

**BANDA AgNOR COMO MARCADOR CITOLÓGICO E INDICADOR DA ATIVIDADE
SINTÉTICA DE CÉLULAS PARA DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS SEM-FERRÃO
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINA)**

Anderson Fernandes, Adriane Barth e Wagner Martins Santana Sampaio (Departamento de Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Tangará da Serra - UNEMAT/CUTS. Email: diversidadegenetica@gmail.com.br). Endereço: Rodovia MT-358, Km 7. Bairro Jardim Aeroporto. Tangará da Serra, Cep. 78300-000.

Termos para Indexação: *Tetragonisca fiebrigi*, *Frieseomelitta trichocerata*, rDNA, nucléolo

Introdução

A Região Organizadora de Nucléolo (NOR) é a região do cromossomo na qual estão localizados os principais genes de rDNA que são transcritos em uma molécula de RNA (45S) e posteriormente clivados em moléculas menores (18S; 5,8S; 28S) (Sumner, 1990). A junção das NORs resulta na formação dos nucléolos no núcleo interfásico (Schwarzacher e Wachtler, 1983). A relação entre as NORs e os nucléolos é bastante clara, uma vez que nos nucléolos, são transcritos e processados os rRNAs necessários para a produção de todas as proteínas das células (Sumner, 2003).

Uma das técnicas para o estudo das NORs é a impregnação por Nitrato de Prata (AgNO_3) ou Banda Ag-NOR, inicialmente proposta por Howell e Black (1990). Este é um método altamente seletivo para marcações em núcleos interfásicos e em cromossomos meióticos e mitóticos, além de ser um método eficaz na identificação dos sítios de NORs nos cromossomos (Sumner, 1990). No entanto, em espécies com NORs múltiplas, o Nitrato de Prata normalmente não marca todos os sítios, em humanos por exemplo, não mais de sete ou oito de um total de dez são comumente marcados. Essas informações indicam que o Nitrato de Prata marca apenas sítios de NORs transcricionalmente ativos (Sumner, 2003).

A técnica Ag-NOR tem sido utilizada em diversos organismos e com diferentes finalidades: em humanos para a detecção de células cancerígenas, (Sumner, 1993; Roussel e

Hernandez-Verdun, 1994); em formigas (complexo *Myrmecia pilosula*) para estudar a amplificação do rDNA 28S e a atividade das NORs na evolução do cariótipo (Imai *et al.*, 1992); em espécies de abelhas da subtribo Meliponina para verificar a localização das NORs nos cromossomos (Menezes, 1997; Brito, 1988; Maffei *et al.*, 2001 e Rocha *et al.*, 2002).

Um aspecto pouco discutido na literatura envolvendo a banda Ag-NOR está relacionado com o tamanho relativo e número de nucléolos encontrados nos núcleos interfásicos. Informações desta natureza podem ser um indicativo da atividade metabólica das células além de poderem ser utilizadas como marcadores citológicos para diferentes tipos celulares de um mesmo tecido e para diferentes organismos.

As espécies de abelhas sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* e *Frieseomelitta trichocerata* apresentam ampla distribuição e vem sendo amplamente estudadas do ponto de vista citogenético. Estes dois fatores, disponibilidade de material e embasamento literário, às tornam excelentes modelos para o estudo do nucléolo, da região que o organiza e também da atividade metabólica da célula inferida pelo tamanho relativo e número de nucléolos.

Este trabalho teve como objetivo utilizar as espécies de abelhas sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* e *Frieseomelitta trichocerata* coletadas no cerrado mato-grossense para avaliar se, em média, a área total do nucléolo de uma célula que tem um nucléolo é igual à área total dos nucléolos de uma célula que tem mais de um nucléolo. Outra investigação proposta é verificar se, em média, a relação entre a área total do nucléolo e a área do núcleo é constante entre as células independente da área do núcleo ou do número de nucléolos.

Material e Métodos

Baseado na técnica de Imai *et al.* (1988), os núcleos interfásicos foram obtidos a partir da retirada do gânglio cerebral de larvas de duas espécies de abelhas da subtribo Meliponina (*T. fiebrigi* e *F. trichocerata*) pertencentes à região de Cerrado próximo ao município de Tangará da Serra (14°39'03"S-57°26'14"O).

Para a obtenção das marcações nos núcleos foi realizada a técnica de banda NOR, proposta por Howell e Black (1980). Após a obtenção das marcações, os núcleos foram capturados por uma câmara CCD acoplada a um microscópio sob objetiva de 100x. Foram selecionados dez núcleos

divididos em 3 grupos: Grupo I – Núcleos com um nucléolo; Grupo II – Núcleos com dois nucléolos e Grupo III – Núcleos com três nucléolos (Figura 1). Por meio do programa de análise de imagens Image-Pro Plus[®], versão 3.1 (Media Cybernetics, 1998) foi obtida a área média do núcleo e a área média do nucléolo de cada grupo. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey à 5% de probabilidade.

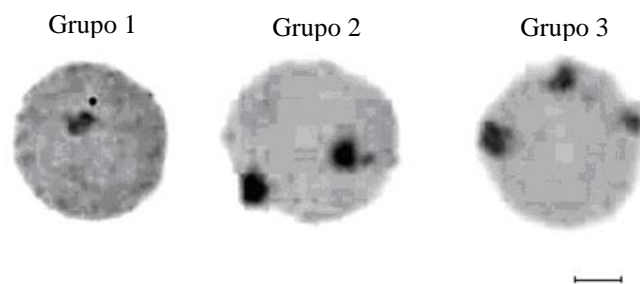


Figura 1. Núcleos de *Friesiometitta trichocerata* submetidos à técnica de banda AgNOR. Grupo I – Núcleos com apenas um nucléolo, Grupo II – Núcleos com dois nucléolos e Grupo III – Núcleo com três nucléolos. Barra=5 μ m.

Resultados e Discussão

Área total dos nucléolos

Para *T. fiebrigi* a análise de variância (ANOVA) não indicou uma diferença significativa entre as médias da área total dos nucléolos entre os três grupos, ou seja, independente do número de nucléolos por núcleo (1, 2 ou 3) sua área total foi a mesma (Figura 2). Estes dados demonstram que as células pertencentes aos três grupos de núcleos aqui analisados, apresentam aproximadamente a mesma demanda metabólica uma vez que o tamanho dos nucléolos apresenta relação com a produção de rRNA, que por sua vez está diretamente relacionado com a produção de proteínas (Lewin, 1997; Sumner, 2003).

Já para *F. trichocerata* foi encontrada uma diferença significativa entre as áreas totais dos nucléolos, sendo que de acordo com o teste de Tukey os Grupos II e III não diferiram entre si e apresentaram a maior área total de nucléolos (Figura 2). O fato dos Grupos II e III apresentarem em média o mesmo tamanho de nucléolo, pode indicar duas estratégias evolutivas distintas de tipos

celulares que aparentemente apresentam necessidades metabólicas semelhantes. No tipo celular do Grupo II teria prevalecido o aumento no tamanho individual dos nucléolos enquanto no tipo celular do Grupo III teria prevalecido o aumento no número de nucléolos. Este resultado reflete uma plasticidade celular considerável se forem analisadas as implicações estruturais que são exigidas por cada estratégia destas.

Quando comparada a área do nucléolo dos diferentes grupos entre as duas espécies, nota-se que os tipos celulares do Grupo I de ambas as espécies apresentam as mesmas demandas metabólicas, o que não é verificado para os Grupos II e III. Para estes dois grupos a espécie *F. trichocerata* parece apresentar uma atividade metabólica aproximadamente duas vezes maior que a espécie *T. fiebrigi*.

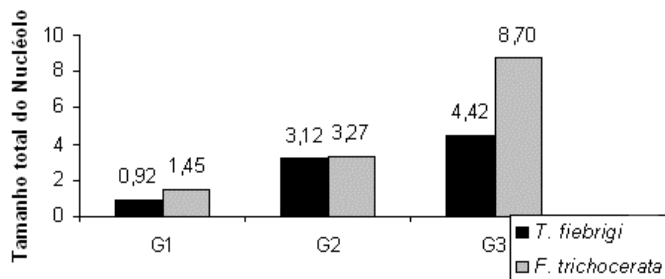


Figura 2. Área total dos nucléolos das espécies *Friesiomelitta trichocerata* e *Tetragonisca fiebrigi* em µm.

Relação entre área do núcleo e nucléolo

Quando analisamos a porcentagem do núcleo ocupada pelo nucléolo entre os grupos, verificamos que para ambas as espécies, à medida que aumenta o número de nucléolos aumenta também a porção do núcleo ocupada por este (Figura 3). Esta relação é mais evidente para *F. trichocerata* uma vez que a área ocupada pelo nucléolo das células do Grupo I foi de apenas 4%, enquanto que a área total do nucléolo das células do Grupo III (três nucléolos) ocupou em média 8%. Estes resultados indicam que a área ocupada pelos nucléolos depende da quantidade deles por núcleo. Mampumbu (2002), trabalhou com a espécie de abelha sem ferrão *Friesella schrottkyi* e também concluiu que quanto maior o número de nucléolos maior é sua área total.

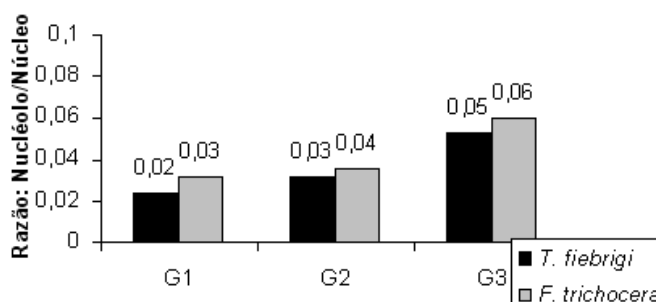


Figura 3. Relação da área total dos nucléolos dividido pela área total dos núcleos das espécies *Friesiomelitta trichocerata* e *Tetragonisca angustula fiebrigi*.

Para as duas espécies estudadas, os núcleos com três nucléolos (Grupo III) apresentaram área total destes nucléolos superior àqueles núcleos que apresentaram apenas um nucléolo (Grupo I). Sendo esta uma característica conservada entre estas duas espécies até então. Logo, uma característica que teria prevalecido nas células do gânglio cerebral em estágio larval para aumentar a produção metabólica, teria sido o aumento no número de nucléolos e não seu volume individual.

Conclusões

Com os resultados obtidos para as espécies *F. Trichocerata* e *T. fiebrigi*, percebeu-se que os nucléolos são componentes celulares que podem oferecer informações importantes sobre a atividade metabólica e também sobre algumas características evolutivas dos diferentes organismos. Estudos desta natureza ainda são escassos, mas indicam que a técnica de banda NOR pode ser um possível marcador citológico para distintos tipos celulares e uma técnica prática e rápida para inferir sobre a atividade metabólica de uma célula.

Referências Bibliográficas

BRITO, R. M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero Partamona Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, 1998, 62p. Mestrado. Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.

CROZIER, H.R. Hymenoptera. Animal Cytogenetics. **Berlin:John, B. Gebrüder,1975.**

HOWELL, W.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014 – 1015, 1980.

IMAI, H.T, TAYLOR, R.W, CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japanese Journal of Genetics** **63**, 159 – 185, 1988.

IMAI, H.T, TAYLOR, R.W, CROZIER, R.H. Experimental bases for the minimum interaction theory. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera, Formicidae, Myrmeciinae) **Japanese Journal of Genetics** **65**, 137-182, 1994.

LEWIN, B. **Genes VI**. New York:Oxford University Press and Cell Press, 1997, p. 1260.

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; SILVA-JÚNIOR, J.C.; CAIXEIRO, A.P.A. Silver staining of nucleolar organizer regions (NOR) in some species of hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). **Cytobios** 104, **119-125**, 2001.

MAMPUMBO, A.R. **Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Campinas, 2002. Mestrado. Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas.

MENEZES, M.B.F. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, 1997. 62p. Mestrado. Genética e melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.

ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation relates to ribosomal gene activity. **Experimental Cell Research** **214**, 465-472, 1994.

ROCHA, M.P. **Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)**. Campinas, 2002. Doutorado. Biologia Celular e Estrutural, Universidade de Campinas.

SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Hum. Genet** **63**, p. 89-99, 1983.

SUMNER, A.T. **Cromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990, 434 p.

SUMNER, A. T. **Cromosome organization and function**. London: Unwin Hyman, 2003.