hernandez F. Carvalho, Mario Bianchi, Maria S. Silva, Klélia A. Carvalho, Lilian Panagio, Maria Aparecida da Cunha, Sidnei H. Simões, Francisco Malattesta.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO

A espermateca e suas glândulas em rainhas de abelhas do gênero <i>Apis</i>	01
Comportamento reprodutivo das rainhas	03
Envelhecimento	06
A) Teoria da replicação do DNA	09
B) Teoria do erro	09
C) Teoria do soma descartável	10
D) Teoria dos radicais livres	10
E) Teoria da ligação cruzada	11
F) Teoria regulatória ou endócrina	11
Envelhecimento em insetos	12
Basofilia nuclear e reação de Feulgen	13
Objetivo	16

MATERIAL E MÉTODOS

Material	18
Métodos	18
Preparo dos blocos: parafina ou paraplast	18
Desparafinização	18
Hidratação	19
Basofilia nuclear e CEC	19
Feulgen em bloco, seguido de esmagamento	19
Microespectrofotometria de varredura	20

RESULTADOS

Basofilia nuclear e CEC	22
Conteúdo Feulgen-DNA	26

DISCUSSÃO

Basofilia nuclear e CEC	33
Basofilia e CEC nos espermatozóides de <i>Apis</i>	36
Conteúdo Feulgen-DNA	37

CONCLUSÕES

RESUMO	42
--------	----

ABSTRACT	43
----------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
----------------------------	----

INTRODUÇÃO

A ESPERMATECA E SUAS GLÂNDULAS EM RAINHAS DE ABELHAS DO GÊNERO *Apis*

Em rainhas de *Apis*, a espermateca é uma estrutura esférica, em forma de bolsa (cerca de 1mm de diâmetro), localizada acima da câmara genital e do oviduto médio. É um anexo do trato genital com um par de glândulas associadas, e encontra-se recoberta por uma ampla rede de traquéias, que estão dispostas sob a membrana basal do epitélio. A espermateca tem papel no armazenamento dos espermatozóides durante toda a vida da rainha. O epitélio da parede da espermateca é simples, e composto por células aproximadamente cilíndricas, aparentemente não secretoras (CAMARGO & MELLO, 1970; CAMARGO, 1972; DALLAI, 1975).

VERMA (1974) afirma existir trocas ativas de gases e materiais entre espermateca e hemolinfa, o que auxiliaria na manutenção dos espermatozóides armazenados. As traquéias da espermateca previnem o super-aquecimento e, conseqüentemente, a perda da viabilidade dos espermatozóides armazenados (JOHANSSON & JOHANSSON, 1979).

A análise de açúcares na espermateca de rainhas virgens e fecundadas tem demonstrado a presença de glicose, trealose e frutose. Contudo, a concentração destes compostos no fluido espermático é menor do que na hemolinfa (ALUMOT et al., 1969). A alta atividade de trealose na espermateca sugere a possibilidade das glândulas da espermateca converterem glicose à trealose, o que poderia ser utilizado como recurso energético pelos espermatozóides (VERMA, 1974).

As células do epitélio da espermateca aumentam de tamanho com a idade, indicando que rainhas recém-emergidas necessitam passar por maturação e diferenciação antes de se tornarem reprodutivamente funcionais (VERMA, 1974).

As glândulas da espermateca são constituídas por um par de unidades longas e convolutas. Localizam-se sobre a porção ântero-lateral da espermateca, sob a rede de traquéias. Estas glândulas unem-se por um ducto comum, o qual desemboca na região mediana, ântero-ventral da espermateca. Músculos circulares e longitudinais, denominados de bomba de espermatozóides (BRESSLAU, 1905, in: CAMARGO & MELLO, 1970), cobrem a base do ducto comum.

Estas glândulas possuem um epitélio secretor e, junto à luz do órgão, uma camada denominada íntima. Em rainhas virgens, o citoplasma das células epiteliais é basofílico com núcleos grandes e esféricos, basalmente localizados, com vários pequenos grânulos de cromatina condensada. Em rainhas fecundadas, as células dessas glândulas entram em processo de síntese e seu produto é acumulado em grandes vacúolos em sua porção apical. Os núcleos estão compreendidos na porção basal das células, e possuem formato elipsoidal. Na íntima, os núcleos são nitidamente pequenos e arranjados lateralmente aos canálculos intracelulares (CAMARGO & MELLO, 1970; CAMARGO, 1972). A secreção acumulada é coletada pelos canálculos intracelulares que desembocam no lúmen da glândula (CAMARGO & MELLO, 1970). Admite-se que o produto destas glândulas auxilie na nutrição dos espermatozóides (VERMA, 1974).

Os espermatozóides armazenados na espermateca estão preservados em um estado imóvel, e podem ser reativados por secreções das glândulas da espermateca (FLANDERS, 1939; LENSKY & SCHINDLER, 1967, todos in: VERMA, 1974).

VERMA (1972b, in: VERMA, 1974) observou que no caso das glândulas terem sido extraídas, o fluido da espermateca inibia reversivelmente a mobilidade dos espermatozóides. Em contraste, quando as glândulas permaneciam intactas, o fluido da espermateca não inibia a mobilidade dos espermatozóides.

Concentrações de Na^+ e K^+ são significativamente maiores em homogenados de espermateca do que em qualquer outro tecido ou fluido corpóreo da rainha. A inatividade dos espermatozóides provavelmente se deva às altas concentrações de Na^+ e K^+ , e a reativação dos espermatozóides que deixam a espermateca, poderia ser devida à sua consequente exposição a baixos níveis destes íons (VERMA, 1973, 74). O meio hipertônico mantido na espermateca por estes íons poderia evitar que os espermatozóides armazenados perdessem materiais intracelulares para o meio envolvente, principalmente íons. Este então, poderia ser um mecanismo protetor físico, mais que bioquímico e fisiológico (VERMA, 1973).

O volume da espermateca tende a aumentar com o aumento do peso da rainha emergente. Assim, rainhas emergentes com maior peso, possuem volume da espermateca maior do que aquelas com menor peso (CORBELA & GONÇALVES, 1982). Rainhas produzidas pela transferência de larvas mais velhas

produzem rainhas menores do que aquelas produzidas com larvas mais jovens (WOYKE,1971).

LENSKY & ALUMOT (1969) mostraram que as proteínas da espermateca, estudadas através de imunoeletroforese, são muito similares em rainhas virgens e fecundadas. Afirmaram ainda, que, muito provavelmente, a espermateca e glândulas associadas sejam responsáveis pela síntese destas proteínas, uma vez que a estrutura cuticular não permitiria passagem de proteínas do hemocelo à espermateca. Contudo, as glândulas da espermateca poderiam ser um meio de transporte de proteínas provenientes da hemolinfa.

Fluido espermático e glândulas da espermateca têm pH igual a 9 e 7, respectivamente, excluindo-se então, a possibilidade de inativação dos espermatozóides por meio ácido (LENSKY & SCHINDLER, 1967, in:VERMA, 1974). O fluido espermático contém mais íons inorgânicos e menos material orgânico, quando comparado à hemolinfa. O valor do pH deste fluido varia com a idade (GESSNER & GESSNER, 1976).

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DAS RAINHAS

Três ou quatro dias após a fecundação, a rainha inicia a postura, que perdurará até a sua morte ou substituição por outra rainha nova. O início da ovoposição pode variar de 1 à 22 dias após o acasalamento, como mostrado por alguns autores (SHUKER,1940; CRANE,1949; TARANOV,1973, todos in: SZABO et al.,1987).

A substituição de rainhas é devida à sua baixa produtividade, ou esgotamento do número de espermatozóides na espermateca da rainha (LANGSTROTH et al., 1979; SEVERSON & ERICKSON,1989). Uma vez iniciada a postura, a rainha não fecundará novamente, e provavelmente não deixará a colônia, exceto no caso de enxameamento (LANGSTROTH et al., 1979).

A postura só é interrompida em regiões de clima frio, com invernos rigorosos. Colônias de *Apis mellifera* em climas temperados possuem um ciclo anual de atividades e desenvolvimento. Estas mudanças comportamentais sazonais podem estar associadas a mudanças fisiológicas dos membros da colônia (SHEHATA et al.,1981). Nesse clima, o início da ovoposição parece estar relacionado à

temperatura máxima diária (SZABO et al., 1987). Nessas regiões, as rainhas com cerca de dois a três anos tornam-se improdutivas quanto à postura de ovos fertilizados, porém são citados casos de até 9 anos de postura de ovos fecundados (VERMA, 1974; LANGSTROTH et al., 1979).

O clima pode influenciar no tempo de ovoposição de uma rainha, assim como na razão de diminuição dos espermatozóides (SZABO & HEIKEL, 1987). Variação na postura de ovos e criação de larvas parecem estar relacionadas ao fotoperiodismo (SHEHATA et al., 1981), como sugerido por MORSE (1975, in: SHEHATA et al., 1981).

A atividade enzimática nas abelhas diminui com a idade durante o verão, e permanece alta durante o inverno. Esta é outra indicação de que o processo de envelhecimento é "suspense" durante o inverno. A velocidade do envelhecimento metabólico e fisiológico é menor a baixas temperaturas (ROCKSTEIN & MIQUEL, 1973; JOHANSSON & JOHANSSON, 1979; WINSTON & KATZ, 1981; SOHAL & McARTHUR, 1985). A redução de atividade causa um prolongamento do período de vida das abelhas. Assim, o processo de envelhecimento em *Apis* é determinado pela sua atividade fisiológica. Um aumento de temperatura poderia reduzir o período de vida das abelhas, ao mesmo tempo, aumentando o conteúdo de lipofuscina no cérebro do inseto (MARTIN et al., 1989).

Depósitos celulares de lipofuscina oferecem um excelente meio de determinar a idade fisiológica das abelhas. O acúmulo de lipofuscina é discutido como sendo resultado de danos nos compartimentos celulares, principalmente nas membranas (HOCKSCHILD, 1971, in: MARTIN et al., 1989). Provavelmente, a causa da produção de lipofuscina seja a formação de radicais livres (LEIBOVITZ & SIEGEL, 1980; HALLIWELL, 1981, todos in: MARTIN et al., 1989).

A longevidade das rainhas, e sua produção, são fatores que afetam a apicultura. A substituição de rainhas é um aspecto importante em apiários comerciais. É importante a substituição anual para se conseguir manter alto o nível de indivíduos adultos na colônia (LENSKY & SEIFERT, 1975; BARKAM, 1981, todos in: LENSKY & DEMTER, 1985; LENSKY & SLABEZKI, 1981).

Em insetos, a dieta pode modificar o grau de desenvolvimento, ovoposição, fertilidade, tamanho de órgãos, assim como o período de vida

(ROCKSTEIN & MIQUEL,1973). A alta atividade e alta velocidade metabólica estão relacionadas à um curto período de vida (LAMB,1986). Rainhas de *Apis* vivem períodos de tempo menores em regiões onde há grande abundância de pólen e nectar, apresentando um drástico aumento da colônia neste curto período de tempo (GOSMERAC, 1983).

A capacidade de uma rainha em manter altos níveis de produção de ovos fertilizados é dependente do número de espermatozóides armazenados em sua espermateca. Este número depende de características genéticas da rainha, das condições de sua criação, e de fatores ambientais durante o acasalamento (SZABO & HEIKEL, 1987), além do tamanho da espermateca (WOYKE,1966, in: SZABO e HEIKEL,1987), da idade de transferência da larva (WOYKE,1971), e da idade da rainha no momento da inseminação (WOYKE,1971). WOYKE & JASINSKI (1978) mostraram que o número de operárias atendentes, influencia a quantidade de espermatozóides que penetram no interior da espermateca de rainhas inseminadas instrumentalmente. Cerca de 350 operárias seria o número ideal para esta tarefa, sendo que acima deste valor, pouco mudaria a eficiência de penetração dos espermatozóides na espermateca, levando-se em conta a presença das operárias.

O número de espermatozóides que penetram na espermateca de rainhas inseminadas tende a diminuir com o envelhecimento do sêmen dos machos (WOYKE & JASINSKI, 1982). É comum pensar-se que o número de espermatozóides na espermateca de rainhas inseminadas naturalmente dependa do número de machos envolvidos. Porém, WOYKE (1966, in: WOYKE,1971) mostrou que este número está relacionado com o tamanho da espermateca.

RUTTNER (1983, in: SZABO & HEIKEL,1987) afirma que somente rainhas capazes de armazenar de $5-7 \times 10^6$ espermatozóides em sua espermateca têm um completo período de produção de ovos durante seu período de vida, e que, rainhas que não consigam armazenar tal quantidade, seja qual for o motivo, são substituídas prematuramente pela colônia.

A produção de rainhas pela colônia é inibida por um ou mais feromônios produzidos pela rainha fecundada, os quais estão ausentes, ou produzidos em pequenas quantidades pelas rainhas virgens. A produção de rainhas pela colônia reflete provavelmente o início de deficiência dos feromônios produzidos pela rainha (FREE et al., 1985). A secreção das glândulas mandibulares

das rainhas contém as principais substâncias atrativas da rainha. Estas substâncias causam também inibição dos ovários das operárias, e inibição da formação de rainhas pela colônia (FREE,1987; HAZAN et al.,1989).

As rainhas de *Apis* controlam a fertilização dos ovos, regulando a liberação dos espermatozóides de sua espermateca (HARBO,1979). Este controle deve ser feito pela bomba de espermatozóides (CAMARGO & MELLO,1970; CAMARGO,1972).

HARBO & SZABO (1984) e HARBO (1986), mostraram que rainhas (*Apis*) inseminadas artificialmente além de viverem menos, produzem menos crias que rainhas inseminadas naturalmente. KELLER (1954, in:GONDAL & HASHMI,1976) mostrou que rainhas jovens de *Apis mellifera* produzem mais crias que rainhas velhas.

Durante o curto período de cópula, o sêmen é depositado na vagina e nos ovidutos da rainha. Os espermatozóides, provavelmente estimulados por algum atrativo, passam pelos ductos espermáticos até alcançarem a espermateca, onde são armazenados e comprimidos, permanecendo quiescentes até serem requeridos (LANGSTROTH et al.,1979).

O processo de acasalamento natural estimula o início da ovoposição das rainhas. A presença de fluido seminal, ou espermatozóides na espermateca e ovidutos da rainha, acelera o início da ovoposição (KAFTANOGLU & PENG, 1982).

Uma rainha copula com vários machos durante um vôo nupcial (TRYASKO,1951; TABER,1954; WOYKE,1955; todos in:WOYKE,1988), sendo que as rainhas podem realizar de dois a três vôos, num mesmo dia ou em dias subsequentes. Uma rainha retornando do vôo contém cerca de 80 milhões de espermatozóides em seus ovidutos. Cerca de 5 milhões destes espermatozóides penetram na espermateca (WOYKE, 1960, in:WOYKE,1988). WOYKE (1983,88) mostrou que a velocidade de penetração dos espermatozóides é maior durante as primeiras horas após a inseminação.

O acasalamento das abelhas pode ser afetado pelas características sociais da colônia, por fatores fisiológicos de rainhas e machos, e pelo comportamento das operárias em relação às rainhas (SZABO et al.,1987).

ENVELHECIMENTO

KOHN (1978, in: GILCHREST,1984) define envelhecimento em vários contextos: 1)envelhecimento químico, manifestado pelas mudanças na estrutura de cristais ou agregados moleculares, 2)envelhecimento extracelular, manifestado por ligações cruzadas progressivas de macromoléculas, 3)envelhecimento intracelular, manifestado por mudanças nos componentes celulares normais, ou por acúmulo de substâncias no interior das células, e 4)envelhecimento do organismo inteiro. Envelhecimento pode, ser definido ainda como decréscimo na adaptação, como consequência da perda de tecido e reservas funcionais (ALBERTINI,1952 in: BELLAMY,1986); como processo tempo-dependente onde um "corpo" não teria mais condições de suportar o stress e mudanças do meio, como anteriormente, ou seja, perda da adaptabilidade fisiológica (MAKINODAN,1977); como somatória de mudanças que ocorrem com a passagem do tempo levando ao prejuízo funcional e morte (ROCKSTEIN & MIQUEL,1973; KENNEY,1989).

Embora seja normalmente aceito que o envelhecimento ocorra através de falhas em corrigir erros metabólicos, não há evidências de como estes erros ocorram (BELLAMY,1986).

De uma maneira geral, envelhecimento pode ser considerado como um processo irreversível, o qual se inicia, ou é acelerado, na maturidade, resultando em um aumento de número e/ou uma série de desvios do estado ideal e/ou decréscimo da razão de retorno ao estado ideal (GILCHREST,1984).

O aumento na idade é acompanhado de mudanças fisiológicas inevitáveis que representam o envelhecimento normal (GILCHREST,1984). Ao nível de células e órgãos, o envelhecimento é caracterizado pela perda ou redução na resposta à sinais intercelulares. Estas mudanças podem, em parte, estar relacionadas a alterações normais no estímulo da expressão gênica (CATANIA & FAIRWEATHER,1991). Evidências sugerem que o envelhecimento e morte celular sejam sequências programadas determinadas por genes específicos (MAKINODAN,1977; TAUCHI & SATO,1985; BELLAMY,1986; SMITH et al.,1987; KIRKWOOD,1989; KENNEY,1989; BOWEN & BOWEN,1990).

PRICE & MAKINODAN (1973, in: GILCHREST, 1984), BOJANOVIC et al. (1970), e MULLAART et al. (1990), sugerem que ligações covalentes progressivas entre proteínas (histonas e não histônicas) e DNA sejam responsáveis por algumas manifestações de envelhecimento. JEANNY (1976) mostrou haver um aumento do conteúdo de histonas com o envelhecimento, nas células cartilaginosas de anfíbios urodelos (*Triturus*). LENNOX (1984) indica diferenças com a idade (em mamíferos) na quantidade e no subtipo de H1 na cromatina, em função da atividade gênica diferenciada. RYAN & CRISTOFALO (1972) mostraram que a incorporação de acetato nas histonas muda significativamente com o envelhecimento.

Durante o envelhecimento, a cromatina torna-se progressivamente mais suscetível a quebras (CHETSANG et al., 1975), há modificações na ligação DNA-proteínas (MACIEIRA-COELHO, 1991), e alterações na síntese de histonas (DELL'ORCO & WORTHINGTON, 1988).

Vários eventos bioquímicos estão envolvidos na regulação da ligação DNA-proteínas (ADP-ribosilação, acetilação, metilação, fosforilação) (MACIEIRA-COELHO, 1991).

A habilidade de regular a estrutura cromatínica é consequentemente o maior componente da regulação transcricional. Transição entre diferentes estados de condensação cromatínica estão associados a substituição de histonas particulares por outras homólogas e com modificações covalentes destas proteínas (TRAVERS, 1993).

O'MEARA & HERRMANN (1972) sugeriram que com o envelhecimento ocorram mudanças qualitativas nas proteínas da cromatina (fígado de camundongo), que modificariam a estrutura desta, assim como sua habilidade de funcionar como modelo para a síntese de RNA.

A síntese de RNA pode ser inibida devido a danos no DNA, quer seja pela alteração na região codificadora ou alterações na configuração e conformação do DNA. Metilação, fator importante na atividade de certos genes, pode ser influenciada por danos e reparo do DNA. Estes danos também podem influenciar na expressão gênica pela interferência na interação DNA-proteínas (MULLAART et al., 1990).

As várias teorias sobre envelhecimento podem ser classificadas em duas linhas. Uma, ordenada, com eventos geneticamente programados, consequentes de diferenciação, crescimento e maturação (ROCKSTEIN & MIQUEL,1973; KANUNGO,1980); e outra, baseada em eventos ao acaso, resultado de acúmulo de erros ocasionais (ORGEL,1963; ROCKSTEIN & MIQUEL,1973).

O envelhecimento pode ter início ao nível transcricional (mutação, deleção de DNA, ligações cruzadas entre DNA e macromoléculas, etc.); ao nível traducional (alteração de RNA polimerases, tRNA, tRNA sintetases, etc.); ou ao nível pós-traducional (alterações ao acaso de macromoléculas vitais com turnover lento) (MAKINODAN,1977).

Em geral, uma célula envelhecida mostra no núcleo grumos cromatínicos, um aumento no número de nucléolos e invaginações ao nível do invólucro nuclear. Há também, uma redução do RER, concomitante com a diminuição da síntese proteica (TAUCHI & SATO,1985; KENNEY,1989), embora evidências de declínio na razão de síntese proteica com o envelhecimento não sejam assim tão claras (RATTAN,1991). Mudanças no número, nas cristas e tamanho das mitocôndrias têm sido relatadas, diferindo de tecido para tecido (TAUCHI & SATO,1985; KENNEY,1989). Fragmentos migrantes de DNA mitocondrial podem mudar o conteúdo de informação e nível de expressão de certos genes nucleares com a possibilidade de que a deleção de DNA mitocondrial e outras mutações, sejam eventos moleculares associados com o processo de envelhecimento (WEI,1992).

Típico de célula envelhecida é o aparecimento do complexo químico autofluorescente, o pigmento lipofuscina. Este aumenta progressivamente com o tempo, e provavelmente esteja contido em lisossomos com fragmentos membranosos degenerados (autofagia) (KNOOK,1985; KENNEY,1989).

Várias são as teorias tentando explicar o envelhecimento, baseadas em experimentos de cultura de células (BITTLES & SAMBUY,1986), como:

A)Teoria da replicação do DNA

Durante a replicação do DNA ocorreriam erros ao acaso, embora com baixa frequência. Esta teoria afirma que o envelhecimento seja resultado de um acúmulo gradual destes erros, com eventual morte funcional e/ou reprodutiva de células individuais (GENSLER & BERNSTEIN,1981; GILCHREST, 1984).

B) Teoria do erro (ORGEL, 1963)

Sequências de genes são repetidas muitas vezes ao longo da molécula de DNA, sendo que apenas 1% da informação é utilizada pela célula. Quando um erro ocorre na síntese gênica, há um número de cópias corretas para corrigi-lo (GENSLER & BERNSTEIN, 1981). Com o envelhecimento da célula o suprimento de genes redundantes seria esgotado, podendo então deixar erros livres para serem expressados (KENNEY, 1989). Acredita-se que ocorram milhares de lesões no DNA por dia (TICE & SETLOW, 1985). Quando um erro ocorre, o segmento danificado pode ser substituído enzimaticamente (FRIEDBERG, 1985). O reparo do DNA é dependente do: 1) sítio do erro, 2) do sistema enzimático específico de reparo, e 3) do acesso desse sistema ao sítio do erro. O sistema de reparo do DNA não é 100% eficiente, permitindo assim, que parte dos danos no DNA permaneça e se acumule (MULLAART et al., 1990). Esta capacidade de reparar erros diminui com a idade (GENSLER & BERNSTEIN, 1981; MODAK et al., 1986; SLAGBOOM et al., 1991; WEIRICH-SCHWAIGER et al., 1994).

Erros infrequentes durante a transcrição do DNA poderiam produzir RNAs imperfeitos, os quais codificariam muitas enzimas defeituosas (além de outras proteínas). A perda progressiva de células funcionais poderia eventualmente induzir envelhecimento e morte do organismo (ORGEL, 1963; KENNEY, 1989).

C) Teoria do soma descartável

Foi proposta por KIRKWOOD (1977) para prover suporte evolutivo para a teoria do erro. Posteriormente a teoria sugeriu que o envelhecimento fosse devido ao acúmulo de defeitos somáticos resultante do investimento insuficiente em uma cadeia ampla de processos na manutenção e reparo, incluindo revisão da síntese de macromoléculas, reparo do DNA, renovação proteica, detoxicação, renovação celular e regeneração. Segundo esta teoria, não haveria vantagens em se investir na imortalidade somática, que não é obtida na prática, uma vez que nenhuma espécie está imune a mortes puramente casuais, ocorridas no meio ambiente. Os investimentos estariam relacionados ao nível de mortalidade ambiental, sendo preferível o investimento energético no soma durante o período de expectativa de vida, utilizando os demais recursos para aumentar a reprodução (KIRKWOOD, 1990).

D)Teoria dos radicais livres

Esta teoria propõe os radicais livres como agentes centrais nas alterações teciduais, celulares e subcelulares ocorridas durante o envelhecimento. Radicais livres são intermediários químicos que contém um elétron não pareado, sendo altamente reativos e causando o envelhecimento devido a danos progressivos nas membranas, ligação cruzada em proteínas, inativação enzimática, e produção do "pigmento do envelhecimento" (HARMAN,1981; KENNEY, 1989). Uma das reações mais adversas dos radicais livres é a peroxidação de lipídios, com efeito nas membranas biológicas. Esta reação leva à formação de aldeído malônico, o qual reage com proteínas produzindo ligações cruzadas com e entre moléculas (KANUNGO,1980; SOHAL & McARTHUR, 1985; KENNEY,1989).

Várias enzimas produzem radicais livres como subprodutos. Os vários tipos de radicais formados podem reagir com muitos componentes celulares, inclusive DNA (MULLART et al.,1990). Radicais danificam o DNA extenuando gradualmente a capacidade de reparo destas células (WEIRICH-SCHWAIGER et al.,1994).

Radicaís superóxido ou hidroxila são gerados pela respiração mitocondrial, pela auto-oxidação de numerosas macromoléculas intracelulares, e pela ação de certos agentes ambientais (UV por exemplo). As enzimas superóxido dismutase e glutathion peroxidase, assim como compostos com grupamento tiol são defesas contra os danos causados pelos radicais livres. Em ratos, estas enzimas perdem atividade com o aumento da idade (KANUNGO,1980; GILCHREST,1984).

E)Teoria da ligação cruzada

BJORKSTEIN (1971, in: GILCHREST,1984) acredita que o envelhecimento seja resultado de ligações cruzadas de proteínas intra e extracelulares. PRICE & MAKINODAN (1973, in:GILCHREST,1984) sugerem que ligações covalentes progressivas entre histonas e DNA sejam responsáveis por algumas manifestações de envelhecimento.

F)Teoria regulatória ou endócrina

Nesta teoria, o envelhecimento seria controlado por um órgão regulador, através da elaboração, ou sua interrupção, de um hormônio que influenciaria o comportamento das células do organismo (GILCHREST,1984).

Todas as teorias acima mencionadas podem se somar na explicação do processo de envelhecimento. Porém, os danos causados ao material genético são tidos como os principais causadores do mesmo (GENSLER & BERNSTEIN,1981; SLAGBOOM & VIJG, 1992; WEIRICH-SCHWAIGER et al.,1994). Assim, GENSLER & BERNSTEIN (1981), propuseram que os fatores básicos que determinam diretamente o tempo máximo de vida dos indivíduos em uma população são: o grau de ocorrência de danos endógenos ao DNA, eficiência de reparo, o grau de redundância celular, e a extensão do stress fisiológico. Lesões no DNA podem ser causadas por compostos químicos e radiação, fatores extrínsecos, ou por processos intrínsecos (MULLAART et al.,1990). HART et al. (1979, in: GENSLER & BERNSTEIN,1981) sugerem que a forma mais relevante de danos no DNA, relacionadas ao envelhecimento, seja aquela causada por reações bioquímicas endógenas. LINDAHL (1977, in: GENSLER & BERNSTEIN,1981) afirma que as lesões espontâneas mais frequentes conhecidas são depurinação, depirimidização, e conversão de cistidina em uracil.

ENVELHECIMENTO EM INSETOS

Os insetos manifestam os processos de envelhecimento tal como vertebrados superiores, sendo excelentes agentes para estes estudos (ROCKSTEIN & MIQUEL, 1973; MOMENT,1982; SOHAL & McARTHUR, 1985; LAMB,1986). As alterações sobre o envelhecimento relatadas em insetos sugerem mudanças degenerativas na distribuição e estrutura de organelas celulares. A maior evidência do envelhecimento nos insetos é o acúmulo de grãos de lipofusцина (SOHAL & McARTHUR,1985). A temperatura tem grande influência na longevidade e envelhecimento de invertebrados (ARKING,1987).

O acúmulo de lipofusцина com a idade também é uma evidência morfológica consistente em diferentes tecidos (BASSON et al.,1982). Este acúmulo causa degeneração de estruturas citoplasmáticas, ou seja, redução da massa citoplasmática, redução no número de mitocôndrias e RER, simplificação do complexo de Golgi e vacuolização do citoplasma (TONNA,1973, in: KANUNGO,1980).

No hemíptero *Triatoma infestans* ocorre com o envelhecimento um decréscimo nos valores Feulgen-DNA de áreas de eucromatina, por perda de DNA e/ou alterações nos complexos DNA-proteína, o que comprometeria a resposta dessa cromatina à reação de Feulgen (MELLO & RAYMUNDO, 1977).

Como a informação biológica dos organismos está armazenada no material genético, modificações na estrutura e função do mesmo, podem resultar em mudanças ao nível do organismo (KANUNGO, 1980).

Admitida a participação das glândulas da espermateca de rainhas de *Apis* no processo de nutrição e ativação dos espermatozoides (VERMA, 1974), e consideradas as alterações no comportamento de postura de ovos fecundados nesse gênero em função do envelhecimento (LANGSTROTH et al., 1979; SHEHATA et al., 1981; SZABO et al., 1987; SZABO & HEIKEL, 1987), é de se esperar que ocorram alterações celulares em tais glândulas com o envelhecimento. Entre as alterações supostas, aquelas afetando diretamente o DNA ou o complexo deste com proteínas na cromatina, como acima mencionado, poderiam ser investigadas com métodos citoquímicos largamente recomendados para tal, como o estudo de basofilia nuclear com azul de toluidina em presença de competidores, e a reação de Feulgen (MELLO & RAYMUNDO, 1977; MELLO & VIDAL, 1978, 1980; VIDAL, 1987; VIDAL & MELLO, 1989).

BASOFILIA NUCLEAR E REAÇÃO DE FEULGEN

Grande parte dos estudos de basofilia nuclear destinados a levantar conhecimentos sobre os níveis de complexação DNA-proteína na cromatina, e mesmo estado de conformação do DNA e da cromatina, têm se baseado na utilização do Azul de Toluidina (AT) como corante catiônico (VIDAL, 1987).

O azul de Toluidina é um corante catiônico tiazínico planar, empregado na detecção de ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos ácidos e proteínas, dependendo do pH da solução. Além disso, é uma molécula com excelentes propriedades anisotrópicas, especialmente dicroísmo linear, o que a torna indicada para estudos de ordem molecular (VIDAL, 1972a e b, 79, 87).

De um modo geral, a basofilia é devida à ligação de um corante catiônico a moléculas aniônicas de um substrato. A basofilia nuclear é devida à

presença de grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA, quando se utilizam soluções de AT a pH 3.6-4.0 (LISON & MUTSAARS,1950; LISON,1960). A basofilia pode ser metacromática.

O fenômeno de metacromasia acha-se intimamente ligado ao grau de empilhamento e proximidade das moléculas de AT. Quanto mais próximas entre si, e maior for seu empilhamento, maior será a interação de seus elétrons π , conseqüentemente, sendo maior o deslocamento de seu máximo de absorção para comprimentos de onda mais curtos (efeito hipsocrômico), com hipocromismo no pico da região de λ longos (revisão in: MELLO,1976; VIDAL,1987; CHAYEN & BITENSKY, 1991).

Se a uma solução de corante catiônico forem adicionados cátions inorgânicos (Mg^{2+} , ou outro), ocorrerá competição entre estes últimos e o dipolo do corante de carga semelhante, pelas cargas negativas do substrato poli-aniônico. Numa certa concentração do cátion inorgânico, a coloração do substrato poderá ser abolida. Esta concentração é a CEC (concentração crítica de eletrólitos), sendo expressa em molaridade do sal utilizado (SCOTT,1960,73).

VIDAL & MELLO (1989) propuseram o princípio da CEC para estudos de cromatina, utilizando-se do corante AT e Mg^{2+} como cátion competidor. Neste caso, o valor de CEC foi considerado como sendo a concentração do sal utilizado (molaridade), na qual a metacromasia se torna totalmente abolida.

As moléculas do corante catiônico e os cátions inorgânicos competem pelas cargas negativas dos fosfatos livres do DNA não ligados à proteínas. Quando se utilizam soluções de AT na ausência de Mg^{2+} ou com concentrações de Mg^{2+} inferiores àquela requerida para o ponto de CEC, o DNA se cora em violeta (metacromasia). Com a utilização de uma concentração de Mg^{2+} correspondente ao valor de CEC, a metacromasia do DNA será totalmente abolida e a cor exibida será verde. Inicialmente tal determinação foi efetuada por método microespectrofotométrico, associando-se a cor encontrada ao pico de absorção da respectiva curva espectral de absorção (VIDAL & MELLO,1989). No entanto a determinação microespectrofotométrica pode ser substituída por observação visual, uma vez que a coloração verde corresponde ao ponto de CEC (MELLO & VIDAL,1989).

Já a reação de Feulgen, o método citoquímico mais amplamente utilizado, é específica para DNA (MELLO & VIDAL,1978; PEARSE,1985).

A reação de Feulgen envolve duas etapas : uma hidrólise ácida, e a seguir, uma exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff, um leucoderivado da fucsina básica. A hidrólise ácida remove do DNA preferencialmente purinas, deixando livre a função aldeídica dos açúcares desoxirribofuranose, aos quais se achavam ligadas, e produzindo um ácido apurínico. Os aldeídos assim livres poderão reagir com o reativo de Schiff, restaurando o grupo cromofórico da molécula leucoderivado da fucsina básica, tendo-se então, um produto corado (MELLO & VIDAL,1978; PEARSE,1985; CHAYEN & BITENSKY,1991).

Também as purinas do RNA são removidas pela hidrólise ácida, porém somente as desoxirriboses comportam-se como verdadeiros aldeídos, dando reação de Feulgen positiva (VISCHER e CHARGAFF,1948, in : MELLO & VIDAL,1978).

Para que o DNA de uma cromatina se torne acessível à depuração, há necessidade de que as ligações entre este composto e as proteínas a ele associadas sejam rompidas. Este passo também é realizado pela hidrólise ácida. No entanto, a disponibilidade das ligações entre DNA e proteínas ao ataque do ácido irá depender de fatores intrínsecos de cada complexo DNP em particular (composição proteica, conformação molecular do complexo, diferentes graus de enrolamento e condensação do filamento cromatínico) e que, poderão ser diferentemente afetados pelo tipos de cromatina considerados, seu estado funcional e composição química, e mesmo envelhecimento (AGRELL & BERGQVIST,1962; BACHMANN,1968; MITTERMAYER et al.,1971; KJELLSTRAND & ANDERSSON,1975 a/b; MELLO & RAYMUNDO,1977; MELLO & VIDAL,1978; MELLO,1978,79,1983; SILVA & MELLO,1986).

A cinética de hidrólise pode ser estudada *in situ* computando-se os valores Feulgen/DNA para diferentes tempos de hidrólise (AGRELL & BERGQVIST,1967; BACHMANN,1968; MITTERMAYER et al.,1971; MELLO & VIDAL,1978; MELLO,1979,83; SILVA & MELLO,1986).

OBJETIVO

Neste trabalho as glândulas da espermateca de rainhas de *Apis mellifera* foram estudadas com métodos citoquímicos, visando-se a possibilidade de alterações a nível de DNA e/ou complexos DNA-proteína pós-fecundação e com o envelhecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram utilizadas glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* africanizadas virgens, recém-fecundadas e envelhecidas (1,5 anos ou mais*). Foram feitas várias repetições dos diferentes preparados, inclusive utilizando-se rainhas com procedências diferentes (Ribeirão Preto, Rio Claro e Pindamonhangaba).

MÉTODOS

As abelhas foram dissecadas sob lupa, utilizando-se solução fisiológica (Ringer) para insetos: 0,75g de NaCl; 0,035g de KCl; 0,021g de CaCl_2 ; 100ml de H_2O destilada. As glândulas foram removidas juntamente com a espermateca e fixadas em etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1; V/V), por 2 minutos e à temperatura ambiente.

Parte do material fixado, destinado ao estudo da basofilia nuclear e CEC, foi incluído em parafina ou paraplast. Outra parte foi utilizada para reação de Feulgen em bloco, seguido de esmagamento, como descrito adiante.

PREPARO DOS BLOCOS : PARAFINA OU PARAPLAST

Após fixação, os materiais foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 95 e 100%), 15 min cada, diafanizados em xilol (2 banhos de 15 min cada), banhados 3 vezes em resina (paraplast-Monoject, ou parafina-Reagen), 15 min cada banho, à 58°C, e incluídos em resina. Os blocos foram seccionados em cortes de 7µm, utilizando-se micrótomo ANCAP.

DESPARAFINIZAÇÃO

Esta se realizou em 2 banhos de xilol por 20 min cada, um banho de álcool:xilol (1:1,v/v) por 15 min, e outro de metanol:clorofórmio (1:1,v/v) por 1h.

* Este dado foi obtido com apicultores, pesquisadores da área e em trabalhos (CAMARGO & MELLO,1972), que afirmaram ser esta a idade média de substituição, das rainhas nos apiários, devido à baixa produtividade das mesmas, levando-se em conta as devidas exceções.

HIDRATAÇÃO

A seguir os cortes foram tratados em banhos de etanol 100, 95, 80, 70% e H₂O, durante 15 min cada, e submetidos às reações citoquímicas planejadas.

BASOFILIA NUCLEAR E CEC (VIDAL & MELLO, 1989).

Cortes com 7µm de espessura, desparafinizados e hidratados, foram tratados com solução aquosa de RNase (SIGMA - AIII) a 0,1% por 1h15min a 37°C. A seguir foram corados por 20 min com AT (Merck) a 0,025% em tampão McIlvaine pH 4.0 adicionado de MgCl₂ (Merck) em diferentes concentrações (0,01; 0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15; 0,20M). Como controle foi utilizada coloração na ausência de MgCl₂.

Após os tratamentos, os preparados foram banhados em água corrente e secados ao ar à temperatura ambiente. A seguir, foram tratados por xilol durante 15 min e montados em Eukitte.

As observações foram feitas em microscópio Zeiss (Standard). Utilizou-se também fotomicroscópio Zeiss, para documentação fotográfica.

FEULGEN EM BLOCO, seguido de esmagamento

O material fixado por 2 min e conservado em álcool 70% foi submetido à hidrólise ácida com HCl 4N por 1h20min* à temperatura de 24°C, a qual foi rapidamente interrompida em HCl 0,1N frio, e a seguir, tratado por 40 min com reativo de Schiff, em condições de escuridão e à temperatura ambiente. A seguir, o material foi lavado 5 vezes em água sulfurosa (5 min cada), uma vez em água destilada e esmagado delicadamente em solução aquosa de ácido acético a 45%. Foram usadas lamínulas siliconizadas. A remoção das lamínulas se deu após congelamento do material em N₂ líquido. Quando atingida a temperatura ambiente, os esmagamentos foram tratados com um banho rápido em etanol a 100%, banhados em xilol por 15 min, e montados em bálsamo do Canadá. Os preparados corados foram mantidos protegidos da luz.

* Este tempo de hidrólise foi escolhido, após testes apropriados, como permitindo máxima depuração, e estando no platô da cinética de hidrólise.

Estes mesmos passos foram realizados para espermatozóides obtidos do interior da espermateca de rainhas recém-fecundadas e utilizados como controle de conteúdo (C) de DNA (núcleos haplóides).

MICROESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA

Valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias foram determinados com um microespectrofotômetro de varredura automática Zeiss, acoplado a um PC Sid. O software do programa e o hardware da interface foram desenvolvidos pelo engenheiro Linus Vidal. As condições operacionais foram as seguintes: objetiva 100/1.25 Planapo; optovar 2; diafragma de medida com $\varnothing$ 0.10mm; diafragma de campo com $\varnothing$ 0.20mm; condensador LD-Epiplan 16/0.30; fotomultiplicador R-928; tamanho do spot de varredura: 0,5 x 0,5 μ m; λ = 565nm, obtido com filtro monocromador Schott. Pontos com absorbância $\leq$ 0.020 foram considerados background e eliminados da imagem nuclear.

Os valores Feulgen-DNA obtidos foram distribuídos em histogramas de frequência cujos intervalos de classe foram obtidos numa escala de valores em progressão geométrica com razão igual a 2. Cada classe foi subdividida em 5 valores (FERREIRA et al.,1967, in: MELLO & RAYMUNDO,1977). Os valores destas classes foram determinados em relação ao controle C de conteúdo de DNA dos espermatozóides.

RESULTADOS

BASOFILIA NUCLEAR E CEC

Os resultados obtidos estão expressos na forma de Tabelas e Figuras.

As Tabelas 1 e 2 sumarizam as respostas de basofilia nuclear e valores de CEC para as glândulas da espermateca de rainhas virgens, recém-fecundadas e envelhecidas. A Figura 1 mostra preparados utilizados para estudo de CEC em glândulas da espermateca de rainhas recém-fecundadas.

Não foram constatadas diferenças nas respostas à CEC entre núcleos da camada íntima e epitélio glandular, na mesma glândula. Sendo assim, serão tratados genericamente como núcleos da glândula da espermateca, sendo discriminados somente quando conveniente.

Foi interessante observar que os valores de CEC para os espermatozóides contidos no interior das espermatecas, nos mesmos preparados utilizados para o estudo das glândulas da espermateca, apresentaram diferenças (TABELA 3).

TABELA 1 - Respostas de basofilia nuclear dos núcleos das glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* tratados com AT a 0,025% em Tampão McIlvaine a pH 4.0, adicionado de $MgCl_2$.

COLORAÇÕES		Rainhas virgens	Rainhas recém-fecundadas	Rainhas "velhas"
AT sem $MgCl_2$	I	violeta	violeta	violeta
	E	violeta	violeta	violeta
AT + $MgCl_2$ 0,01M	I	azulado	violeta	azul
	E	azulado	violeta	azul
AT + $MgCl_2$ 0,02M	I	azulado	violeta	<i>verde</i>
	E	azulado	violeta	<i>verde</i>
AT + $MgCl_2$ 0,05M	I	<i>verde</i>	violeta/azul	verde
	E	<i>verde</i>	violeta/azul	verde
AT + $MgCl_2$ 0,08M	I	azul/verde	<i>verde</i>	verde
	E	azul/verde	<i>verde</i>	verde
AT + $MgCl_2$ 0,10M	I	violeta	azul/violeta	azul
	E	violeta	azul/violeta	azul
AT + $MgCl_2$ 0,12M	I	azulado	azul/verde	violeta
	E	azulado	azul/verde	violeta
AT + $MgCl_2$ 0,15M	I	*	azul/verde	*
	E	*	azul/verde	*
AT + $MgCl_2$ 0,20M	I	*	violeta	*
	E	*	violeta	*

I - núcleos da camada íntima

E - núcleos do epitélio glandular

* - não observado.

TABELA 2 - Valores de CEC (em molaridade de MgCl_2) dos núcleos da glândula da espermateca de rainhas *Apis mellifera* coradas com AT adicionado de Mg^{2+} .

Condição das rainhas	Valor de CEC
Virgens	$\leq 0,05 \text{ M}$
Recém-fecundadas	$\leq 0,08 \text{ M}$
"Velhas"	$\leq 0,02 \text{ M}$

TABELA 3. Comparação entre valores de CEC (em molaridade de MgCl_2) dos núcleos das glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* recém-fecundadas e envelhecidas, e dos núcleos dos espermatozóides contidos no interior da espermateca das mesmas, corados com AT 0,025% à pH 4.0 adicionado de MgCl_2 .

	VALORES DE CEC	
	Núcleos das glândulas	Núcleos dos espermatozóides
RAINHAS		
Recém-fecundadas	$\leq 0,08 \text{ M}$	$\leq 0,12 \text{ M}$
"velha"	$\leq 0,02 \text{ M}$	$\leq 0,10 \text{ M}$

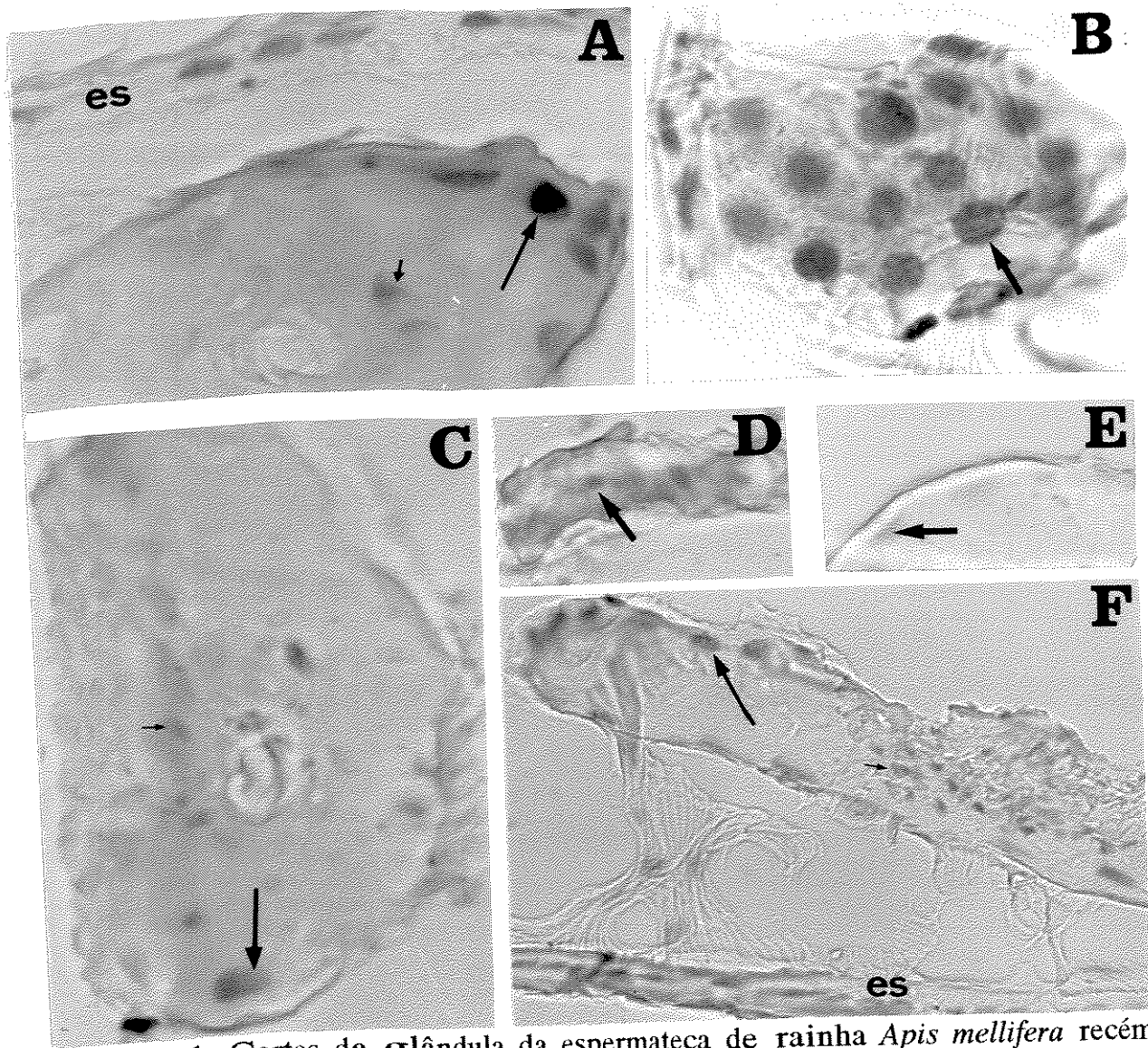


FIGURA 1. Cortes da glândula da espermateca de rainha *Apis mellifera* recém-fecundada.

A) AT pH 4.0 - **controle**. Notar núcleos do epitélio glandular (**seta maior**) e da camada íntima (**seta menor**) corados metacromaticamente. x 860.

B) AT + MgCl_2 **0,01M**. Notar núcleos do epitélio glandular (**seta**) corados metacromaticamente. x 860.

C) AT + MgCl_2 **0,05M**. Notar núcleos do epitélio glandular (**seta maior**) e da camada íntima (**seta menor**) corados em azul (proximidade ao valor de CEC). x 1075.

D) AT + MgCl_2 **0,08M**. Notar núcleos do epitélio da espermateca corados em verde (CEC). x 860.

E) AT + MgCl_2 **0,08M**. Notar núcleos do epitélio glandular corados em verde (CEC). x 860.

F) AT + MgCl_2 **0,20M**. Notar núcleos do epitélio glandular (**seta maior**) e da camada íntima (**seta menor**) corados em violeta (retorno da metacromasia). x 540.

es : epitélio da espermateca.

CONTEÚDO FEULGEN-DNA

A Figura 2, mostra a resposta à reação de Feulgen dos núcleos da glândula da espermateca de rainhas recém-fecundadas.

Os valores Feulgen-DNA para as glândulas nas diferentes condições, avaliados microespectrofotometricamente, foram distribuídos na escala em progressão geométrica ao lado de valores para espermatozóides (controle C) (FIGURA 3 e TABELA 4).

Os dados aqui referidos demonstram a ocorrência de poliploidia, tanto para núcleos do epitélio glandular como para os núcleos da camada íntima, sendo os valores de ploidia mais elevados encontrados nos núcleos do epitélio glandular. Encontrou-se núcleos da íntima com conteúdo de DNA até 16C, embora a maior frequência de núcleos seja aí demonstrada como pertencente a classe 4C. No epitélio glandular, a maior frequência de núcleos exibiu um conteúdo Feulgen-DNA 64C, embora fossem encontrados alguns núcleos 128C (FIGURA 3 e TABELA 4).

Considerando-se a classe de ploidia mais freqüente para as rainhas nas várias etapas de vida aqui analisadas (rainhas virgens, recém-fecundadas e envelhecidas), não se encontrou diferença para os núcleos da íntima (classe 4C), nem para os núcleos do epitélio glandular (classe 64C) (FIGURA 3 e TABELA 4).

No entanto, foram encontradas algumas diferenças no perfil dos valores Feulgen-DNA distribuídos em subclasses para cada uma das classes descritas, em função da fase de vida considerada (FIGURAS 4 e 5). Ou seja, embora a maior frequência de núcleos para as rainhas nas várias etapas de vida, esteja na mesma classe (4C para íntima e 64C para epitélio), as respostas Feulgen DNA, dentro de cada classe, são levemente diferentes, sendo para a camada íntima, valores ligeiramente deslocados para a direita (rainhas recém-fecundadas), ou esquerda (rainhas velhas), em relação aos valores das rainhas virgens (FIGURA 4), e para o epitélio glandular, valores deslocados para a esquerda (rainhas recém-fecundadas e velhas) em relação aos valores das rainhas virgens (FIGURA 5).

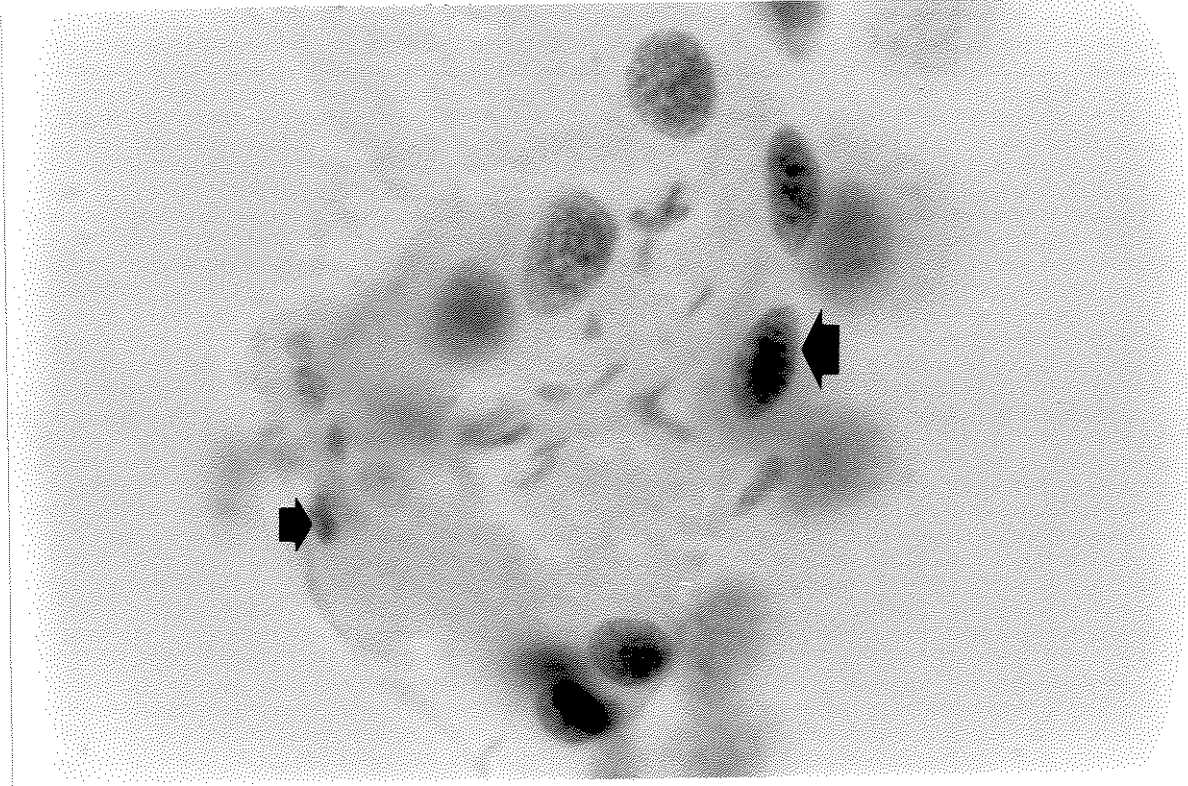


FIGURA 2. Núcleos da camada íntima (**seta menor**) e do epitélio glandular (**seta maior**) das glândulas da espermateca de rainha *Apis mellifera* recém-fecundada submetidas a reação de Feulgen. As diferentes profundidades de foco se devem ao tipo de preparado, adequado a não esmagar núcleos a ponto de rompê-los. x1075.

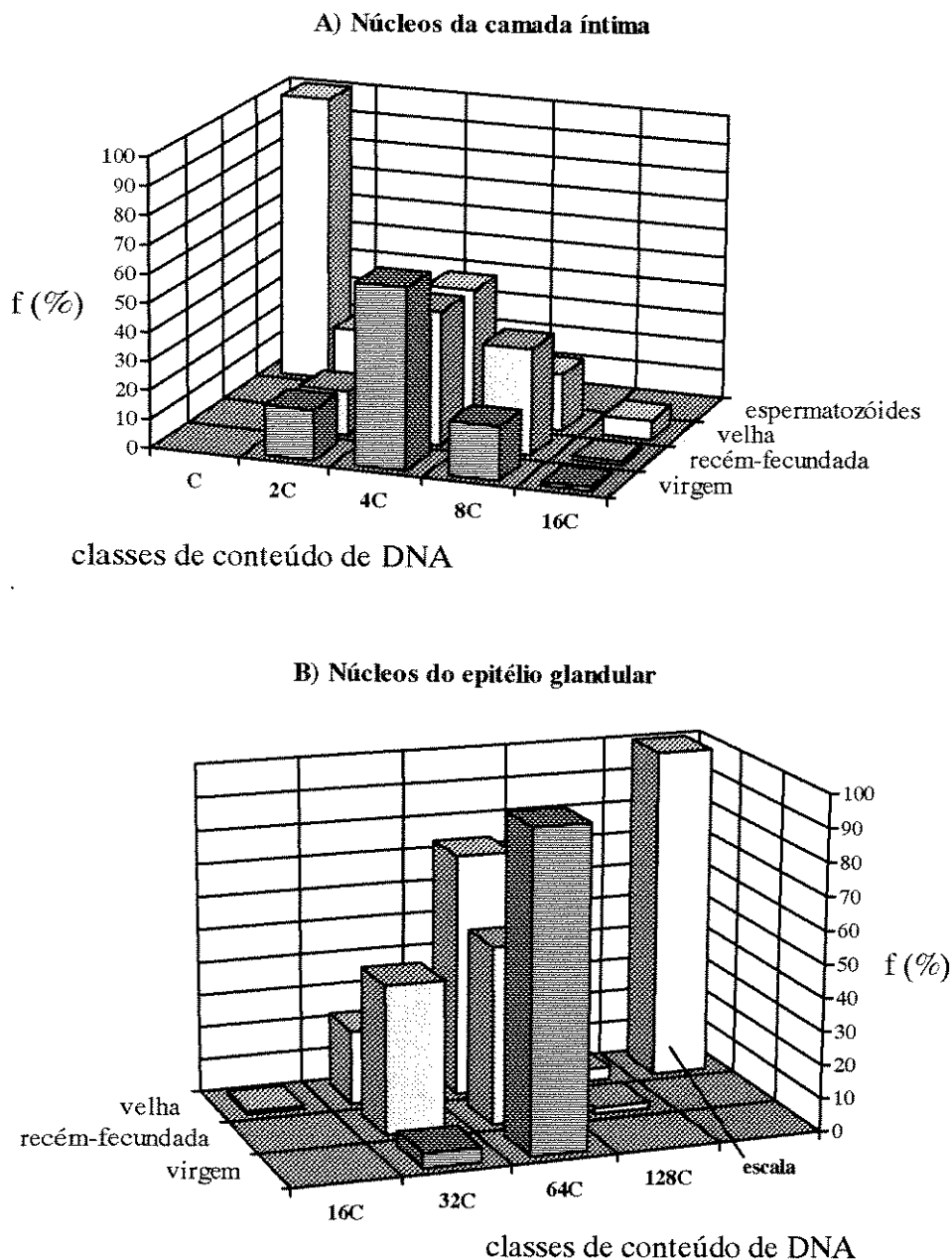


FIGURA 3. Histogramas de frequência relativa dos valores Feulgen-DNA dos núcleos da camada íntima (A), e do epitélio glandular (B) das glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* **virgens, recém-fecundadas e velhas** ($n_A = 75, 71$ e 61 ; $n_B = 91, 103$ e 108 medidas, respectivamente). O intervalo de classes foi definido a partir dos valores Feulgen-DNA de espermatozoides (controle C de conteúdo de DNA).

TABELA 4 - Frequência relativa de núcleos das glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* virgens, recém-fecundadas e velhas, distribuídos em relação às respectivas classes de conteúdo Feulgen-DNA.

CLASSES DE CONTEÚDO DE DNA	Frequência relativa (%)						ESPERMATO- ZÓIDES
	RAINHAS VIRGENS		RAINHAS RECÉM- FECUNDADAS		RAINHAS VELHAS		
	I	E	I	E	I	E	
C							100
2C	17,34		15,49		27,87		
4C	62,67		46,48		45,90		
8C	18,67		36,62		19,67		
16C	01,32		01,41		06,56	00,93	
32C		04,40		44,66		22,23	
64C		95,60		53,40		73,14	
128C				01,94		03,70	
núcleos medidos	75	91	71	103	61	108	60

I : núcleos da camada íntima

E : núcleos do epitélio glandular

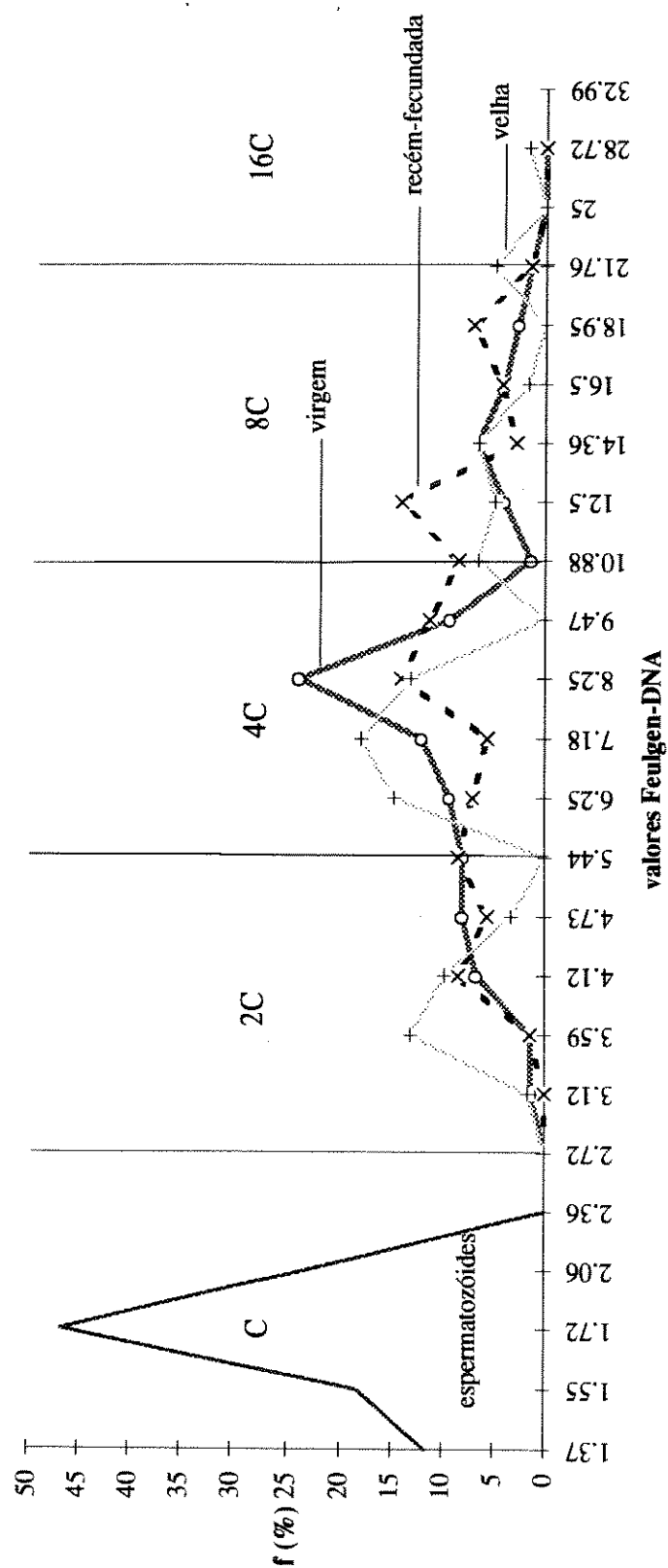


FIGURA 4. Frequência relativa dos núcleos da **camada íntima** das glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* distribuídos nas subclasses de conteúdo de DNA.

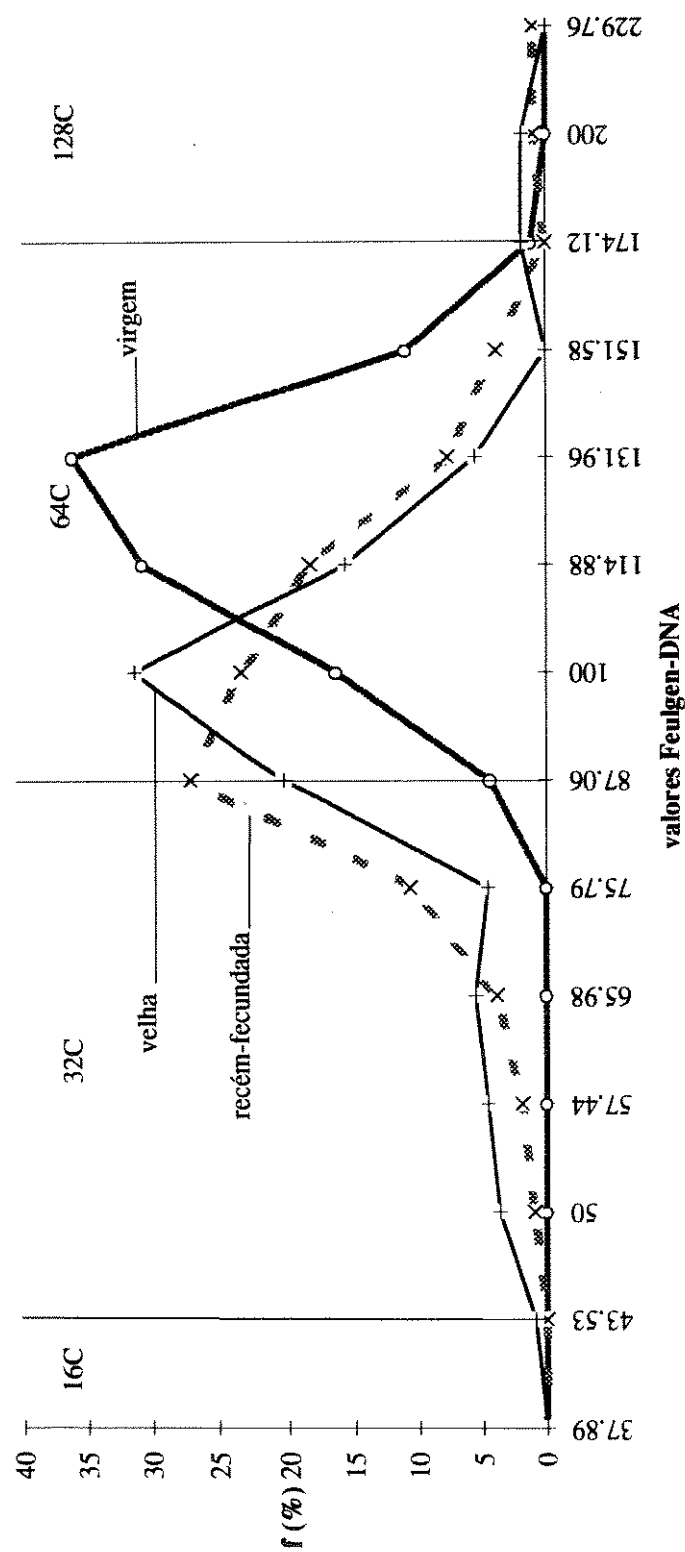


FIGURA 5. Frequência relativa dos núcleos do **epitélio glandular** das glândulas da espermateca de rainhas *Apis mellifera* distribuídos nas subclasses de conteúdo de DNA.

DISCUSSÃO

BASOFILIA NUCLEAR E CEC

Os resultados mostram haver diferenças nos complexos DNA-proteínas na cromatina dos núcleos da glândula da espermateca, após o processo de fecundação e após o envelhecimento.

As respostas de CEC aqui encontradas são exclusivamente devidas ao DNA, uma vez que o material foi tratado previamente com RNase.

As características de basofilia da cromatina corada com AT estão intimamente associadas com o nível de empilhamento e proximidade das moléculas corantes ligadas ao substrato (fosfatos livres do DNA) (MIURA & OHBA, 1967; MELLO, 1980). Quanto maior for a proximidade e o empilhamento destas, maior será a metacromasia (VIDAL, 1987; CHAYEN & BITENSKY, 1991).

Nos resultados de CEC, as moléculas de AT e os cátions inorgânicos competem pelas cargas negativas dos fosfatos do DNA disponíveis à ligação (não ligados a proteínas). O número e proximidade destes grupamentos têm então, influência nas respostas de CEC (VIDAL & MELLO, 1989). Íons Mg^{2+} bloqueiam fosfatos livres do DNA e RNA (VIDAL, 1979).

Os núcleos da camada íntima e do epitélio glandular respondem semelhantemente à CEC nas três condições em estudo (rainhas virgens, recém-fecundadas e envelhecidas), provavelmente devido ao fato que a íntima se origine deste epitélio (CAMARGO & MELLO, 1970). Esses devem, portanto, conter tipos de complexos DNA-proteínas semelhantes, respondendo igualmente à CEC, muito embora o grau de ploidia seja diferente. Uma vez que ambos tipos de núcleos têm valores de CEC igualmente alterados após a fecundação, é possível que, de alguma forma, as células da camada íntima estejam relacionadas a mesma atividade funcional das células do epitélio (hipótese de KAPIL, 1958, 62, in: CAMARGO & MELLO, 1970), o que poderia se refletir na resposta à CEC semelhante.

CAMARGO & MELLO (1970) afirmaram que núcleos da íntima (picnóticos e em processo de degeneração) não teriam papel ativo na secreção instalada em rainhas fecundadas. A sua função estaria relacionada ao

desenvolvimento dos canalículos coletores, como descrito em glândulas mandibulares de *Melipona* (CRUZ-LANDIM & MELLO,1967).

As diferentes respostas de CEC nas glândulas da espermateca ao longo das fases de vida das rainhas, refletem diferenças na estrutura e composição de sua cromatina, provavelmente devido à diferenças na disponibilidade de grupos fosfatos livres (não ligados a proteínas) do DNA, e no estado de condensação dos complexos DNA-proteínas (AMARAL,1988; AMARAL & MELLO,1989; MELLO & VIDAL,1989; VIDAL & MELLO,1989; MONTEIRO,1993; RANDI & MELLO,1994). Possivelmente se relacionem a diferenças na expressão gênica, associadas ao fenômeno de secreção instalado nas glândulas com a fecundação.

O maior valor de CEC foi encontrado na cromatina dos núcleos das glândulas de rainhas recém-fecundadas ($\leq 0,08M$), sendo o menor valor encontrado nas rainhas envelhecidas ($\leq 0,02M$), e valor intermediário nas rainhas virgens ($\leq 0,05 M$).

Estes valores mostram haver maior disponibilidade de grupamentos fosfatos não ligados a proteínas nas rainhas recém-fecundadas, onde pode-se pensar que, com a penetração dos espermatozóides no interior da espermateca, e o início da secreção, a expressão gênica dos núcleos da glândula da espermateca possa se tornar mais intensa do que naqueles das rainhas virgens e das envelhecidas, visto o desencadeamento de suas funções secretoras (CAMARGO & MELLO,1970; CAMARGO,1972; VERMA,1974).

Rainhas envelhecidas (1,5 ano) têm o número de espermatozóides reduzido, devido à sua utilização na produção de ovos. Poderia se pensar que, nesta idade, a atividade gênica dos núcleos desta glândula pudesse ser menor, quer seja em reflexo a esta diminuição do número de espermatozóides, ou mesmo pela perda de funcionabilidade em razão do envelhecimento.

RYAN & CRISTOFALO (1975) sugerem haver redução, relacionada à idade, na atividade transcricional da cromatina de células em cultura, podendo representar mudanças na atividade gênica durante o envelhecimento *in vitro*.

Perda na expressão gênica pode envolver mudanças na metilação do DNA, e estrutura da cromatina (HORNSBY et al., 1991). O número de citosina metilada diminui durante o envelhecimento (WILSON & JONES,1983, in:

KIRKWOOD,1989; CATANIA & FAIRWEATHER,1991). Alterações na expressão gênica podem ser devidas a graus menores de demetilação, que ocorrem com o envelhecimento normal (SWISSELM et al.,1990; CATANIA & FAIRWEATHER, 1991).

Alterações no padrão de metilação do DNA com o envelhecimento, associadas ou não ao controle gênico, poderiam contribuir para os valores de CEC menores encontrados nas glândulas envelhecidas, uma vez que esta metilação está associada à interações DNA-proteínas específicas (MOLLOY & WATT,1990), e a alterações na conformação e estrutura do DNA e da cromatina (RIGGS,1990).

Deve-se lembrar, no entanto, que nem todos os genes estão sob controle associado à metilação (CATANIA & FAIRWEATHER,1991). A inativação gênica, em alguns casos, é devida a ligação de determinadas proteínas ao DNA, histonas e proteínas da matriz nuclear (ZLATANOVA,1990; DANEHOLT & GROSSBACH, 1990; ROTH & ALLIS,1992; FELSENFELD,1992; LEE et al.,1993; LEVINE et al.,1993; TORDERA et al.,1993; ALBERTS et al.,1994), o que poderia refletir em uma menor disponibilidade de grupamentos fosfatos disponíveis. Tal ligação, com consequente diminuição na disponibilidade de grupamentos fosfatos livres do DNA, e portanto, menor valor de CEC, poderia ser resultado do processo de envelhecimento, seja ele programado (inativação gênica programada), ou casual, devido à perda da habilidade na regulação da estrutura cromatínica.

Danos ao DNA, assim como alterações nas reações bioquímicas envolvidas no controle das interações DNA-proteínas, também poderiam ser os responsáveis pelo menor valor de CEC encontrado para as rainhas envelhecidas. Um acúmulo de alterações no DNA relacionadas à idade podem ocorrer ao nível da estrutura química, organização da sequência do DNA e expressão gênica (MULLAART et al.,1990). Em culturas de fibroblastos, por exemplo, há diminuição de H1, e aumento das proteínas restantes com o envelhecimento (MITSUI et al.,1980). A inativação gênica não está também exclusivamente associada ao empacotamento cromatínico. Há casos onde a ligação de determinada proteína ao DNA favorece a formação de um complexo proteico, que dependendo da natureza, reprime ou ativa certo gene, sendo a estrutura da cromatina na região reguladora independente da atividade de transcrição. (TRAVERS,1993).

O retorno da metacromasia nuclear, observado nas colorações com soluções de azul de toluidina em que a concentração de cátions inorgânicos foi acima daquela requerida para a CEC, é causado pela concentração salina elevada, que causa extração de histonas, liberando sítios de ligação ao corante (MIURA & OHBA,1967; PIMENTEL,1983; MELLO & VIDAL,1989). Nas três situações em estudo, o retorno da metacromasia nuclear foi obtido em concentrações diferentes, o que sem dúvida reforça os próprios dados de CEC, evidenciando modificações na estrutura cromatínica quando se comparam núcleos das glândulas de rainhas virgens, recém-fecundadas e envelhecidas, quer seja em resultado de diferenças na estrutura cromatínica, e/ou por tipo e/ou número de proteínas diferentes.

A alteração da estrutura cromatínica com o envelhecimento neste material parece ser acompanhada por alterações de funcionabilidade nucleolar, conforme demonstram ensaios em andamento neste laboratório, quando se evidenciou diminuição de corpos AgNOR positivos segundo técnica descrita por VIDAL et al. (1994), e do número de nucléolos (detectados pela variante de CEC para evidenciação de nucléolos -MELLO et al.,1993).

BASOFILIA E CEC NOS ESPERMATOZÓIDES DE *Apis*

Em espermatozóides de *Apis mellifera* corados com soluções de AT, as moléculas de corante se dispõem segundo ordenamento molecular helicoidal em torno da molécula de DNA (MELLO & VIDAL,1977), o que é uma situação bastante particular, quando se consideram espermatozóides de diferentes espécies.

Em um grande número de espécies, durante a espermatogênese, ocorre substituição das proteínas básicas nucleares somáticas por proteínas básicas ricas em arginina, ou tipo protaminas (BLOCH,1969; DuPRAW,1970). Nestes complexos DNA-proteína, a basofilia difere daquela de células somáticas (LISON,1960; GLEDHILL,1966; MELLO & VIDAL,1977; MELLO,1982), devido a protaminas e histonas ricas em arginina possuírem uma grande afinidade pelo DNA (DuPRAW,1969), ocasionando um grande comprometimento dos seus grupamentos fosfatos, de tal forma que quando estes complexos são tratados com AT a pH 4.0,

coram-se em azul-esverdeado (MELLO & VIDAL,1973,77; MELLO,1982), sendo então impraticável a pesquisa de CEC em tais casos.

No caso de espermatozóides de *Apis mellifera*, onde não ocorre a substituição de histonas somáticas por proteínas do tipo protamina, e sim uma proteína básica não usual, rica em lisina (BLOCH,1969; VERMA,1972), os núcleos se coram em violeta quando tratados com AT a pH 4.0 (MELLO,1973), à semelhança das células somáticas. No entanto, os valores de CEC para estes espermatozóides foram muito mais elevados do que os das células somáticas aqui estudadas. Observou-se também que, ao mesmo tempo em que os espermatozóides atingiram o valor de CEC, sofreram alterações nas suas cores de interferência de birrefringência nuclear. Esta birrefringência, em condições de coloração com AT sem adição de Mg^{2+} , se deve à orientação das moléculas de DNA, mais a orientação das moléculas corantes acompanhando a distribuição helicoidal dos fosfatos do DNA. Quando é atingido o valor de CEC, uma vez que os fosfatos não ligados à proteínas ligaram-se a íons Mg^{2+} , a birrefringência constatada é unicamente devida a orientação das moléculas de DNA (orientação das bases) (WHITE E ELMES,1952; MELLO,1982).

Foi possível observar um abaixamento no valor de CEC dos núcleos dos espermatozóides envelhecidos (armazenados no interior da espermateca de rainhas velhas), quando comparados àqueles armazenados no interior da espermateca de rainhas recém-fecundadas. Estas diferenças sugerem alterações nos complexos DNA-proteínas dos espermatozóides com o envelhecimento, o que poderia ser devido a alterações que afetem a própria espermateca, ou se relacionem aos próprios espermatozóides em si, ou a ambos.

As alterações em valores de CEC nos espermatozóides sugerem um relativo aumento na compactação dos complexos DNA-proteína com o envelhecimento. Esta hipótese tem por embasamento experimentos com complexos DNA-proteína *in vitro*, onde complexos DNA-protamina apresentam valores de CEC menores em relação ao DNA não complexado (VIDAL & MELLO,1989) e diferentes tipos celulares *in situ* (MELLO & VIDAL,1973,89; AMARAL & MELLO,1989; MONTEIRO,1993).

CONTEÚDO FEULGEN-DNA

Os resultados mostram haver poliploidização nos núcleos da camada íntima (até 16C) e do epitélio glandular (até 128C) das glândulas da espermateca de rainhas de *Apis mellifera*. A classe de conteúdo de DNA mais freqüente (4C e 64C, respectivamente), permanece inalterada com a fecundação e o envelhecimento.

Poliploidização em vários tipos celulares têm sido relatadas em abelhas ao longo do desenvolvimento pós-embriônico (MELLO et al.,1970; MELLO & TAKAHASHI,1971). Em tecidos glandulares, a poliploidização têm sido relacionada à necessidade de alta atividade de síntese proteica (MELLO,1970; MELLO et al.,1970; MELLO & VIDAL,1971; SILVA DE MORAES & CRUZ-LANDIM,1983).

Não foram encontrados núcleos do epitélio glandular 128C em rainhas virgens, embora estes tenham sido evidenciados em rainhas recém-fecundadas e com maior freqüência nas velhas. Também na camada íntima, a classe de maior conteúdo de DNA (16C), foi somente encontrada nas rainhas velhas. Pode-se então pensar, que a poliploidização aumente com a idade desses indivíduos adultos, ou esses valores mais elevados sejam devidos à análise de amostras de insetos com maior tamanho (WOYKE,1971).

Foram detectadas variações nas porcentagens relativas de cada classe de conteúdo de DNA entre as três situações em estudo. Entretanto, as maiores freqüências, tanto para núcleos da camada íntima como do epitélio glandular são encontradas nas mesmas classes de conteúdo de DNA. Porém, dentro de cada classe, nas subclasses, os padrões de distribuição dos valores diferiram.

Núcleos com o mesmo conteúdo de DNA poderão apresentar diferentes respostas à reação de Feulgen para mesmos tempos de hidrólise, em função dos tipos de complexos nucleoproteicos formados, os quais irão permitir a existência de diferentes graus de enrolamento e condensação do filamento cromatínico (GLEDHILL,1966; MELLO,1978).

Respostas diferentes à reação de Feulgen são esperadas para complexos DNA-proteína diferentes. A cinética de hidrólise *in situ* depende das

interações DNA-proteína (MELLO,1979; SILVA e MELLO,1986; MELLO et al.,1976,86).

No envelhecimento de células cartilaginosas de anfíbios urodelos (*Triturus*) a colorabilidade do DNA pela reação de Feulgen diminui com a idade, dado que a sua hidrólise ácida torna-se mais difícil. Diferenças na sensibilidade do DNA à hidrólise supõem uma modificação da estrutura da cromatina e/ou a modificação de seus constituintes químicos (JEANNY,1976). A resistência à hidrólise ácida pode diminuir em função de mudanças nos complexos DNP, aumentando a quebra do ácido apurínico formado, promovendo a diminuição da coloração de Feulgen (MELLO & RAYMUNDO,1977).

Alterações no padrão de extração (causada pela hidrólise ácida) são devidas a alterações na interação entre proteínas e DNA. Assim, graus diferentes de condensação do complexo DNA-proteína podem ter resultados diferentes na resposta à reação de Feulgen (ANDERSSON & KJELLSTRAND,1975). MELLO (1978) mostrou haver diferenças na resposta à reação de Feulgen entre hetero- e eucromatina.

As diferenças tintoriais do DNA na reação de Feulgen podem ser explicadas pelas modificações da organização dos complexos DNA-proteínas (JEANNY,1976).

CONCLUSÕES

1) A cromatina dos núcleos das glândulas da espermateca de rainhas de *Apis mellifera* (epitélio secretor e íntima) sofre alterações com o processo de fecundação e o envelhecimento.

2) A cromatina dos núcleos das glândulas de rainhas recém-fecundadas possui maior disponibilidade de grupamentos fosfatos livres do DNA (não ligados a proteínas) que rainhas virgens e velhas, em condições de competitividade azul de toluidina-íons Mg^{2+} pelos sítios de ligação (concentração crítica de eletrólitos), o que pode indicar uma conformação cromatínica mais frouxa nas glândulas da espermateca de rainhas recém-fecundadas, adequada a atividade transcricional (possivelmente elevada) destas células.

3) Os padrões de concentração crítica de eletrólitos foram os mesmos para os núcleos do epitélio secretor e os da íntima, embora estes difiram em graus de ploidia.

4) As glândulas da espermateca possuem núcleos poliplóides, 2C à 16C para os núcleos da camada íntima, e 16C à 128C para os núcleos do epitélio glandular.

5) A classe de conteúdo de DNA de maior frequência nuclear, tanto para camada íntima como para epitélio glandular (4C e 64C, respectivamente), é a mesma nas três situações em estudo. Variações acontecem ao nível das subclasses de conteúdo de DNA., provavelmente devidas as diferenças na organização dos complexos DNA-proteínas, e atividades transcricionais.

6) Desde que o padrão de distribuição de valores Feulgen-DNA para núcleos do epitélio secretor de rainhas virgens e velhas aparentemente não difere, assume-se que não exista perda de conteúdo de DNA com o envelhecimento, pelo menos até a idade estudada.

RESUMO

Núcleos das glândulas da espermateca de rainhas de *Apis mellifera*, virgens, recém-fecundadas e envelhecidas, foram estudados através de testes citoquímicos apropriados- reação de Feulgen e concentração crítica de eletrólitos (CEC), a fim de se verificar possíveis alterações ao nível de DNA e complexos DNA-proteína com a fecundação e o envelhecimento. Foram encontradas: 1)alterações nos valores de CEC com a fecundação e com o envelhecimento, 2)poliploidização dos núcleos da camada íntima e do epitélio glandular nas três situações em estudo. Alterações nos valores de CEC (aumento com a fecundação e decréscimo com o envelhecimento) indicam modificações na disponibilidade de grupamentos fosfatos livres do DNA (não ligados à proteínas), que poderiam ser causadas pela alteração na estrutura cromatínica, em resposta ao processo de fecundação (início da secreção glandular), e pelo envelhecimento (normal, casual, ou programado), devido a alterações quantitativas e qualitativas das proteínas nucleares. Estas alterações devem estar relacionadas à diferenças na expressão gênica, e também poderiam ser as responsáveis pelas alterações nos valores Feulgen-DNA, detectados à nível das subclasses de conteúdo de DNA. Assume-se não ter havido perda no conteúdo de DNA para a idade considerada como envelhecida neste estudo.

ABSTRACT

Spermathecal glands nuclei of virgin, mated and old queen bees of *Apis mellifera* were studied cytochemically using the Feulgen reaction and the critical electrolyte concentration (CEC) method, in order to detect possible changes in DNA and DNA-protein complexes with fecundation and ageing. The results showed 1)altered CEC values (increase with fecundation and decrease with aging), 2)poliploidy on secretory epithelium and intima in the three situations studied. Differences in CEC values indicate differences in availability of free DNA phosphates, that could be caused by altered chromatin structure, due to alteractions in nuclear proteins, in response to fecundation and aging. The differences may be related to changes in gene expression, and could be responsible for the altered Feulgen-DNA values, detected in DNA content subclasses. No loss of DNA could be assumed, at least considering the insect age presumed here to be involved with ageing processes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRELL,I. & BERGQVIST,H.A. Cytochemical evidence for varied DNA complexes in the nuclei of undifferentiated cells. J. Cell Biol.,15:604-606. 1962.
- AGRELL,I. & BERGQVIST,H.A. Cytochemical studies on DNA-complexes during cell multiplication and cell differentiation. Comp. Biochem. Physiol.,22:189-198. 1967.
- ALBERTS et al. Molecular Biology of the Cell. New York/London, Garland Publishing, Inc. 1994.
- ALUMOT,E. et al. Sugars and trehalase in the reproductive organs and hemolymph of the queen and drone honey bee. (*Apis mellifica* L. var *Ligustica* Spin). Comp. Biochem. Physiol.,28:1419-1425. 1969.
- AMARAL, M.J.L.V.do. Concentração eletrolítica crítica da cromatina em animais submetidos ao jejum. Tese de mestrado. Campinas. UNICAMP,1988.
- AMARAL,M.J.L.V. do. & MELLO,M.L.S. Critical electrolyte concentration of heterochromatin and euchromatin in cells of starved animals. Cytobios 59(238/239):159-165. 1989.
- ANDERSSON,G.K.A. & KJELLSTRAND,P.T.T. A study of DNA depolymerization during Feulgen acid hydrolysis. Histochemistry,43(2):123-130. 1975.
- ARKING,R. Genetic and environmental determinants of longevity in *Drosophila*. In: WOODHEAD,A.D. & THOMPSON,K.H. Evolution and longevity of animals. A comparative approach. New York/London, Plenum Press. 1987. p1-22.
- BACHMANN,K. A cytochemical kinetic investigation of the Feulgen hydrolysis of fixed chromatin. Histochemie,16:287-293. 1968.
- BASSON,A.B.K. et al. A comparative study on the effects of ageing and training on the levels of lipofuscin in various tissues of the rat. Comp. Biochem. Physiol.,71A(3):369-374. 1982.
- BELLAMY,D. Cell death and the loss of structural units of organs. In: BITTLES,A.H. & COLLINS,K.J. The Biology of Human Ageing. Cambridge, Cambridge University Press. 1986. p119-132.
- BITTLES,A.H. & SAMBUY,Y. Human cell culture systems in the study of ageing. In: BITTLES,A.H. & COLLINS,K.J. The Biology of Human Ageing. Cambridge, Cambridge University Press. 1986. p49-66.
- BLOCH,D.P. A catalog of sperm histones. Genetics (suppl.), 61:93-111. 1969.

- BOJANOVIC, J.J. et al. Thymus nucleoproteins, thymus histones in young and adult rats. Gerontologia, 16:304-312. 1970.
- BOWEN, I.D. & BOWEN, S.M. Programmed Cell Death in Tumours and Tissues. New York, Chapman and Hall. 1990. 268p.
- CAMARGO, J.M.F. de. Manual de Apicultura. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA. 1972. p83-96.
- CAMARGO, J.M.F. de & MELLO, M.L.S. Anatomy and histology of the genital tract, spermatheca, spermathecal duct and glands of *Apis mellifica* queens (HYMENOPTERA: APIDAE). Apidologie, 1(4):351-373. 1970.
- CATANIA, J. & FAIRWEATHER, D.S. DNA methylation and cellular ageing. Mutation Res., 256(2-6):283-293. 1991.
- CHAYEN, J. & BITENSKY, L. Analysis of chemical components of cell and tissues. Reactions for nucleic acids and polyphosphate. In: CHAYEN, J. & BITENSKY, L. Practical Histochemistry. 2^a Ed. New York. John Wiley & Sons. 1991. p77-98.
- CHETSANG, C.J. et al. Single-stranded regions in DNA of old mice. Nature, 253:130-131. 1975.
- CORBELA, E. & GONÇALVES, L.S. Relationship between weight at emergence of ovarioles and spermathecal volume of Africanized honeybee queens (*Apis mellifera* L.) Rev. Brasil. Genet. 5(4):835-840. 1982.
- CRUZ-LANDIM, C. & MELLO, M.L.S. The post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hym. Apoidea). II. Development of the salivary glands system. J. Morph., 123(4):481-502. 1967.
- DALLAI, R. Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. J. Insect Physiol., 21(1):89-109. 1975.
- DANEHOLT, B. & GROSSBACH, U. Histone H1 and transcription. TIBS, 15:463. 1990.
- DELL'ORCO, R.T. & WORTHINGTON, M.I. The effects of *in vitro* age and culture state on histone variant synthesis in human diploid fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun., 136:168-174. 1988.
- DUPRAW, E.J. Cell and Molecular Biology. Academic Press, New York. 1969. 739p.
- DUPRAW, E.J. Chromosomes in sperm. In: DNA and Chromosomes, ed by E.J. Dupraw. New York. Holt, Rinehart and Winston, Inc. 1970. p273-282.

- FELSENFELD,G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature,355:219-224.1992.
- FREE,J.B. et al. Influence of virgin queen honeybees (*Apis mellifera*) on queen rearing and foraging. Physiological Entomology, 10(3):271-274. 1985.
- FREE,J.B. Pheromones of social bees. London. Chapman and Hall. 1987. 218p.
- FRIEDBERG,E.C. DNA repair. New York, Freeman and Company. 1985.
- GENSLER,H.L. & BERNSTEIN,H. DNA damage as the primary cause of aging. The Quaternary Review of Biology,56(3):279-303. 1981.
- GESSNER,B. & GESSNER,K. Inorganic ions in spermathecal fluid and their transport across the spermathecal membrane of the queen bee, *Apis mellifera*. J. Insect Physiol., 22(11):1469-1474. 1976.
- GILCHREST,B.A. The biology of aging : observations and theories. In : GILCHREST,B.A. Skin and Aging Processes. Florida, CRC Press, Inc. 1984. p5-15.
- GLEDHILL,B.L. Studies on DNA content, dry mass and optical area of ejaculated spermatozoal heads from bulls with normal and lowered fertility. Acta Vet. Scand.,7:166-174. 1966.
- GONDAL,S.M.A. & HASHMI,A.A. Brood rearing in relation to the age of the queen in *Apis cerana indica*. J. Apic. Res., 15(3/4):128-129. 1976.
- GOSMERAC,W.L. Bees, beekeeping, honey and pollination. Westport, Connecticut. The Avi Publishing Company, Inc. 1983. 192p.
- HARBO,J.R. The rate of depletion of spermatozoa in the queen honeybee spermatheca. J. Apic. Res.,18(3):204-207. 1979.
- HARBO,J.R. Oviposition rates of instrumentally inseminated and naturally mated queen honeybees (Hymenoptera:Apidae). Annals of the Entomological Society of America, 79(1):112-115. 1986.
- HARBO,J.R. & SZABO,T.I. A comparison of instrumentally inseminated and naturally mated queens. J. Apic. Res.,23:31-36. 1984.
- HARMAN,D. The aging process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(11):7124-7128. 1981.
- HAZAN,M. de et. al. Effects of queen honeybee (*Apis mellifera* L.) ageing on her attractiveness to workers. Comp. Biochem. Physiol., 93A(4):777-783. 1989.
- HORNSBY,P.J. et al. Changes in gene expression and DNA methylation in adrenocortical cells senescing in culture. Mutation Res.,256(2-6):105-113. 1991.

- JEANNY,J.C. Modifications des propriétés cytophotométriques des adn et des histones nucléaires au cours de la sénescence des tritons (*Triturus vulgaris* et *Triturus cristatus*) Exp. Cell Res.,102(2):394-404. 1976.
- JOHANSSON, T.S.K. & JOHANSSON, M.P. The honeybee colony in winter. Bee World,60(4):155-170. 1979.
- KAFTANOGLU,O. & PENG,Y.S. Effects of insemination on the initiation of oviposition in the queen honeybee. J. Apic. Res.,21(1):3-6. 1982.
- KANUNGO,M.S. Biochemistry of ageing. London, Academy Press, 1980. 280p.
- KENNEY,R.A. The aging process. In: KENNEY,R.A. Physiology of aging. A synopsis. 2^a ed. London. Year Book Medical Publishers, Inc. 1989. Cap2. p15-25.
- KIRKWOOD,T.B.L. Evolution of ageing. Nature, 270:301-304. 1977.
- KIRKWOOD,T.B.L. DNA, mutations and aging. Mutation Res.,219(1):1-7. 1989.
- KIRKWOOD,T.B.L. The disposable soma theory of aging. In: HARRISON,D.E. Genetic Effects on Ageing II. Caldwell, New Jersey. The Telford Press, Inc. 1990. p9-19.
- KJELLSTRAND,P.T.T. & ANDERSSON,G.K.A. Hystochemical properties of spermatozoa and somatic cells. I.Relation between the Feulgen hydrolysis pattern and the composition of nucleoprotein complex. Histochem. J.,7:563-573. 1975(a).
- KJELLSTRAND,P.T.T. & ANDERSSON,G.K.A. Hystochemical properties of spermatozoa and somatic cells. II.Diferences in the Feulgen hydrolysis pattern induced through alterations of the nucleoprotein complex. Histochem. J.,7:575-583. 1975(b).
- KNOOK,D.L. Aging liver cells. In: CRISTOFALO,V.J. CRC Handbook of Cell Biology of Aging. Florida. CRC Press, Inc., 1985. p229-243.
- LAMB,M.J. Insects as models for testing theories of ageing. In:BITTLES,A.H. & COLLINS,K.J. The Biology of Human ageing. Cambridge, Cambridge University Press. 1986. p33-47.
- LANGSTROTH,L.L.; DADANT,C. and DADANT,C.P. The hive and the honeybee. Hamilton, Illinois. Dadant & Sons, Inc. 1979. p50-67.
- LEE, D.Y. et al. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleossomal DNA. Cell, 72(1): 73-84. 1993.

- LENNOX,R.W. Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. Implications for the roles of H1 subtypes in chromatin. J. Biol. Chem.,259(1):669-672. 1984.
- LENSKY,Y. & ALUMOT,E. Proteins in the spermatheca and haemolymph of the queen bee (*Apis mellifica* L. var. *Ligustica* SPIN). Comp. Biochem. Physiol.,30(3):569-575. 1969.
- LENSKY,Y. & SLABEZKI,Y. The inhibiting effect of the queen bee (*Apis mellifera* L.) foot-print pheromone on the construction of swarming queen cups. J. Insect Physiol.,27:313-323. 1981.
- LENSKY,Y. & DEMTER,M. Mating flights of the queen honeybee (*Apis mellifera*) in a subtropical climate. Comp. Biochem. Physiol.,81A(2):229-241. 1985.
- LEVINE, A. et al. Histone H1-mediated inhibition of transcription of methylated templates *in vitro*. J. Biol. Chem., 268(29): 21754-21759. 1993.
- LISON,L. & MUTSAARS,N. Metachromasy of nucleic acid. Quart. J. Microsc. Sci.,91:309-313. 1950.
- LISON,L. Histochimie et Cytochimie Animales. Paris. Gauthier-Villars. 1960.
- MACIEIRA-COELHO,A. Chromatin reorganization during senescence of proliferating cells. Mutation Res.,256(2-6):81-104. 1991.
- MAKINODAN,T. Biology of aging : retrospect and prospect. In: MAKINODAN,T & YUNIS,E. Immunology and Aging. New York, Plenum Medical Book Company. 1977. p1-7.
- MARTIN,H. et al. Magnetic field effects on activity and ageing in honeybees. J. Comp. Physiol, 164A(4):423-431. 1989.
- MELLO,M.L.S. Somatic polyploidy in insects. Ciência e Cultura,SP,22:348-350. 1970.
- MELLO,M.L.S. Influence of some cytochemical methods on birefringence of the honey bee sperm nuclei. Acta Histochem.,47:266-272. 1973.
- MELLO,M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. Tese Livre Docência. Campinas, UNICAMP/IB. 1976. 205p.
- MELLO,M.L.S. Feulgen-DNA absorption spectrum of euchromatin and constitutive heterochromatin. J. Histochem Cytochem.,26(12):1082-1086. 1978.
- MELLO,M.L.S. Patterns of lability towards acid hidrolisis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. Cell. Mol. Biol., 24(1):1-16. 1979.
- MELLO,M.L.S. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. Histochemistry,69(2):181-187. 1980.

- MELLO,M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. Histochemistry,74:387-392. 1982.
- MELLO,M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. Histochem. J., 15:730-751. 1983.
- MELLO,M.L.S. et al. Poliploidy pathern in larval silk glands of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera,Apoidea). Insects Soc.,17(4):295-302. 1970.
- MELLO,M.L.S. & TAKAHASHI,C. DNA content and nuclear volume in larval organs of *Apis mellifera*. J. Apic. Res.,10(3):125-132. 1971.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. Histochemical and histophysical aspects of silk secretion in *Melipona quadrifasciata* (Hym.,Apoidea). Z. Zellforschg.,118:555-569. 1971.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. Linear dichroism and anomalous dispersion of the birefringence on sperm heads. Acta Histochem. Bd.,45(1):109-114. 1973.
- MELLO,M.L.S. et al. A hidrólise ácida e a remoção de proteínas básicas de núcleos interfásicos e de cromossomos mitóticos. Rev. Brasil. Genet.,36(1):171-177. 1976.
- MELLO,M.L.S. & RAYMUNDO,H.H. Change with age of Feulgen-DNA values in the blood-sucking, *Triatoma infestans* Klug. Histochemistry, 54:219-223. 1977.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshoper, *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. In: ADIYODI,K.G. and ADIYODI,R.G. Adv. in Invertebrate Reproduction. Kerala, Peralam-Kenoth. 1977. p76-83.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. A reação de Feulgen. Ciência e Cultura,30(6):665-676. 1978.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. Acid labillity of dooxyribonucleic acids of some polytene chromosome regions of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma, 81:419-429. 1980.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. Práticas de Biologia Celular. Campinas,SP. Edgard Blucher. 1980. 69p.
- MELLO,M.L.S. et al. Effect of chloramine-T on the Feulgen DNA response of bull spermatozoa. Rev. Brasil. Genet.,9(3):453-457. 1986.
- MELLO,M.L.S. & VIDAL,B.C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. Cytobios, 59(237):87-93. 1989.

- MELLO,M.L.S. et al. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. Acta Histochem. Cytochem.,26(1)1-3. 1993.
- MITSUI,Y. et al. Age-related decline in histone H1 fraction in human diploid fibroblast cultures. Exp. Cell Res.,126(2):298-298. 1980.
- MITTERMAYER,C. et al. Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin (biochemical, histochemical and morphological studies). Beitr. Path. Verdaunungs.-Org. 143:157-171. 1971.
- MIURA,A. & OHBA,Y. Structure of nucleohistone. III.Interaction with toluidine blue. Biochim. Biophys. Acta, 145:436-445. 1967.
- MODAK,S.P. et al. Genetic information in ageing cells. In: BITTLES,A.H. & COLLINS,K.J. The Biology of Human Ageing. Cambridge, Cambridge University Press. 1986. p17-32.
- MOLLOY,P.L. & WATT,F. DNA methylation and specific protein-DNA interactions. Phil. Trans. R. Soc. London B,326:2267-2275. 1990.
- MOMENT,G.B. Theories of aging: an overview. In:ADELMAN,R.C. & ROTH,G.S. Testing the Theories of Aging. Florida. CRC Press, Inc. 1982. p1-23.
- MONTEIRO,A.L.P. Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) em cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* (Diptera:Sciaridae). Tese de mestrado. Campinas, UNICAMP/IB. 1993. 98p.
- MULLAART,E. et al. DNA damage metabolism and aging. Mutation Res.,237(516):189-210. 1990.
- O'MEARA, A.R. & HERRMANN,R.L. A modified mouse liver chromatin preparation displaying age-related differences in salt dissociation and template ability. Biochim. Biophys. Acta,269(3):419-427. 1972.
- ORGEL,L.E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49:517-521. 1963.
- PEARSE,A.G.E. Nucleic acids and nucleoproteins. In: PEARSE,A.G.E. Histochemistry. Theoretical and applied. 4ªEd. New York. Churchill Livingstone.1985.V2. p611-674.
- PIMENTEL,E.R. Fração histônica nuclear rica em histona H5: isolamento, caracterização, orientação macromolecular e interação com o DNA. Tese de Doutorado. Campinas, UNICAMP/IB. 1983. 100p.
- RANDI,M.A.F. & MELLO,M.L.S. Critical electrolyte concentration and dispersion of birefringence in heterochromatin and euchromatin of cooper sulfate-treated specimens of *Triatoma infestans* Klug. Acta Histochem.,96:81-85. 1994.

- RATTAN,S.I.S. Protein synthesis and the components of protein synthetic machinery during cellular ageing. Mutation Res.,256(2-6):115-125. 1991.
- RIGGS,A.D. DNA methylation and late replication probably aid cell memory, and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function. Phil. Trans. R. Soc. London B,326:285-297. 1990.
- ROCKSTEIN,M. & MIQUEL,J. Aging in insects. In:ROCKSTEIN,M. The Physiology of Insecta. New York, Academic Press. 1973. v1, cap6, p371-478.
- ROTH,S.Y. & ALLIS,D. Chromatin condensation:does histone H1 dephosphorylation play a role? TIBS,17:93-98.1992.
- RYAN,J.M. & CRISTOFALO,V.J. Histone acetylation during aging of human cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48(4):735-748. 1972.
- RYAN,J.M. & CRISTOFALO,V.J. Chromatin template activity during aging in WI38. Exp. Cell Res.,90(2):456-458. 1975.
- SCOTT,J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. In: Methods of Biochemical Analysis, vol 8, ed. by D. Glick. New York. Interscience Publ.,1960. p145-197.
- SCOTT,J.E. Affinity competition and specific interaction in the biochemistry of polyelectrolytes. Biochem. Soc. Trans.,1(4):787-806. 1973.
- SEVERSON,D.W. & ERICKSON Jr.,E.H. Seasonal constraints on mating and insemination of queen honeybees in a continental climate. Apidologie, 20:21-27. 1989.
- SHEHATA et al. Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. J. Apic. Res.,20(2):69-78. 1981.
- SILVA DE MORAES,R.L.M. & CRUZ-LANDIM,C. Evolução do conteúdo de DNA e superfície nuclear nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera,Apoidea). Naturalia,8:177-183. 1983.
- SILVA,M.J.L. & MELLO,M.L.S. Lability to acid hydrolysis in some different DNA-protein complexes of spermatozoa. Acta Histochem., 78(2):197-215. 1986.
- SLAGBOOM,P.E. et al. Somatic mutations and cellular ageing: two dimensional DNA typing of rat fibroblast clones. Mutation Res.,256:311-321. 1991.
- SLAGBOOM,P.E. & VIJG,J. The dynamics of genome organization and expression during the aging process. Annal of the New York Academy of science, 673:58-69. 1992.

- SMITH,J.R. et al. Is cellular senescence genetically programmed. In: WOODHEAD,A.D. & THOMPSON,K.H. Evolution and longevity of animals. A comparative approach. New York/London, Plenum Press, 1987. p283-294.
- SOHAL,R.S. & McARTHUR,M.C. Cellular aspects of aging in insects. In: CRISTOFALO,V.J. CRC Handbook of Cell Biology of Aging. Florida. CRC Press,Inc., 1985. p497-509.
- SWISSELM,K. et al. Age related increase in methylation of ribosomal genes and inactivation of chromosome-specific rRNA gene cluster in mouse. Mutation Res.,237(3/4):131-146. 1990.
- SZABO,T.I. & HEIKEL,D.T. Numbers of spermatozoa in spermathecae of queens aged 0 to 3 years reared in Beaverlodge, Alberta. J. Apic. Res., 26(2):79-82. 1987.
- SZABO,T.I. et al. Effects of honeybee queen weight and air temperature on the initiation of oviposition. J. Apic. Res.,26(2):73-78. 1987.
- TAUCHI H. & SATO,T. Cellular change in senescence: possible factors influencing the process of cellular aging. In: BERGENER,M.; ERMINI,M.; STAHELIN,H.B. Thresholds in Aging. London. Academic Press, Inc. 1985. p91-113.
- TICE,R.R. & SETLOW,R.B. DNA repair and replication in aging organisms and cells. In: FINCH,C.E. & SCHNEIDER,E.L. Handbook of the Biology of Aging. 2ed. New York, Von Nostrand Reinhold, 1985. p173-224.
- TRAVERS,A. DNA-protein interactions. London, Chapman & Hall, 1993. 180p.
- TORDERA,V. et al. The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. Experientia,49(9):780-788.1993.
- VERMA,L.R. Cytochemical analysis of nuclear histones in honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. Can. J. Zool.,50:1241-1242. 1972.
- VERMA,L.R. An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honeybee (*Apis mellifera* L.). Comp. Biochem. Physiol., 44A(4):1325-1331. 1973.
- VERMA,L.R. Honeybee spermatozoa and their survival in the queen's spermatheca. Bee World,55(2):53-61. 1974.
- VIDAL,B.C. Anormal dispersion of birefringence, linear dichroism, and relation with ORD (Extrinsic Cotton Effect). Histochemie,30:102-107. 1972a.

- VIDAL,B.C. Birefringence and linear dichroism of euchromatin and heterochromatin stained with toluidine blue. Cotton effect like phenomena. Beitr. Path. Bd.,145:269-285. 1972b.
- VIDAL,B.C. The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. Histochemistry,60:309-316. 1979.
- VIDAL,B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL,B.C. & MELLO,M.L.S. Biologia Celular. Rio de Janeiro. Atheneu. 1987. p5-39.
- VIDAL,B.C. & MELLO,M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. Acta Histochem. Cytochem.,22(4):471-478. 1989.
- VIDAL,B.C. et al. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. Analyt. Cell Path.,7:27-41. 1994.
- WEI,Y.H. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. Mutation Res., 275(3-6):145-155.1992.
- WEIRICH-SCHWAIGER,H. et al. Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. Mutation Res., 316(1):37-48. 1994.
- WHITE,J.C. & ELMES,P.C. Fibres of human sodium deoxyribonucleate and nucleoprotein studied in polarized light by a simple method. Nature,169:151-152. 1952.
- WINSTON,M.L. & KATZ,S.J. Longevity of cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. Canadian J. Zool., 59(8):1571-1576. 1981.
- WOYKE,J. Correlations between the age at which brood honey was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. J. Apic Res.,10(1):45-55. 1971.
- WOYKE,J. Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queens honeybees. J. Apic. Res.,22:150-154. 1983.
- WOYKE,J. A mathematical model for the dynamics of spermatozoa entry into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honeybees. J. Apic. Res.,27(2):122-125. 1988.
- WOYKE,J. & JASINSKI,Z. Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens. Apidologie,9(3):203-212. 1978.

- WOYKE,J. & JASINSKI,Z. Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei. J. Apic. Res.,21(3):129-133. 1982.
- ZLATANOVA,J. Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. TIBS,15:273-276.1990.