

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

**ANÁLISE MORFOLÓGICA COMPARATIVA DA  
ESTRUTURA DO CORPO GORDUROSO NOS  
ATTINI EM DIFERENTES NÍVEIS  
FILOGENÉTICOS**

**GISLAINE CRISTINA ROMA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Outubro - 2007

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

**ANÁLISE MORFOLÓGICA COMPARATIVA DA  
ESTRUTURA DO CORPO GORDUROSO NOS  
ATTINI EM DIFERENTES NÍVEIS  
FILOGENÉTICOS**

**GISLAINE CRISTINA ROMA**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias**

**Co-orientador: Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Outubro - 2007

595.796 Roma, Gislaine Cristina

R756a Análise morfológica comparativa da estrutura do corpo  
gorduroso nos Attini em diferentes níveis filogenéticos /  
Gislaine Cristina Roma. – Rio Claro: [s.n.], 2007  
142 f.: il., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

Co-Orientador: Odair Corrêa Bueno

1. Formigas. 2. Trofócitos. 3. Enócitos. 4. Ultra-estrutura.  
5. Citoquímica. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*Agradeço primeiramente a Deus, que por inúmeras vezes tem me segurado com firmeza pela mão e me guiado com muito amor, pelos caminhos tortuosos da vida, conduzindo-me à descoberta dos momentos de felicidade ao longo deste percurso...*

*Sede bendito e glorificado para sempre meu Deus, Senhor da vida, pelo corpo que me destes, onde os vossos desejos se revelam.*

*E penso sim, que os vossos desígnios são os que se manifestaram no decorrer deste tempo precioso, tempo propício em que tive o privilégio de adentrar pelas insondáveis veias de vossa ternura, de penetrar um pouquinho nos vossos segredos e no mistério da criação. Quando através das lentes do microscópio observava, extasiada, a vida manifestada em cada célula, cujo enigma eu tentava desvendar.*

*Deste-me a alegria de admirar e sentir a vossa bondade infinita quando vislumbrava a vossa mão poderosa no eclodir das primeiras descobertas, quando eu saboreava com avidez as lições que a Biologia, “Ciência da Vida”, me oferecia.*

*Ó meu Deus, que eu saiba merecer a vossa confiança, a dádiva da vossa generosidade e os benefícios da vossa Graça. Que num vôo perene eu vá espargindo pelo mundo os frutos da abundante colheita, representados pelos conhecimentos que adquiri nestes meus estudos.*

*“Se levanto vôo para as margens da aurora, se emigro para os confins do mar, aí me alcançará a vossa esquerda e a vossa direita me sustentará” (Sl. 138, 9-10)*

*Dedico esta tese...*

*Aos meus pais, Sergio Roma (sempre presente) e Ruth Antonia Roma, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e com muita esperança. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Amo vocês!*

*Ao meu amor Rogerio Sueshiro Hatore pela compreensão e apoio nos momentos difíceis, por compartilhar comigo os momentos de alegria e realizações e, acima de tudo, pelo amor que vejo em seu olhar e que me faz mais feliz a cada dia. Eu te amo!*

*Ao meu sobrinho Filipe Roma Fiório, que através de sua doce inocência me faz esquecer de todos os problemas e acreditar que a vida, que é o nosso dom mais precioso, deva ser vivida intensamente todos os dias. Amo você meu anjinho!*

*Agradeço especialmente a Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias pela sua dedicação ao ensino e à pesquisa e pelos seus preciosos ensinamentos, como orientadora e amiga nesses anos em que caminhamos juntas.*


*Bel, muito obrigada por acreditar em meu trabalho e por ter sido muito mais do que uma grande orientadora, um exemplo de competência e profissionalismo que guiou e continuará guiando a minha formação acadêmica e pessoal.*

*Agradeço também de modo muito especial ao Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno pela sua sabedoria, incentivo e exemplo de coragem e trabalho, além da grande amizade durante todos esses anos de convivência.*

*“O primeiro princípio do ensinar verdadeiro é que nada pode ser ensinado. Aquele que ensina não é um instrutor ou mestre de tarefas. É simplesmente alguém que ajuda e guia. Sua tarefa é sugerir e não impor. Ele, no fundo, não treina a mente do discípulo, apenas lhe mostra como aperfeiçoar seus instrumentos de conhecimento e o ajuda e o encoraja no processo. Ele não lhe transmite conhecimento, porém, mostra como adquiri-lo por si mesmo. Ele não faz aparecer o conhecimento que está dentro, apenas mostra onde se situa e como pode subir à superfície”*

*(Anônimo)*

## *Agradecimentos*

*Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido que possibilitou a realização deste trabalho (Processo nº 04/01768-0).*

*Aos docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, Profa. Dra. Carminá da Cruz-Landim, Profa. Dra. Doralice Maria Cella e Prof. Dr. José Chaud Netto por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas e pelo carinho que sempre me transmitiram.*

*Aos técnicos de laboratório Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte e Rogilene Aparecida Prado pelos serviços técnicos prestados, além da grande amizade construída durante todos esses anos.*

*A secretária Lucila de Lourdes Segalla Franco pela atenção e ajuda dispensada e, em especial, a desenhista Cristiane Marcia Miléo, pelo auxílio na confecção das imagens.*

*Ao Eduardo Arrivabene Diniz, Itamar Cristina Reis e Lucimeire de Souza Ramos pelo fornecimento de insetos e pelo carinho que sempre me trataram.*

*Ao Alex Fernando de Almeida pelo auxílio no processamento das técnicas de análise química para lipídios e por estar sempre pronto a ajudar.*

*A todos os funcionários do Departamento de Biologia, Seção de Pós-Graduação e Biblioteca pela ajuda concedida.*

*A todos os meus amigos de pós-graduação pelos bons momentos compartilhados, pelas brincadeiras e pela inestimável ajuda com sugestões para a realização deste trabalho... Bruno, Fábio, Giovana, José Augusto, Márcia, Marielle, Reinaldo, Silvana, Thaísa, Thaís e Vagner.*

*Aos meus amigos de orientação pela grande amizade construída durante todos esses anos e, principalmente pelo ombro amigo, com que pude sempre contar... Débora, Érika, Juliana, Karim, Lorena, Patrícia, Pablo e Sandra.*

*As minhas queridas amigas Gabriela, Giselly e Fernanda por estarem sempre ao meu lado, me compreendendo e respeitanto e por fazerem parte da minha vida, dividindo comigo as angústias, as confidências, os sorrisos e as lágrimas.*

*As minhas amigas Aline e Carolina que mesmo distantes, continuam demonstrando carinho pela nossa amizade.*

*Em especial, a minha querida irmã Gisele pelo apoio, amor, dedicação, amizade e por estarmos sempre juntas a cada minuto de nossas vidas, dividindo os momentos de felicidade, de tristeza ou de inestimáveis perdas e também ao meu cunhado Renato, por serem os pais do menino mais lindo desse mundo!*

*E, a todos que de alguma maneira participaram da minha história de vida!*

*“As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem”*

*(Lílian Tonet)*



## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1. AS FORMIGAS.....	8
1.2. O CORPO GORDUROSO DOS INSETOS: ORIGEM, LOCALIZAÇÃO E FORMA .....	13
1.3. FISIOLOGIA E FUNÇÃO DOS TROFÓCITOS DO CORPO GORDUROSO .....	15
1.4. CÉLULAS DERIVADAS DOS TROFÓCITOS .....	17
1.5. CÉLULAS ASSOCIADAS AO CORPO GORDUROSO.....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1. MATERIAL .....	23
3.2. MÉTODOS .....	24
3.2.1. <i>Morfologia</i> .....	24
3.2.2. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	24
3.2.3. <i>Morfometria</i> .....	25
3.2.4. <i>Histologia</i> .....	25
3.2.4.1. Inclusão em resina (Historesina).....	25
3.2.5. <i>Histoquímica</i> .....	26
3.2.5.1. Técnica do Azul de Bromofenol para detecção de proteínas totais .....	26
3.2.5.2. Técnica do PAS/Alcian Blue para detecção de polissacarídeos ácidos e neutros .....	26
3.2.5.3. Técnica do Sudan Black B para detecção de lipídios totais.....	27
3.2.6. <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	27
3.2.7. <i>Citoquímica ultra-estrutural</i> .....	28
3.2.7.1. Técnica da Prata Amoniacal para detecção de proteínas básicas.....	28
3.2.7.2. Técnica do Ósmio Imidazol para detecção de lipídios insaturados .....	28
3.2.8. <i>Análise química</i> .....	29
3.2.8.1. Extração dos lipídios totais.....	29
3.2.8.2. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos .....	30
3.2.8.3. Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	30
3.2.8.4. Análise por padronização externa.....	31
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO 1:</b> Comparative study of the fat body in some genera of the Attini tribe (Hymenoptera: Formicidae).....	35
<b>CAPÍTULO 2:</b> Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection.....	39
<b>CAPÍTULO 3:</b> Fat body cells of gynes and queens of four species of fungus growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Relationship with the vitellogenesis.....	42
<b>CAPÍTULO 4:</b> Ultrastructural analyses of the fat body in workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae).....	45
<b>CAPÍTULO 5:</b> Chemical detection of proteins and lipids in the fat body cells from workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae).....	68
<b>CAPÍTULO 6:</b> Fat body cells of female reproductive castes of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae) focusing an ultrastructural and chemical analyses .....	92
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>117</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>128</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>132</b>

## RESUMO

O corpo gorduroso dos insetos é um tecido de preenchimento que está principalmente no abdômen e ao redor dos órgãos, onde é denominado de corpo gorduroso perivisceral, e logo abaixo do tegumento, ou corpo gorduroso parietal. No presente estudo avaliou-se a morfologia, a morfometria, a histoquímica e a citoquímica ultra-estrutural, além da química dos lipídios, das células do corpo gorduroso das operárias e “gynes” (fêmeas aladas) de formigas de *Cyphomyrmex rimosus* e de *Mycetarotes parallelus* e operárias médias e rainhas de *Acromyrmex disciger* e de *Atta laevigata* pertencentes à tribo Attini, com o objetivo de descrever os tipos celulares e analisar morfológica e fisiologicamente suas células, com vistas a detectar a ocorrência de possíveis variações neste tecido tanto entre as espécies quanto entre as castas, além de avaliar se existiriam diferenças entre as espécies basais e derivadas que possivelmente teriam surgido ao longo do processo evolutivo dos indivíduos pertencentes a esta tribo. Os resultados mostraram que em todas as espécies e castas o corpo gorduroso é constituído pelos trofócitos, células que se tornam poligonais devido à compressão de uma contra a outra, com núcleos irregulares e com presença de proteínas, polissacarídeos neutros e lipídios distribuídos por todo o citoplasma. Nas “gynes” e rainhas, em geral, esses elementos mostraram-se mais evidentes do que nas operárias. Verificou-se ainda que os trofócitos das castas reprodutivas seriam caracterizados pela presença de toda a estrutura relacionada à síntese de proteínas, elementos essenciais nos processos relacionados à vitelogênese. Os lipídios nos trofócitos das operárias e rainhas das espécies derivadas apareceram em maiores

quantidades do que nas operárias e “gynes” basais. Os enócitos, outro tipo celular freqüentemente associado aos trofócitos, mostraram-se esféricos ou poligonais em todas as espécies e castas, em geral com núcleos esféricos e com proteínas, lipídios e poucos polissacarídeos neutros distribuídos por todo o citoplasma. Da mesma forma que os trofócitos, os lipídios presentes nestas células foram mais evidentes nas espécies derivadas do que nas basais. As características morfológicas destas células sugerem sua participação na síntese de elementos lipoprotéicos da cutícula, além de, nas castas reprodutivas, estarem envolvidos na formação do cório dos ovos dos insetos. As análises ainda mostraram que os trofócitos e enócitos nas operárias e rainhas derivadas foram maiores em relação às operárias e “gynes” basais, sugerindo que nas primeiras a síntese e o acúmulo de elementos como lipídios e proteínas seria maior. A análise química dos lipídios mostrou que nas castas das espécies basais predominaram ácidos graxos saturados e nas das derivadas, tanto os saturados quanto os insaturados. Além disso, a produção de lipídios insaturados pelas células do corpo gorduroso das operárias derivadas provavelmente estaria diretamente relacionada com a atividade de forrageamento dessas espécies, uma vez que, também seriam precursores de feromônios. Assim sendo, com exceção das poucas modificações acima citadas, o presente estudo mostrou que as células do corpo gorduroso de todas as espécies de operárias, “gynes” e rainhas aqui analisadas, de modo geral, mantiveram os mesmos componentes e características morfológicas originais ao longo do processo evolutivo da tribo Attini.

## ABSTRACT

The insect fat body is a filling tissue which is distributed principally in the abdomen, around the organs (also known as perivisceral fat body) and right above the tegument (called the parietal fat body). The present study evaluated the morphology, morphometry, histochemistry and ultrastructural cytochemistry, as well the lipid chemistry, of the fat body cells of ant workers and gynes (winged females) of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and media workers and queens of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* belonging to the Attini tribe, with the objective of describing the cell types and the morphological and physiological analysis of their cells. This was done in an attempt to detect the occurrence of possible tissue variations between the species and castes, as well as evaluating if there are differences between the basal and derived species that may have surfaced during the evolution of these individuals belonging to this tribe. The results showed that in all species and castes the fat body is constituted of trophocytes, which are polygonal in shape due to the compression of one cell against another, and with irregular nuclei, proteins, neutral polysaccharides and lipids distributed all over the cytoplasm. In general, these elements were more evident in the gynes and queens than in the workers. It was also verified that the trophocytes of the reproductive castes are characterized by the presence of structures related to protein synthesis, essential elements in activities related to vitellogenesis. The lipids in the worker and queen trophocytes from the derived species are present in larger amounts when compared to the basal workers and gynes. The oenocytes, another cell type frequently associated to the trophocytes, are spherical in all species and castes, in

addition to spherical nuclei, proteins, lipids and a few neutral polysaccharides distributed all over the cytoplasm. Like the trophocytes, the lipids present in these cells were more evident in the derived species than in the basal ones. The morphological characteristics of these cells suggest their participation in the synthesis of the lipoproteic elements of the cuticle and also, in the reproductive castes, being involved in the formation of the egg chorium of insects. The analysis also showed that the trophocytes and oenocytes in the derived workers and queens are bigger when compared to the basal workers and gynes, suggesting that in the former the synthesis and accumulation of elements such as lipids and proteins would be more prevalent. The chemical analysis of the lipids showed that in the castes of the basal species the saturated fatty acids predominated, and in the derived species saturated and unsaturated were equally present. As well, the unsaturated lipids produced by the fat body cells from the derived workers would probably be directly related to the foraging of these species, since they would also be precursors of pheromones. With the exception of a few modifications, the present study showed that through analysis, the fat body cells in all species of workers, gynes and queens, in general, retained the same components and original morphological characteristics throughout the evolution of the Attini tribe.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. As formigas

As formigas dominam todos os tipos de ambientes terrestres, principalmente as regiões tropicais, atuando como animais benéficos ou maléficos ao homem (FITTKAU; KLINGE, 1973; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A sociedade das formigas é a mais complexa dentre aquelas conhecidas no reino animal, sendo comparável somente a dos cupins e de algumas espécies de abelhas e de vespas. Algumas espécies de formigas formam colônias que agrupam até 300 milhões de indivíduos em um só ninho, onde cada um desempenha uma tarefa específica em prol do bem estar geral (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As formigas pertencem à família Formicidae, da ordem Hymenoptera, a qual também inclui as abelhas e as vespas. Esta família agrupa pelo menos 21 subfamílias atuais, com aproximadamente 300 gêneros dos quais cerca de 11.857 espécies já foram descritas (BOLTON, 2003; FERNÁNDEZ, 2003; AGOSTI; JOHNSON, 2006). Contudo, acredita-se que este número possa ultrapassar 20.000, distribuídas em 350 gêneros (BROWN Jr., 2000). Esta família ainda possuía 61 gêneros já extintos relacionados com as subfamílias atuais, além de 4 subfamílias extintas com 14 gêneros (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Uma colônia de formigas possui uma ou várias rainhas (mono ou poligínica, respectivamente), fêmeas férteis, que copulam com vários machos apenas uma vez na vida no início do seu ciclo reprodutivo (PAGE, 1986). Na espermateca elas armazenam

os espermatozoides recebidos dos machos, os quais constituirão o suprimento de células reprodutivas masculinas durante toda a sua vida (TSCHENKEL, 1987). Dessa forma, as rainhas são responsáveis pela dispersão, colonização de uma determinada área, fundação do ninho, bem como postura de ovos. Os ovos postos podem ser férteis (fecundados) ou tróficos (de alimentação). Estes últimos podem ser ovipositados pelas rainhas e também pelas operárias, no caso de algumas espécies, e servem de alimento para os demais indivíduos da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Após o acasalamento, as rainhas freqüentemente se recolhem a uma câmara e iniciam a fundação da colônia sem a ajuda de nenhum outro indivíduo ou membro da mesma espécie (claustral). As rainhas que possuem este hábito, logo após o início da fundação do ninho, alimentam-se dos ovos tróficos que são ricos em proteínas, como acontece nas rainhas de saúvas do gênero *Atta*. Dos ovos não fecundados, eclodem machos e dos fecundados fêmeas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Além das rainhas, as colônias de formigas possuem fêmeas potencialmente férteis, uma vez que, possuem aparelho reprodutor desenvolvido, as quais são denominadas de “gynes” (fêmeas aladas), podendo se tornar rainhas de fato no caso de haver fecundação (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As operárias geralmente são fêmeas estéreis, porém, no caso daquelas que põem ovos, estes ou dão origem a machos ou são tróficos. As operárias são indivíduos ou morfologicamente muito semelhantes (espécies monomórficas), ou podem ter tamanhos e formas diferentes (espécies polimórficas). As operárias jovens realizam as tarefas dentro do ninho, sendo divididas em subcastas ou nas chamadas castas operárias, com polietismo específico, enquanto as mais velhas saem para forragear. As operárias mais velhas dedicam-se à limpeza ou remoção do lixo do ninho, tarefa perigosa devido à exposição aos predadores ou ainda à susceptibilidade a infecções por fungos e vírus (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

De forma geral, as operárias desempenham funções variadas dentro da colônia, como cuidar da entrada do ninho, limpar e remover o lixo, defender, transportar alimentos e larvas durante a fase migratória, escavar galerias, cuidar das larvas e forragear (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As formigas do gênero *Atta* possuem uma casta operária muito diferenciada, a dos soldados, que tem a tarefa de defender a colônia. Estes indivíduos são maiores que

as demais operárias e possuem mandíbulas com forte musculatura que causa um grande aumento da cabeça (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A tribo Attini (subfamília Myrmicinae) se caracteriza por ser um grupo morfológicamente distinto limitado ao continente americano, possuindo 13 gêneros, 217 espécies (tabela 1) e aproximadamente 85 subespécies, ocorrendo principalmente nas regiões neotropicais (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; BROWN Jr., 2000; BOLTON, 2003; FERNÁNDEZ, 2003). Os limites para a distribuição das espécies são 40° N nos Estados Unidos da América (WEBER, 1970) e 44° S na Província de Chubut, Argentina (WEBER, 1970; FARJI-BRENER; RUGGIERO, 1994). Na América do Sul, as Attini somente não estão presentes em um pequeno trecho do oeste do Equador, na costa do Peru, no sudoeste da Bolívia e em todo o Chile, devido à barreira representada pela Cordilheira dos Andes (WEBER, 1966; FOWLER, 1983; FARJI-BRENER; RUGGIERO, 1994; QUIRÁN, 1998). Na América Central não ocorrem em algumas ilhas (COLL, 1997).

**Tabela 1:** Número de espécies por gênero encontrado na tribo Attini.

<b>Gêneros</b>	<b>Nº de espécies</b>
<i>Acromyrmex</i>	26
<i>Apterostigma</i>	34
<i>Atta</i>	15
<i>Cyphomyrmex</i>	37
<i>Mycetagroicus</i>	03
<i>Mycetarotes</i>	02
<i>Mycetophylax</i>	04
<i>Mycetosoritis</i>	04
<i>Mycocepurus</i>	04
<i>Myrmicocrypta</i>	24
<i>Pseudoatta</i>	01
<i>Sericomyrmex</i>	19
<i>Trachymyrmex</i>	44
<b>Total</b>	<b>217</b>

Fonte: adaptada por Ramos (2006).

Todas as espécies da tribo Attini cultivam um tipo de fungo simbiote que alimenta as formas larvais e os adultos (WEBER, 1972; SHULTZ; MEIER, 1995). Indubitavelmente o caso mais estudado é o das formigas cortadeiras dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Trachymyrmex*, que cortam folhas e produzem enzimas digestórias que são colocadas sobre o vegetal. A polpa vegetal é então depositada sobre o fungo que a utiliza como meio de cultura para poder crescer (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). As



larvas e rainhas alimentam-se desse fungo, bem como ingerem grande variedade de alimentos trazidos pelos outros indivíduos da colônia, como artrópodes terrestres mortos, ovos de artrópodes, restos de vertebrados, excrementos de aves e de outros animais, outros fungos ricos em proteínas, bem como sementes (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Além dos fungos, as operárias se alimentam de açúcares provenientes de frutas, nectários florais ou extraflorais e da seiva das folhas que cortam, além de secreções de homópteros e de hemípteros (STRADLING, 1991; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Os gêneros *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetagroicus*, *Apterostigma*, *Sericomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetarotes* e *Trachymyrmex* são considerados basais nas Attini, enquanto *Atta* e *Acromyrmex*, as populares saúvas e quenquéns, respectivamente, são considerados derivados. O gênero *Pseudoatta* é encontrado na Argentina e abrange espécies parasitas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; SHULTZ; MEIER, 1995; SHULTZ *et al.*, 1998; BROWN Jr., 2000; BOLTON, 2003).

Entretanto, existe grande controvérsia quanto à filogenia da tribo Attini, com relação à determinação de quais gêneros são os basais e quais os derivados (CURRIE *et al.*, 1999). As primeiras análises consideraram *Cyphomyrmex* basal, principalmente devido às características morfológicas e comportamentais que se tornaram mais complexas nos gêneros derivados, ou seja, *Acromyrmex* e *Atta*. Dessa forma, acredita-se que durante a evolução das Attini houve um aumento gradual no tamanho do corpo com conseqüente aparecimento de polimorfismo. Além disso, ocorreu o surgimento de outras características morfológicas, como tubérculos na superfície corporal, corpo piloso e cabeça cordiforme, além de um aumento no número de indivíduos da colônia, com conseqüente aumento de tamanho e complexidade da estrutura dos ninhos e mudanças no tipo de substrato utilizado para a fungicultura. Assim, as espécies basais alimentam seus fungos com sementes, fezes de animais, corpos de insetos, pedaços de frutas e vegetais mortos, enquanto que as derivadas, por meio da eficiente utilização de folhas frescas e flores fornecidas aos seus fungos simbiotes (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As estratégias de forrageamento em Attini também são diferentes entre as espécies basais e derivadas, passando pela procura quase que individual de substratos

localizados próximos aos ninhos no caso dos gêneros basais (WEBER, 1972), até grandes e conspícuas trilhas com centenas a milhares de operárias nos gêneros derivados (*Acromyrmex* e *Atta*), em direção aos vegetais que serão inspecionados e cortados (FOWLER, 1978).

Outros autores acreditam que o gênero *Myrmicocrypta* é que seria o mais basal de todos, enquanto que *Cyphomyrmex* ocuparia uma posição intermediária devido ao fato de cultivar dois tipos diferentes de fungo, sendo subdividido em dois grupos: **strigatus**, que cultiva um fungo micelial e **rimosus**, um fungo leveduriforme (SHULTZ; MEIER, 1995; PRICE *et al.*, 2003).

Atualmente, existem três hipóteses que tentam explicar a origem do comportamento do cultivo de fungo pelas Attini:

1 - As Attini teriam se originado de formigas coletoras de grãos e sementes e, com o crescimento e proliferação de fungos sobre esses materiais, esses insetos poderiam ter começado a utilizar essa nova fonte alimentar (von IHERING, 1894 apud HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

2 - O comportamento de cultivar fungos nas Attini poderia ter surgido a partir de ancestrais de Attini e ectomicorrizas estarem vivendo no mesmo ambiente, ou seja, dentro dos ninhos, nos quais estas últimas estariam associadas às raízes de plantas (GARLING, 1979).

3 - As ancestrais das Attini viviam sobre raízes em decomposição e teriam começado a se alimentar dos fungos que cresceriam sobre as mesmas ou sobre as fezes de outros insetos, os quais, por sua vez, também se alimentariam dessas raízes (FOREL, 1902 apud HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Porém, haveria uma variante, ou seja, as Attini ancestrais poderiam ter se alimentado de fungos que cresceriam sobre suas próprias fezes (WEBER, 1956 apud HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Diniz *et al.* (1998), estudando a biologia de *Blepharidatta conops* e baseados em hipóteses recentes, afirmaram que este gênero deve ser o mais próximo de Attini dentro de Myrmicinae, devido ao hábito de manterem suas larvas junto aos corpos de insetos mortos, sobre os quais podem crescer fungos, sugerindo que este hábito poderia ter representado um passo essencial para a fungicultura em Attini. Dessa forma, estes autores corroborariam a hipótese de von Ihering (1894 apud HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) para o surgimento do cultivo de fungos pelas Attini.

## 1.2. O corpo gorduroso dos insetos: origem, localização e forma

O corpo gorduroso dos insetos é um tecido que tem origem mesodérmica com crescimento na fase embrionária através do aumento do número e diferenciação das células já existentes. Durante a fase larval, ocorreria apenas o aumento do volume celular (CHAPMAN, 1998). Dessa forma, o corpo gorduroso dos insetos adultos se desenvolveria através da reorganização do tecido larval ou diferenciar-se-ia a partir de células-tronco eventualmente ainda presentes na pupa. Em *Aedes aegypti* foi descrito que o tecido larval persistiria no adulto (TRAGER, 1937 apud DEAN *et al.*, 1985), entretanto, Evans (1935 apud DEAN *et al.*, 1985) descreveu que em alguns Diptera ocorreria completa destruição do tecido larval (WHITTEN, 1962), enquanto que, Snodgrass (1935) relatou em Hymenoptera a completa autofagia dos enócitos larvais (células associadas aos trofócitos). Entretanto, em *Leptinotarsa* (Coleoptera), Labour (1974 apud DEAN *et al.*, 1985) observou que o processo de autofagia não seria uniforme no corpo gorduroso, e que somente em algumas regiões este tecido sofreria lise, enquanto que em outras permaneceria intacto, persistindo no adulto.

Nos insetos o corpo gorduroso apresenta-se como um agregado frouxo ou uma massa de células esbranquiçadas (SNODGRASS, 1935), organizadas em finas camadas com uma ou duas células de espessura. Também pode aparecer como pequenos cordões suspensos na hemocele, preenchendo as cavidades da cabeça, do tórax e do abdômen, funcionando como tecido de conexão entre os órgãos (GILLOTT, 1995; CHAPMAN, 1998).

O tecido gorduroso encontra-se distribuído por todo o corpo do inseto, sendo mais freqüentemente encontrado no abdômen, geralmente, sob duas formas: a camada parietal adjacente ao tegumento e aos músculos intersegmentares, e a perivisceral, localizada em torno de órgãos, como tubo digestório e ovários (CHAPMAN, 1998; GULLAN; CRANSTON, 2000).

As células do corpo gorduroso estão fracamente aderidas umas às outras, sendo que a consistência deste tecido é dada pelas ramificações de traqueíolas que ligam uma célula à outra ou as células a outros órgãos (CHAPMAN, 1998).

O grande contato das células do corpo gorduroso com a hemolinfa, segundo alguns autores, facilitaria a comunicação entre elas, possibilitando maiores trocas metabólicas (KING; AKAI, 1984; CHAPMAN, 1998).

Embora a este tecido seja atribuída a função de armazenamento de lipídios, que forneceria reservas nutritivas para serem utilizadas na dieta dos insetos (CRUZ-LANDIM, 1975; CHAPMAN, 1998), o corpo gorduroso também é considerado a principal fonte de proteínas, lipídios e carboidratos para a hemolinfa que servem como precursores para o metabolismo de diversas substâncias (KEELEY, 1985).

Além dessas funções, o corpo gorduroso atuaria no armazenamento e neutralização de substâncias não utilizáveis pelo inseto, podendo ser comparado ao fígado dos vertebrados, já que ambos armazenariam os nutrientes em excesso, presentes no meio circulante, desintoxicando-o e servindo como fonte biossintética para metabólitos que seriam liberados na circulação (KILBY, 1963; PRICE, 1973).

O corpo gorduroso atuaria também na diapausa, nos processos de muda da cutícula e na síntese e secreção de proteínas vitelogênicas dos ovócitos (KEELEY, 1985), como as vitelogeninas, proteínas com peso molecular de 180 kDa, ligadas a lipídios e carboidratos (KUNKEL; NORDIN, 1985). A síntese da vitelogenina especificamente corresponde à cerca de 70-90% das proteínas sintetizadas pelo corpo gorduroso das fêmeas adultas e aproximadamente 90% das proteínas do vitelo dos insetos (KEELEY, 1985). Sua presença há algum tempo atrás, era quase que exclusivamente associada à condição de postura exercida pelas fêmeas dos insetos, de tal modo que era denominada de “proteína específica da fêmea” (TELFER, 1954, 1960; HAGEDORN; KUNKEL, 1979). Contudo, essa proteína está presente também na hemolinfa de machos (TRENCZEK *et al.*, 1989).

As principais células do corpo gorduroso, ou seja, os trofócitos, são descritas como possuindo um grande núcleo irregular, em geral, deslocado para a periferia e com muitos nucléolos, além de diferentes tipos de substâncias armazenadas no citoplasma (LOCKE, 1984; GILLOTT, 1995; CHAPMAN, 1998).

Os trofócitos também são denominados de adipócitos, designação esta imprópria, uma vez que, estas células não são simples depósitos de lipídios, apresentando também funções de armazenamento de proteínas e carboidratos. No presente trabalho a terminologia adotada foi trofócito. Cabe lembrar que outras células de outros tecidos também recebem de alguns autores a mesma denominação, como por exemplo, as células nutridoras presentes nos ovários meroísticos dos insetos (CHAPMAN, 1998).

As principais características ultra-estruturais dos trofócitos mostram que eles estão apoiados numa delgada lâmina basal e possuem citoplasma com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, mitocôndrias, peroxissomos, lisossomos e corpos multivesiculares, além de lipídios, proteínas, carboidratos e uratos (LOCKE, 1984; CRUZ-LANDIM, 1985a, DEAN *et al.*, 1985; KEELEY, 1985; CAETANO *et al.*, 1993). A presença destas organelas sugere que os trofócitos seriam capazes de realizar síntese, absorção e armazenamento de materiais, principalmente aqueles vindos da hemolinfa (LOCKE; COLLINS, 1966; PRICE, 1973; THOMSEN; THOMSEN, 1978; WYATT, 1980).

Os lipídios são armazenados como gotículas que podem ocupar grandes extensões do citoplasma. As proteínas formam grânulos eletrondensos de tamanhos e formas variados e, em alguns casos, apresentam-se na forma de cristais. Os carboidratos aparecem na forma de glicogênio livre ou conjugado a lipídios e proteínas (WIGGLESWORTH, 1942; PRICE, 1973; THOMSEN; THOMSEN, 1978; WYATT, 1980; KEELEY, 1985; ROSELL; WHEELER, 1995).

A histofisiologia do corpo gorduroso pode ser influenciada por diversos fatores como ciclo de muda, estado nutricional e de desenvolvimento do inseto (COTTON; ANSTEE, 1991). Em embriões, larvas e adultos em fase de não alimentação os trofócitos são facilmente reconhecidos, pois seus núcleos são arredondados e seu citoplasma apresenta pequena quantidade de inclusões. Quando o inseto se encontra em fase larval mais avançada ou já se tornou adulto essas células tornam-se vacuolizadas, os núcleos se alongam e se ramificam, ficando seus limites pouco visíveis (GILLOTT, 1995).

### **1.3. Fisiologia e função dos trofócitos do corpo gorduroso**

Os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do corpo gorduroso têm sido estudados em diversos grupos de insetos (PRICE, 1973; THOMSEN; THOMSEN, 1978; LOCKE, 1984; DEAN *et al.*, 1985; KEELEY, 1985; PAES DE OLIVEIRA; CRUZ-LANDIM, 2003a), principalmente com relação aos trofócitos, bem como suas variações funcionais, pois estes constituem um modelo interessante de plasticidade (WIGGLESWORTH, 1942; ENGELMANN, 1971; BEHAN; HAGEDORN, 1978;

WYATT, 1980) e também por serem alvos dos principais hormônios dos insetos (COLLINS, 1969; ENGELMANN, 1976; DEAN, 1978; SAYAH *et al.*, 1994; BARBOSA-HETEM *et al.*, 1998).

Os trofócitos em algumas espécies de insetos possuem diferenças ultra-estruturais e funcionais quando comparadas as regiões parietal e perivisceral em todos os estágios de desenvolvimento, dentro dos grupos taxonômicos. Dados da literatura sugerem que em muitas espécies, o corpo gorduroso parietal estaria principalmente relacionado com a síntese e o armazenamento de lipídios, enquanto que o perivisceral com o de proteínas (DEAN *et al.*, 1985).

A principal característica ultra-estrutural dos trofócitos é o desenvolvido sistema vacuolar, que possui diferentes estruturas vesiculares, as quais podem ser classificadas como pré ou pós-transcricionais, devido ao seu conteúdo que ainda não foi (pré) ou que já tenha sido (pós) processado pelo complexo de Golgi (LOCKE, 1984).

Estas estruturas vesiculares são classificadas em duas categorias: a) vacúolos digestivos, que podem ser autofágicos, heterofágicos ou corpos multivesiculares e b) vacúolos de armazenamento contendo uratos, proteínas ou simbiontes, associados com depósitos de glicogênio e gotículas de lipídios (LOCKE, 1984).

Os vacúolos autofágicos dos trofócitos em *Calpodes* (Lepidoptera) foram caracterizados por conterem organelas em processo de digestão (LOCKE; COLLINS, 1965, 1968; LOCKE; SYKES, 1975; LOCKE, 1984), enquanto que, os corpos multivesiculares se originariam de vesículas pinocíticas formadas na superfície da membrana plasmática, conjugadas a lisossomos. Dependendo do estágio de desenvolvimento do inseto, estes corpos poderiam estar envolvidos principalmente no “turnover” de membranas ou na digestão de material extracelular, principalmente de proteínas (LOCKE; COLLINS, 1967; 1968).

Quando a fase larval termina, a síntese de proteínas nos trofócitos é interrompida e as proteínas são agora retiradas da hemolinfa e armazenadas sob a forma de grânulos (HAUNERLAND *et al.*, 1990). Entretanto, na fase de pré-pupa do inseto, pode ocorrer ainda síntese de alguns compostos, porém, em menores quantidades, enquanto que na pupa, a atividade lisossômica mobiliza as reservas acumuladas durante o estágio larval, a fim de suprir as necessidades energéticas desta fase de transformação (CRUZ-LANDIM, 1975, 1983; MARX, 1987).

Os trofócitos, do ponto de vista funcional, também armazenam carboidratos, principalmente na forma de glicogênio, que se constitui numa importante reserva de energia para os insetos. Outro tipo de carboidrato sintetizado nos trofócitos é a trealose, principal carboidrato circulante na hemolinfa (KEELEY, 1985).

O armazenamento de glicogênio nos tecidos adultos dos insetos não é constante durante a vida toda, estando susceptível a mudanças relacionadas às condições sazonais e fisiológicas (KEELEY, 1985). Em alguns insetos, o glicogênio é detectado nas células do corpo gorduroso durante os períodos de alimentação ativa. Um hormônio com atividade hiperglicêmica, produzido pelos *corpora allata*, seria responsável pela regulação da concentração de carboidratos na hemolinfa convertendo o glicogênio em trealose, via ativação da enzima glicogênio-fosforilase (RÖSELER; RÖSELER, 1986).

Com relação aos lipídios, o corpo gorduroso seria o principal tecido com síntese e armazenamento deste tipo de reserva, a maioria triglicerídios, que comumente constituiriam mais de 70% do peso seco do tecido, enquanto, os diglicerídeos circulariam na hemolinfa (KEELEY, 1985; CANAVOSO *et al.*, 2001). Os estoques de lipídios aumentariam durante o período de alimentação ativa e diminuiriam quando a alimentação cessasse. Os lipídios seriam também utilizados durante o vôo, ou ainda, durante a ovogênese (DOWNER, 1985; STEELE, 1985).

#### 1.4. Células derivadas dos trofócitos

Os trofócitos se apresentam com diversas formas, resultado de processos de especialização funcional. Os tipos celulares mais freqüentes, resultantes da sua diferenciação, são as células de urato ou urócitos, os micetócitos, os cromatócitos e as células de hemoglobina (CHAPMAN, 1998).

Os urócitos são especializados no armazenamento de uratos (TOJO *et al.*, 1978), possuindo reduzido retículo endoplasmático rugoso, poucas mitocôndrias e grandes vacúolos contendo grânulos de urato (LOCKE, 1984; DEAN *et al.*, 1985; KEELEY, 1985).

Os micetócitos são células que possuem microrganismos simbioses que ocupam grande parte do citoplasma (WÜEST, 1978; DEAN *et al.*, 1985; CHAPMAN, 1998).

Um raro tipo de trofócito modificado é o cromatócito, célula delgada e com um núcleo central proeminente. Assim como nos trofócitos, os cromatócitos acumulam lipídios durante os estágios larvais, reservas que são intensamente utilizadas durante o desenvolvimento do adulto (HINTON, 1958, 1959).

As células de hemoglobina são freqüentemente encontradas em insetos que não têm fluidos corpóreos envolvidos com transporte de gases respiratórios, como larvas de *Chironomus* (Diptera), *Gastrophilus* (Diptera) e larvas e adultos de *Anisops* e *Buenoa* (Hemiptera) (CHAPMAN, 1998). Estas células possuem uma molécula responsável pelo transporte de oxigênio. No entanto, também é descrita a função de remoção de proteínas de baixa massa molecular da hemolinfa dos insetos (DEAN *et al.*, 1985).

### 1.5. Células associadas ao corpo gorduroso

Associados às células do corpo gorduroso também são encontrados os enócitos, os quais têm origem ectodérmica (DEAN *et al.*, 1985), estando distribuídos por todo o corpo do inseto, localizados ou logo abaixo da epiderme ou em pequenos grupos próximos aos espiráculos e traquéias (EVANS, 1967). Porém, em muitas espécies, estas células aparecem distribuídas entre os trofócitos, tanto do corpo gorduroso parietal quanto do perivisceral (WIGGLESWORTH, 1972; DORTLAND; ESCH, 1979).

Os enócitos, de maneira geral, são células grandes, ovóides ou esféricas e com citoplasma acidófilo (DEAN *et al.*, 1985). Possuem núcleo central, poucas mitocôndrias, extensas áreas de retículo endoplasmático liso, numerosos vacúolos digestivos, figuras mielínicas e corpos multivesiculares (LOCKE, 1960; EVANS, 1967; CRUZ-LANDIM, 1985b).

Essas células absorvem substâncias da hemolinfa através de invaginações da membrana plasmática. Assim como os trofócitos podem apresentar depósitos de glicogênio (KEELEY, 1985). As funções desempenhadas pelos enócitos ainda não são bem conhecidas, no entanto, acredita-se que estas células sintetizem lipídios ou complexos lipoprotéicos que são depositados na epicutícula para formar uma superfície de impermeabilização e também atuar no reconhecimento entre as espécies e as castas da maioria dos insetos, especialmente nos insetos sociais, que dependem de percepção sensorial olfatória ou tátil obtida através dos hidrocarbonetos cuticulares, além de



servir como barreira à penetração de microrganismos (WIGGLESWORTH, 1970; DIELEPH, 1973, 1975; CRUZ-LANDIM, 1985b; DEAN *et al.*, 1985).

## 2. OBJETIVOS

As informações acima apresentadas mostram a importância das formigas Attini, bem como do corpo gorduroso dos insetos, não só no metabolismo e armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas, como também nos processos de reprodução, sintetizando proteínas específicas do vitelo. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivos principais:

- Descrever os tipos celulares, analisando morfológica e fisiologicamente as células presentes no corpo gorduroso de operárias e “gynes” de formigas das espécies basais de *Cyphomyrmex rimosus* Spinola e de *Mycetarotes parallelus* Emery e operárias médias e rainhas das espécies derivadas de *Acromyrmex disciger* Mayr e de *Atta laevigata* Smith, pertencentes à tribo Attini, empregando técnicas de microscopia de luz, eletrônica (de varredura e de transmissão) e de análise química, com vistas a detectar a ocorrência de possíveis variações deste tecido entre as espécies e entre as castas, informações estas escassas ou mesmo ausentes para esse grupo de Arthropoda.

- Comparar a morfologia das células do corpo gorduroso atentando também para a composição química das mesmas nas operárias, nas “gynes” e nas rainhas das espécies basais e derivadas, no intuito de identificar se existem e quais são as diferenças estruturais e químicas que possivelmente poderiam ter ocorrido ao longo do processo de evolução dessas espécies.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Para a realização do presente estudo foram utilizadas operárias na condição de forrageamento e “gynes” (fêmeas aladas) das espécies basais *Cyphomyrmex rimosus* e *Mycetarotes parallelus* (espécies monomórficas) e operárias forrageadoras médias e rainhas das espécies derivadas *Acromyrmex disciger* e *Atta laevigata* (espécies polimórficas), coletadas no campo (tabela 2). Parte delas foi imediatamente utilizada e parte mantida em ninhos artificiais nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

**Tabela 2:** Local de coleta das espécies basais de *Cyphomyrmex rimosus* e de *Mycetarotes parallelus* e derivadas de *Acromyrmex disciger* e de *Atta laevigata*.

Espécies	Local	Coordenadas geográficas
<i>Cyphomyrmex rimosus</i>	Ilhéus, BA, Brasil	14° 35' S 39° 02' W
<i>Mycetarotes parallelus</i>	UNESP - Campus Bela Vista, Rio Claro, SP, Brasil	22° 23' S 47° 32' W
<i>Acromyrmex disciger</i>	Núcleo Florestal Picinguaba, SP, Brasil	23° 21' S 44° 50' W
<i>Atta laevigata</i>	Fazenda Corumbataí Corumbataí, SP, Brasil	22° 17' S 47° 39' W

### 3.2. Métodos

Para a aplicação das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), morfometria, histologia, histoquímica, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), citoquímica ultra-estrutural para proteínas básicas e lipídios insaturados e análise química para lipídios todos os insetos foram anestesiados em freezer e dissecados com auxílio de estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução fisiológica (NaCl 7,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g/L) para insetos.

Foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências dos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia e dos Laboratórios do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

#### 3.2.1. Morfologia

A partir de secções histológicas medianas, as células do corpo gorduroso das espécies analisadas foram esquematizadas com auxílio de câmara clara acoplada a estereomicroscópio ZEISS.

#### 3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para os estudos de MEV, as operárias, “gynes” e rainhas das espécies acima citadas, foram dissecadas tendo o corpo gorduroso retirado e fixado em Karnovsky (Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2,5% em tampão Sorensen 0,1M), durante 24 horas. A seguir, o material foi lavado em água destilada e desidratado em concentrações crescentes de acetona (70%, 90%, 95%) e finalmente acetona pura, cada banho com duração de 5 minutos. Logo após, o material foi processado em “Critical Point Drying”, para completar a desidratação. Terminada esta etapa, o material foi colado com auxílio de fita adesiva dupla face em suportes de alumínio, metalizado com ouro através de “Sputtering”, examinado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS SEM 505.

### 3.2.3. Morfometria

A análise morfométrica das células do corpo gorduroso (trofócitos e enócitos) foi realizada a partir de secções histológicas medianas. Foram utilizados 05 indivíduos de cada espécie sendo que de cada indivíduo foi medida a área ( $\mu\text{m}^2$ ) de 10 trofócitos parietais e 10 periviscerais, e também de 10 enócitos parietais e 10 periviscerais, utilizando-se microscópio LDMB LEICA provido do programa Leica Qwin. O teste estatístico aplicado foi o de Tukey ( $p < 0,05$ ) (SIEGEL; CASTELLAN, 1988), com a finalidade de verificar diferenças significativas entre os trofócitos parietais e periviscerais e entre os enócitos parietais e periviscerais em todas as espécies aqui estudadas. Além disso, este teste avaliou diferenças significativas entre os trofócitos parietais e periviscerais entre indivíduos da mesma espécie, bem como entre enócitos.

### 3.2.4. Histologia (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

#### 3.2.4.1. Inclusão em resina (Histoiresina)

O corpo gorduroso das espécies em questão foi fixado em solução de Paraformaldeído a 4% e NaCl a 0,9% em tampão fosfato 10% (0,1M - pH 7,5) durante 24 horas. O material, a seguir, foi desidratado em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 15 minutos cada banho. Logo após, foi transferido para solução de Resina (JB-4 Polaron Instruments/Bio Rad) na ausência de catalisador, durante 24 horas em geladeira.

Posteriormente, as amostras foram transferidas para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Os moldes foram selados com suportes de alumínio para microtomia. Depois de polimerizados os blocos foram seccionados com o auxílio de Micrótopo Sorvall JB-4/Bio Rad. Os cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas foram submetidas à coloração pela Hematoxilina e Eosina durante 10 e 5 minutos, respectivamente. Em seguida foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá. Posteriormente, as secções foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio ZEISS.

### **3.2.5. Histoquímica**

As técnicas histoquímicas foram realizadas em secções histológicas, sendo que, o material, após ser dissecado, foi submetido a diferentes fixadores específicos para preservação de proteínas, polissacarídeos e lipídios.

#### **3.2.5.1. Técnica do Azul de Bromofenol para detecção de proteínas totais (PEARSE, 1985)**

O material foi retirado e fixado em Paraformaldeído a 4% e NaCl a 0,9% em tampão fosfato 10% (0,1M - pH 7,5) por aproximadamente 24 horas. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro e corados com solução de Azul de Bromofenol à temperatura ambiente durante 1 hora, sendo em seguida lavados em solução aquosa de ácido acético 0,5%, durante 5 minutos. Logo após as lâminas foram passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos. Em seguida, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá para posterior exame e documentação em fotomicroscópio ZEISS.

#### **3.2.5.2. Técnica do PAS/Alcian Blue para detecção de polissacarídeos ácidos e neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

O corpo gorduroso foi retirado e fixado em Bouin aquoso por 6 horas. Logo após foi seccionado e corado com Alcian Blue 1% pH 2,5 durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas contendo as secções foram lavadas em água destilada e passadas em ácido periódico 1% durante 5 minutos. Posteriormente, foram submetidas ao reativo de Schiff no escuro por 30 minutos, lavadas em água corrente durante 10 minutos, contra-coradas durante 5 minutos com Hematoxilina para evidenciação do núcleo e, finalmente lavadas em água corrente. Posteriormente, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá para serem examinadas e fotografadas em fotomicroscópio ZEISS.

### **3.2.5.3. Técnica do Sudan Black B para detecção de lipídios totais (PEARSE, 1985)**

O material foi retirado e fixado em Formol Cálcio 10% durante 6 horas. Depois de seccionado foi passado rapidamente em álcool 30%, corado com Sudan Black B durante 20 minutos, passado novamente no álcool 70% durante 2 minutos e, em seguida, lavado em água destilada durante 5 minutos para retirar o excesso da solução corante. Posteriormente, as secções foram submetidas à coloração pelo vermelho neutro 1% por 2 minutos, para contrastação do núcleo. Em seguida, as lâminas contendo as secções foram lavadas em água corrente, secas e montadas em glicerina gélica. Posteriormente, foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio ZEISS.

### **3.2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Os espécimes foram dissecados e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 2 horas. Foram então, realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), com duração de 15 minutos cada, e a pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M, durante 2 horas no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens de 15 minutos cada em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), sendo, posteriormente, contrastado em acetato de uranila 2% com acetona 10%, por 4 horas no escuro.

A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona 50, 70, 90 e 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material permaneceu em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 por 12 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador e colocado em estufa à 60°C por 24 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Sorvall-Porter Blum MT2-B. Os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%). As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. O material foi observado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS CM 100.

### **3.2.7. Citoquímica ultra-estrutural**

#### **3.2.7.1. Técnica da Prata Amoniacal para detecção de proteínas básicas (MACRAE; MELTZ, 1970)**

Os espécimes utilizados foram dissecados e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 2 horas e lavados durante 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2). A seguir, o material foi lavado em água destilada por 20 minutos e incubado em solução de prata amoniacal, durante 5 minutos à temperatura ambiente e sem agitação. Logo após, foi lavado novamente em água destilada durante 20 minutos e incubado à temperatura ambiente em solução de formaldeído 3% durante 5 minutos, posteriormente, foi lavado em água destilada por 20 minutos e em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 10 minutos. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) à temperatura ambiente durante 2 horas, no escuro. Finalmente, o material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 10 minutos, desidratado em séries crescentes de acetona 50, 70, 90 e 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material foi colocado em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 durante 12 horas. Após, procedeu-se à inclusão em resina pura com catalisador para polimerização em estufa à 60°C por 24 horas. Posteriormente, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo Sorvall-Porter Blum MT2-B, os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%) e os ultrafinos, coletados em grades de cobre, não passaram por contrastação, sendo diretamente observados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS CM 100.

#### **3.2.7.2. Técnica do Ósmio Imidazol para detecção de lipídios insaturados (ANGERMÜLLER; FAHIMI, 1982)**

Os espécimes utilizados foram dissecados e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 2 horas. O material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 15 minutos cada. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 2% em tampão imidazol 0,1M (pH 7,5), durante 30



minutos à temperatura ambiente e no escuro. Ao término desse período de incubação, o material foi lavado em tampão imidazol 0,1M (pH 7,5) por 15 minutos, seguido de duas lavagens em PBS durante 15 minutos cada. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona 50, 70, 90 e 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material permaneceu em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 por 12 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador e polimerizado em estufa à 60°C por 24 horas. Posteriormente, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo Sorvall–Porter Blum MT2-B, os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%) e os ultrafinos, coletados em grades de cobre, não foram contrastados, sendo, a seguir, observados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS CM 100.

### 3.2.8. Análise química

Para a realização da análise química foi realizado um estudo piloto a fim de se determinar a quantidade ideal de material a ser dissecado para uma adequada extração de lipídios. Dessa forma, o corpo gorduroso total (parietal e perivisceral) de 50 operárias e 20 “gynes” de *C. rimosus*, 40 operárias e 15 “gynes” de *M. parallelus*, 30 operárias médias e 10 rainhas de *A. disciger* e 25 operárias médias e 8 rainhas de *A. laevigata* foi retirado em solução fisiológica para insetos e armazenado em tubos de ensaio âmbar fechado com tampa e mantido em freezer para conservação das suas propriedades químicas até o momento de ser analisado.

#### 3.2.8.1. Extração dos lipídios totais (FOLCH *et al.*, 1957)

Em cada amostra foi adicionado 1,0 mL de clorofórmio e 0,5 mL de metanol, deixando-se à temperatura ambiente por 24 horas. A esta mistura foi adicionado ¼ do volume total de solução salina KCl 0,85%, para a separação das fases, uma correspondente ao clorofórmio que contém os lipídios e a outra ao metanol com KCl e os compostos não lipídicos como proteínas e carboidratos. A fase inferior contendo clorofórmio foi cuidadosamente removida com pipeta Pasteur e transferida para outro

tubo. O solvente foi removido em atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente e os tubos foram colocados em dessecador sob vácuo.

### **3.2.8.2. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos**

A determinação da composição de ácidos graxos dos lipídios por cromatografia gasosa é precedida de esterificação ou transesterificação para formar os ésteres metílicos que aumentam a volatilidade destes compostos e proporcionam análises mais adequadas. Dessa forma, foram utilizadas a esterificação e transesterificação catalisada por base.

Para isso, foram adicionados a cada amostra contida nos tubos 50 µL de solução de hidróxido de sódio metanólico 2M. As amostras foram então mantidas em agitador para tubos Phoenix AT56 por 30 segundos e deixadas em repouso por 30 minutos, sendo posteriormente adicionado a cada uma delas 100 mg de cloreto de cálcio anidro para absorver as moléculas de água formadas durante a esterificação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 8 minutos. A fase superior foi coletada e injetada no cromatógrafo a gás Finnigan–Tremetrics 9001.

### **3.2.8.3. Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa**

Após a metilação das amostras de lipídios totais, os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás com coluna FFAP (Free Fatty Acid Phase) de 30 metros com filme de 1 µm, com as seguintes especificações: fluxo de hidrogênio = 20 mL/min, fluxo de nitrogênio = 25 mL/min, fluxo de ar sintético = 175 mL/min, gás de arraste = hidrogênio, pressão de trabalho = 4 psi, temperatura do injetor = 210°C, temperatura do detector = 250°C, divisão da amostra = 10:1, temperatura da coluna de 50°C por 1 minuto, com programação de 45°C por minuto até 190°C mantendo por 1 minuto, seguindo 2°C por minuto até 196°C mantendo por 2 minutos e 10°C por minuto até 336°C mantendo por 3 minutos.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por meio da integração dos componentes da amostra com os dos padrões (Sigma) dos ésteres metílicos dos ácidos

graxos através do Programa Borwin instalado em computador acoplado ao cromatógrafo a gás.

#### **3.2.8.4. Análise por padronização externa**

Foram preparadas amostras para calibração contendo diferentes concentrações do padrão do éster metílico dos ácidos mirístico (AM C14:0), palmítico (AP C16:0), esteárico (AE C18:0), oléico (AO C18:1) e linoléico (AL 18:2), que foram injetadas no cromatógrafo a gás. Após a identificação das respectivas áreas dos picos, determinou-se a equação da reta colocando-se a concentração na abscissa e a área dos picos na ordenada (CIOLA, 1985).

#### 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho são apresentados na forma de capítulos, onde cada um contém um artigo submetido ou já publicado em periódico internacional e especializado.

Cada capítulo contempla diferentes aspectos do corpo gorduroso de operárias, “gynes” e rainhas de espécies basais e derivadas de formigas pertencentes à tribo Attini, com a finalidade de atingir os objetivos propostos.

##### **CAPÍTULO 1:**

Comparative study of the fat body in some genera of the Attini tribe (Hymenoptera: Formicidae)

**Autores:** Gislaine Cristina Roma, Odair Corrêa Bueno e Maria Izabel Camargo Mathias

**Periódico:** Sociobiology, v. 45, n. 2, p. 449-462, 2005.

##### **CAPÍTULO 2:**

Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection

**Autores:** Gislaine Cristina Roma, Maria Izabel Camargo Mathias e Odair Corrêa Bueno

**Periódico:** Micron, v. 37, n. 3, p. 234-242, 2006.

**CAPÍTULO 3:**

Fat body cells of gynes and queens of four species of fungus growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Relationship with the vitellogenesis

**Autores:** Gislaine Cristina Roma, Maria Izabel Camargo Mathias e Odair Corrêa Bueno

**Periódico:** American Journal of Agricultural and Biological Science, v. 1, n. 3, p. 48-57, 2006.

**CAPÍTULO 4:**

Ultrastructural analyses of the fat body in workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae)

**Autores:** Gislaine Cristina Roma, Odair Corrêa Bueno e Maria Izabel Camargo Mathias  
Submetido ao periódico Animal Biology (2007).

**CAPÍTULO 5:**

Chemical detection of proteins and lipids in the fat body cells from workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae)

**Autores:** Gislaine Cristina Roma, Maria Izabel Camargo Mathias e Odair Corrêa Bueno  
Submetido ao periódico Cell Biology International (2007).

**CAPÍTULO 6:**

Fat body cells of female reproductive castes of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae) focusing an ultrastructural and chemical analyses

**Autores:** Gislaine Cristina Roma, Odair Corrêa Bueno e Maria Izabel Camargo Mathias  
Submetido ao periódico Journal of Morphology (2007).

**COMPARATIVE STUDY OF THE FAT BODY IN SOME GENERA OF THE  
ATTINI TRIBE (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Gislaine Cristina Roma; Odair Corrêa Bueno, Maria Izabel Camargo Mathias \*

Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual  
Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

**Running Title:** Fat body in Attini

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135. E-mail address: micm@rc.unesp.br

## Resumo

As espécies de formigas *Cyphomyrmex rimosus* Spinola e *Mycetarotes parallelus* Emery, consideradas basais, e *Acromyrmex disciger* Mayr e *Atta laevigata* Smith, consideradas derivadas, têm o corpo gorduroso distribuído principalmente no gáster, ao redor de órgãos e imediatamente abaixo da cutícula. O corpo gorduroso é formado pelos trofócitos, que são caracterizados pela sua pronunciada vacuolização do citoplasma e morfologia irregular de seus núcleos, causada pela compressão exercida pelos vacúolos citoplasmáticos. Em *C. rimosus*, os núcleos são mais regulares, apresentando forma oval ou estrelada. Em *A. disciger* e *A. laevigata* os núcleos apresentam cromatina na forma de cordões, enquanto em *C. rimosus* e *M. parallelus* a mesma está distribuída uniformemente no nucleoplasma, aparecendo muito condensada na última espécie. Os trofócitos parietais de *A. disciger* mostram citoplasma com menor quantidade de pequenos vacúolos comparados àqueles da região perivisceral, o oposto do observado em *C. rimosus*. Em *A. laevigata* e *M. parallelus* não são observadas diferenças no citoplasma entre as células de ambas as regiões. Nos trofócitos de *C. rimosus*, *A. disciger* e *A. laevigata* é observado um aspecto reticular do citoplasma nas regiões entre os vacúolos, o que não é visto em *M. parallelus*. Outro tipo celular, o enócito, é encontrado associado às células do corpo gorduroso, estando disperso entre e em íntimo contato com os trofócitos, no entanto, sem fusão de membranas entre eles. Os enócitos têm forma esférica e são menores que os trofócitos; eles têm citoplasma acidófilo com pouca quantidade de pequenos vacúolos e núcleos esféricos.

**Palavras-chave:** *Cyphomyrmex rimosus*, *Mycetarotes parallelus*, *Acromyrmex disciger*, *Atta laevigata*, corpo gorduroso, formigas

**Artigo publicado no periódico Sociobiology, v. 45, n. 2, p. 449-462, 2005.**



**FAT BODY IN SOME GENERA OF LEAF-CUTTING ANTS  
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE). PROTEINS, LIPIDS AND  
POLYSACCHARIDES DETECTION**

Gislaine Cristina Roma <sup>a</sup>; Maria Izabel Camargo Mathias <sup>a,\*</sup>; Odair Corrêa Bueno <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brazil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

<sup>b</sup> Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brazil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35264136. E-mail address: micm@rc.unesp.br

### Resumo

A análise histoquímica comparativa do corpo gorduroso das operárias das espécies basais *Cyphomyrmex rimosus* e *Mycetarotes parallelus* e das espécies derivadas *Acromyrmex disciger* e *Atta laevigata* revelou que este tecido é constituído principalmente por células denominadas trofócitos e enócitos. Os trofócitos de todas as espécies aqui estudadas foram caracterizados principalmente pela síntese e armazenamento de proteínas e lipídios, sendo que nas espécies derivadas observou-se maior quantidade de lipídios nos trofócitos do que nas espécies basais. Em operárias *M. parallelus* e *A. laevigata*, além de proteínas e lipídios, também se observou a presença de polissacarídeos, no entanto, em *C. rimosus* e *A. disciger* esses elementos foram detectados em menores quantidades. Os estudos histoquímicos dos enócitos das espécies basais e derivadas revelou a presença significativa de proteínas, bem como de lipídios nessas células. Nos enócitos das espécies derivadas *A. disciger* e *A. laevigata* observou-se maior quantidade de inclusões lipídicas, quando comparadas às espécies basais.

**Palavras-chave:** formigas, tribo Attini, operárias, corpo gorduroso, proteínas, lipídios, polissacarídeos

**FAT BODY CELLS OF GYNES AND QUEENS OF FOUR SPECIES OF  
FUNGUS GROWING ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE: ATTINI).  
RELATIONSHIP WITH THE VITELLOGENESIS**

G. C. Roma <sup>a</sup>, M. I. Camargo-Mathias<sup>a,\*</sup>, O. C. Bueno <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

<sup>b</sup> Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35340009. E-mail address: micm@rc.unesp.br

### Resumo

A análise morfométrica das células do corpo gorduroso das “gynes” de *Cyphomyrmex rimosus* e *Mycetarotes parallelus* e das rainhas de *Acromyrmex disciger* e *Atta laevigata* revelou diferenças significativas entre as áreas dos trofócitos parietais e periviscerais em todas as espécies estudadas, o mesmo sendo relatado para os enócitos parietais e periviscerais. Entretanto, não foram observadas diferenças quando as áreas dos enócitos das “gynes” são comparadas entre si. O estudo morfológico dos trofócitos parietais e periviscerais das “gynes” e rainhas revelou que estes foram esféricos ou poligonais, contendo muitos vacúolos e núcleo freqüentemente irregular. Essas células apresentaram proteínas, lipídios e polissacarídeos neutros, porém, nas “gynes” os dois primeiros compostos reagiram fracamente ao contrário do observado nas rainhas. Os enócitos parietais e periviscerais de todas as espécies estudadas apresentaram-se geralmente esféricos e vacuolizados, especialmente nas espécies *C. rimosus* e *A. laevigata*, onde os vacúolos apareceram em maior quantidade. Os núcleos dos enócitos nas “gynes” mostraram-se esféricos ou ovais, enquanto que nas rainhas a maioria era irregular. O citoplasma dos enócitos foi fortemente positivo para proteínas e fracamente positivo para polissacarídeos neutros em todas as espécies estudadas. As “gynes” apresentaram fraca reação para lipídios quando comparadas com as rainhas.

**Palavras-chave:** trofócito, enócito, morfologia, morfometria, histoquímica

**ULTRASTRUCTURAL ANALYSES OF THE FAT BODY IN WORKERS OF  
ATTINI ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Gislaine Cristina Roma <sup>a</sup>, Odaír Corrêa Bueno <sup>a,b</sup>, Maria Izabel Camargo Mathias <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

<sup>b</sup> Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

**Running Title:** Fat body cells of Attini ants workers

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35340009. E-mail address: micm@rc.unesp.br

## Resumo

O presente estudo realizou uma análise morfológica comparativa das células do corpo gorduroso de operárias de formigas das espécies basais das Attini *Cyphomyrmex rimosus* e *Mycetarotes parallelus* e das derivadas *Acromyrmex disciger* e *Atta laevigata*, atentando para as diferenças que possam implicar na filogenia desta tribo. Observou-se que o corpo gorduroso está distribuído principalmente no abdômen, ao redor de órgãos (perivisceral) e próximo ao tegumento (parietal). As principais células encontradas são os trofócitos com forma esférica ou poligonal e superfície ligeiramente enrugada. Os enócitos, outro tipo celular, estão intimamente associados aos trofócitos com superfície mais lisa e forma esférica ou poligonal. A análise morfométrica mostra que a área dos trofócitos e dos enócitos em *C. rimosus* e *M. parallelus* é significativamente menor quando comparada à área dessas mesmas células em *A. disciger* e *A. laevigata*. No citoplasma dos trofócitos e dos enócitos parietais e periviscerais são encontrados gotículas eletrólucidas e grânulos eletrondensos, indicando a participação destas células na síntese, armazenamento e metabolismo de lipídios e proteínas, respectivamente, além da presença de vacúolos digestivos, corpos residuais e multivesiculares, estruturas estas que indicam função de digestão intracelular. Nos trofócitos e enócitos periviscerais de *C. rimosus* a presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso lamelar e complexo de Golgi, indicam que estas células estão realizando síntese protéica.

**Palavras-chave:** trofócito, enócito, morfologia, morfometria, ultra-estrutura, formigas

### Abstract

In the present study, were conducted a comparative morphological analysis of the fat body cells of ant workers of the basal Attini species *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus*, and the derived species *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*, focusing on differences that could lead to phylogenetic implications for this tribe. These findings revealed that the fat body is located mainly in the abdomen around organs (perivisceral) and near the tegument (parietal). The main cells observed are spherical or polygonal trophocytes with a slightly rough surface. The oenocytes, another cell type found, are closely associated with trophocytes, and present a spherical or polygonal shape and a smoother surface. The morphometric analysis shows that the area of trophocytes and oenocytes of *C. rimosus* and *M. parallelus* is significantly smaller when compared to those of *A. disciger* and *A. laevigata*. In the cytoplasm of parietal and perivisceral trophocytes and oenocytes, electronlucent droplets and electrondense granules indicate the participation of these cells in the synthesis, storage, and metabolism of lipids and proteins, respectively, while digestive vacuoles, residual bodies, and multivesicular bodies suggest a role in intracellular digestion. In perivisceral trophocytes and oenocytes of *C. rimosus*, the presence of mitochondria, lamellar rough endoplasmic reticulum, and Golgi complex suggests that these cells synthesize proteins.

**Keywords:** trophocyte, oenocyte, morphology, morphometry, ultrastructure, ants

## Introduction

The Attini tribe consists of approximately 217 ant species that grow symbiotic fungi, the staple food of their colonies (Hölldobler and Wilson, 1990). These species are distributed between basal genera, such as *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycocarpurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetagroicus*, *Apterostigma*, *Sericomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetarotes* and *Trachymyrmex*, and derived genera, such as *Atta* and *Acromyrmex*. The latter are commonly named leaf-cutting ants and are serious pests considered dominant herbivores in the neotropics (Hölldobler and Wilson, 1990, Bolton, 2003). The genus *Pseudoatta* consists of parasite species (Bolton, 2003).

The insect body is filled with a tissue termed fat body, which in addition to this role, is the site of intermediary metabolism of several compounds. It also plays roles in the synthesis and storage of proteins, lipids, and carbohydrates (Palli and Locke, 1988), and is characterized by sheets or string of cells, usually one or two cells thick, or even forming small nodes in the hemocele connected to one another or to other tissues by tracheal branches (Keeley, 1985, Rosell and Wheeler, 1995, Chapman, 1998).

Trophocytes are the main cells of the insect fat body. These cells may give rise to other cell types, as a result of a functional specialization, such as urate cells or urocytes, mycetocytes, and chromatocytes (Dean et al., 1985, Chapman, 1998).

Oenocytes, another cell type commonly associated with insect fat body cells, play roles in lipid metabolic processes (Keeley, 1985, Chapman, 1998).

Given the scarce data available on the internal morphology of ants of the basal and derived genera of the Attini tribe, the present study comparatively described the morphology, morphometry, and ultrastructure of parietal and perivisceral trophocytes and oenocytes of workers of the basal species *Cyphomyrmex rimosus* Spinola and *Mycetarotes parallelus* Emery and media workers of the derived species *Acromyrmex disciger* Mayr and *Atta laevigata* Smith, attempting to new information that could contribute to the understanding of their physiology and biology, and on differences that could lead to phylogenetic implications of this tribe.



## Material and Methods

The present study used the parietal and perivisceral fat body from workers of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* (monomorphic species) and media workers of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* (polimorphic species), collected in the field and immediately submitted to the techniques. The individuals were anesthetized by cooling in a freezer and dissected on Petri dishes with physiological saline solution for insects (NaCl 7,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g/L).

### *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

The parietal and perivisceral fat body from workers was removed, fixed in Karnovsky for 24 hours and dehydrated in a graded 70 – 100% acetone series. The material was processed by Critical Point Drying, sputtered with gold and examined by PHILIPS 505 SEM.

### *Morphometry*

The morphometric analysis of trophocytes and oenocytes was performed using median histological sections. For the present study were utilized 05 individuals of each species. For each individual, were obtained area measurements ( $\mu\text{m}^2$ ) of 10 parietal trophocytes and 10 perivisceral ones, and 10 parietal oenocytes and 10 perivisceral ones, with a LDMB LEICA microscope with the software Leica Qwin. The statistical test applied was the Tukey ( $p < 0,05$ ) (Siegel and Castellan, 1988) performed in order to verify significant differences among the parietal and perivisceral trophocytes and among the parietal and perivisceral oenocytes in all species studied here. Besides this, the statistic test evaluated the significant differences among the parietal and perivisceral trophocytes among individuals at the same species. The same procedure was applied to the oenocytes.

### *Ultrastructure - Transmission Electron Microscopy (TEM)*

The fat body was fixed in 2,5% glutaraldehyde fixative solution in 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2) for 2 hours. Two 15 minutes washes in cacodylate buffer followed this process. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide in 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2) for 2 hours, in the darkness followed by another two 15 minutes washes in the same buffer. For contrast, the material was immersed in a solution of 2% uranyl acetate in 10% acetone, for 4 hours, in the darkness. The dehydration was performed in a graded 50, 70, 90, 95 and 100% acetone series, for 5 minutes each. Then, the material was embedded in Epon resin diluted in acetone (1:1) for 12 hours, included in pure Epon resin and incubated at 60° C for 24 hours. After polymerized semithin sections were obtained with ultramicrotome Sorvall – Porter Blum MT2-B and stained with Azur II (1%) and Methylene Blue (1%).

Grids containing ultrathin sections of the material were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 45 minutes and 10 minutes, respectively. Then, they were analysed and photographed in a PHILIPS CM 100 Transmission Electron Microscopy.

## **Results**

### *Scanning Electron Microscopy*

The morphological analysis of the fat body of workers of *C. rimosus* and *M. parallelus* and media workers of *A. disciger* and *A. laevigata* shows that this tissue is characterized by a loose clump of cells located among organs (perivisceral) and adjacent to the tegument (parietal) (Figs. 1B, G, I, M).

In all species examined, parietal and perivisceral trophocytes are the main cell types observed (Figs. 1A–F, H, J–N). These cells are mostly spherical in shape, but may be polygonal due to the cell arrangement that compresses cells against each other (Figs. 1B, F, H, K, M).

The surface of trophocytes of all worker species examined is slightly rough (Figs. 1F, J).

In workers of *M. parallelus* and *A. laevigata*, some trophocytes are ruptured, releasing large quantities of cytoplasmic granules of varied size and possibly contents (Figs. 1D, M).

In parietal and perivisceral fat body, round or spherical oenocytes are dispersed among and associated with trophocytes. Oenocytes may also be polygonal in shape due to the compression of trophocytes (Figs. 1A-F, H, J, K, M). These are smaller cells with a smoother surface and present in fewer numbers compared to trophocytes (Figs. 1A-F, H, J, K, M).

Among tissue cells, membranous expansions from trophocytes surround and bind them to one another (Figs. 1F, L, N). Similarly, these expansions may also originate in oenocytes extending to trophocytes and binding these two cell types (Fig. 1C).

### *Morphometry*

The morphometric analysis of the fat body cells of workers reveals that the areas of parietal and perivisceral trophocytes of *C. rimosus* and *M. parallelus* are significantly smaller compared to those of *A. disciger* and *A. laevigata*. Similarly, oenocytes of media workers of the derived species are significantly larger than those of basal workers. However, no significant differences were observed in the areas of parietal and perivisceral trophocytes of ants of the same species. The same was obtained for oenocytes.

The morphometric results of parietal and perivisceral fat body cells of workers examined in this study are summarized in tables 1 and 2.

**Table 1:** Comparison of average area ( $\mu\text{m}^2$ ) of the trophocytes of the parietal and perivisceral fat body of workers of *C. rimosus* and *M. parallelus* and media workers of *A. disciger* and *A. laevigata*, through Tukey test ( $p < 0,05$ ).

		<i>C. rimosus</i>		<i>M. parallelus</i>		<i>A. disciger</i>		<i>A. laevigata</i>	
		1	2	1	2	1	2	1	2
<b>Average area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>		1.774,1	1.770,4	1.480,2	1.647,6	3.876,6	4.026,8	4.664,6	4.772,1
<i>C. rimosus</i>	1	—	ns	ns	ns	*	*	*	*
	2	ns	—	ns	ns	*	*	*	*
<i>M. parallelus</i>	1	ns	ns	—	ns	*	*	*	*
	2	ns	ns	ns	—	*	*	*	*
<i>A. disciger</i>	1	*	*	*	*	—	ns	*	*
	2	*	*	*	*	ns	—	*	*
<i>A. laevigata</i>	1	*	*	*	*	*	*	—	ns
	2	*	*	*	*	*	*	ns	—

(1) parietal trophocytes

(2) perivisceral trophocytes

(\*) average area with significant differences among the groups ( $p < 0,05$ )

(ns) no significant differences among the groups

**Table 2:** Comparison of average area ( $\mu\text{m}^2$ ) of the oenocytes of the parietal and perivisceral fat body of workers *C. rimosus* and *M. parallelus* and media workers of *A. disciger* and *A. laevigata*, through Tukey test ( $p < 0,05$ ).

		<i>C. rimosus</i>		<i>M. parallelus</i>		<i>A. disciger</i>		<i>A. laevigata</i>	
		1	2	1	2	1	2	1	2
<b>Average area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>		515,2	596,1	579,9	601,8	1.926,9	1.636,7	1.622,2	1.591,9
<i>C. rimosus</i>	1	—	ns	ns	ns	*	*	*	*
	2	ns	—	ns	ns	*	*	*	*
<i>M. parallelus</i>	1	ns	ns	—	ns	*	*	*	*
	2	ns	ns	ns	—	*	*	*	*
<i>A. disciger</i>	1	*	*	*	*	—	ns	ns	ns
	2	*	*	*	*	ns	—	ns	ns
<i>A. laevigata</i>	1	*	*	*	*	ns	ns	—	ns
	2	*	*	*	*	ns	ns	ns	—

(1) parietal oenocytes

(2) perivisceral oenocytes

(\*) average area with significant differences among the groups ( $p < 0,05$ )

(ns) no significant differences among the groups

### *Ultrastructure*

Parietal and perivisceral trophocytes of all species exhibit individual or fused basal lamina when two or more adjacent trophocytes are observed. The same may also occur between trophocyte and oenocyte (Figs. 2A, B, N, Q; 3C, E, J, Q, V, W). In parietal and perivisceral trophocytes of *A. laevigata*, the plasma membrane reticular system (PMRS) (Figs. 3Q, V), result of membrane invaginations, is observed.

In parietal and perivisceral trophocytes, electronlucent droplets of varied shapes and sizes, probably containing lipids, are present (Figs. 2C-E, R, S; 3C, F, L, M, O, Q, R). In addition to these, very electrondense granules are observed in parietal trophocytes of *M. parallelus*, and perivisceral trophocytes of *A. laevigata* (Figs. 2R; 3P, S), probably containing proteins.

The ultrastructural analysis of trophocytes of all species examined also shows the presence of digestive vacuoles (Figs. 2G, H; 3L, O, R), characterized by structures delimited by membranes, containing compounds being digested, which may be cell organelles or endocytized molecules.

In perivisceral trophocytes of *C. rimosus*, mitochondria (Figs. 2F, N), lamellar rough endoplasmic reticulum (Figs. 2H, N), and Golgi complex (Fig. 2F) forming the synthesis apparatus of these cells, in addition to free ribosomes (Fig. 2F).

The nuclei of parietal and perivisceral trophocytes of *A. disciger* and *A. laevigata* are very irregular (Figs. 3A, B, D, L). In *C. rimosus* and *M. parallelus*, nuclei of trophocytes are star or oval shaped (Figs. 2A, C, E).

Parietal and perivisceral oenocytes of the examined species exhibit individual or fused basal lamina in certain regions of adjacent oenocytes. The same is observed between oenocyte and trophocyte (Figs. 2M, N; 3J, T, V, W).

In *M. parallelus*, parietal oenocytes show basal lamina with long prolongations with cytoplasm in their interior. These structures, termed here membranous expansions, connect oenocytes to oenocytes, and oenocytes to trophocytes, without fusion of the cytoplasm of the involved cells (Fig. 2U).

In parietal oenocytes of *A. laevigata* the plasma membrane reticular system (PMRS) is also present (Fig. 3U).

In general, the cytoplasm of parietal and perivisceral oenocytes contains electronlucent droplets (Figs. 2I, M, O, W, Z; 3I, J, T), digestive vacuoles (Figs. 2P, X,

Y; 3H, Y, Z), residual bodies (Figs. 2K, W) and multivesicular bodies (Figs. 3I, K). In parietal oenocytes of *A. laevigata*, endocytic vesicles are also observed (Fig. 3U). In *C. rimosus*, these cells present lamellar rough endoplasmic reticulum (Fig. 2P), mitochondria (Figs. 2K, N), and free ribosomes (Fig. 2J), in addition to abundant glycogen deposits (Fig. 2L). The nuclei of these cells are round or oval shaped (Figs. 2I, V; 3G, H, W), and in some of them, the edges are irregular (Figs. 2I; 3G, X).

In the parietal fat body of *M. parallelus*, several tracheoles are also present (Fig. 2V).

Comparative analyses of the ultrastructural features of parietal and perivisceral oenocytes of workers of *C. rimosus* and *M. parallelus* and media workers of *A. disciger* and *A. laevigata* are summarized in tables 3 and 4.

**Table 3:** Ultrastructure features of the parietal and perivisceral fat body cells from workers of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus*.

Species	Trophocytes			Oenocytes
	Parietal	Perivisceral	Parietal	
<b>Structures</b>	<b>Parietal</b>	<b>Perivisceral</b>	<b>Parietal</b>	<b>Perivisceral</b>
<b>Basal Lamina</b>	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Figs. 2A, B)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Figs. 2M, N)
<b>C. rimosus</b>				
<b>Cytoplasm</b>	- electronlucent droplets from different shapes and sizes, some of them are apparently undergoing fusion (Figs. 2C, D)	- electronlucent droplets (Fig. 2E) - digestive vacuoles (Figs. 2G, H) - mitochondria (Fig. 2F) - Golgi complex (Fig. 2F) - free ribosomes (Fig. 2F) - lamellar rough endoplasmic reticulum (Figs. 2F, H)	- electronlucent droplets (Fig. 2I) - residual bodies (Fig. 2K) - mitochondria (Fig. 2K) - free ribosomes (Fig. 2J) - glycogen deposits (Fig. 2L)	- electronlucent droplets (Figs. 2M, O) - mitochondria (Fig. 2N) - lamellar rough endoplasmic reticulum (Fig. 2P) - digestive vacuoles (Fig. 2P)
<b>Nucleus</b>	- star or oval shaped (Figs. 2A, C)	- star or oval shaped with evident nucleolus (Fig. 2E)	- oval shaped with irregular edges (Fig. 2I)	- round or oval shaped
<b>M. parallelus</b>				
<b>Basal Lamina</b>	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Fig. 2Q)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes	- with membranous expansion which connect to the other oenocytes or trophocytes, however without cytoplasmic fusion (Fig. 2U)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes
<b>Cytoplasm</b>	- electronlucent droplets from different shapes and sizes of them are apparently undergoing fusion (Fig. 2R)	- electronlucent droplets from different shapes and sizes, some of them are apparently undergoing fusion (Fig. 2S) - electrondense granules (Fig. 2R) - mitochondria (Fig. 2Q)	- electronlucent droplets (Fig. 2W) - digestive vacuoles (Fig. 2X) - residual bodies (Fig. 2W)	- electronlucent droplets (Fig. 2Z) - digestive vacuoles (Fig. 2Y)
<b>Nucleus</b>	- star shaped	- star shaped	- round or oval shaped (Fig. 2V)	- round or oval shaped

**Table 4:** Ultrastructure features of the parietal and perivisceral fat body cells from media workers of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*

Species	Trophocytes			Oenocytes		
	Structures	Parietal	Perivisceral	Parietal	Perivisceral	
<i>A. disciger</i>	<b>Basal Lamina</b>	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Fig. 3C)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Fig. 3E)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Fig. 3G)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes, thinner the trophocytes (Fig. 3J)	
	<b>Cytoplasm</b>	- electronlucent droplets from different shapes and sizes (Fig. 3C)	- electronlucent droplets from different shapes and sizes (Fig. 3F)	- electronlucent droplets (Fig. 3I) - digestive vacuoles (Fig. 3H) - multivesicular bodies (Fig. 3I)	- electronlucent droplets (Fig. 3I) - multivesicular bodies (Fig. 3K)	
	<b>Nucleus</b>	- extremely ramified, with fine and long prolongations (Figs. 3A, B)	- extremely ramified, with fine and long prolongations (Fig. 3D)	- round or oval shaped, some with irregular edges (Figs. 3G, H) - evident nucleolus (Fig. 3G)	- round or oval shaped	
<i>A. laevigata</i>	<b>Basal Lamina</b>	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Fig. 3Q)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Figs. 3T, V)	- individual and/or fused to the other trophocytes and/or oenocytes (Fig. 3W)	
	<b>Cytoplasm</b>	- electronlucent droplets from different shapes and sizes, some of them are apparently undergoing fusion (Figs. 3L, M, O) - digestive vacuoles (Figs. 3L, O) - membranous remnants (Fig. 3N)	- electronlucent droplets (Figs. 3Q, R) - electrondense granules (Figs. 3P, S) - digestive vacuoles (Fig. 3R) - mitochondria (Fig. 3S)	- electronlucent droplets (Figs. 3T) - endocytic vesicles (Fig. 3U)	- digestive vacuoles (Figs. 3Y, Z)	
	<b>Nucleus</b>	- irregular, extremely ramified, with fine and long prolongations (Fig. 3L)	- irregular, extremely ramified, with fine and long prolongations	- round or oval shaped	- round or oval shaped, some with irregular edges (Fig. 3X)	

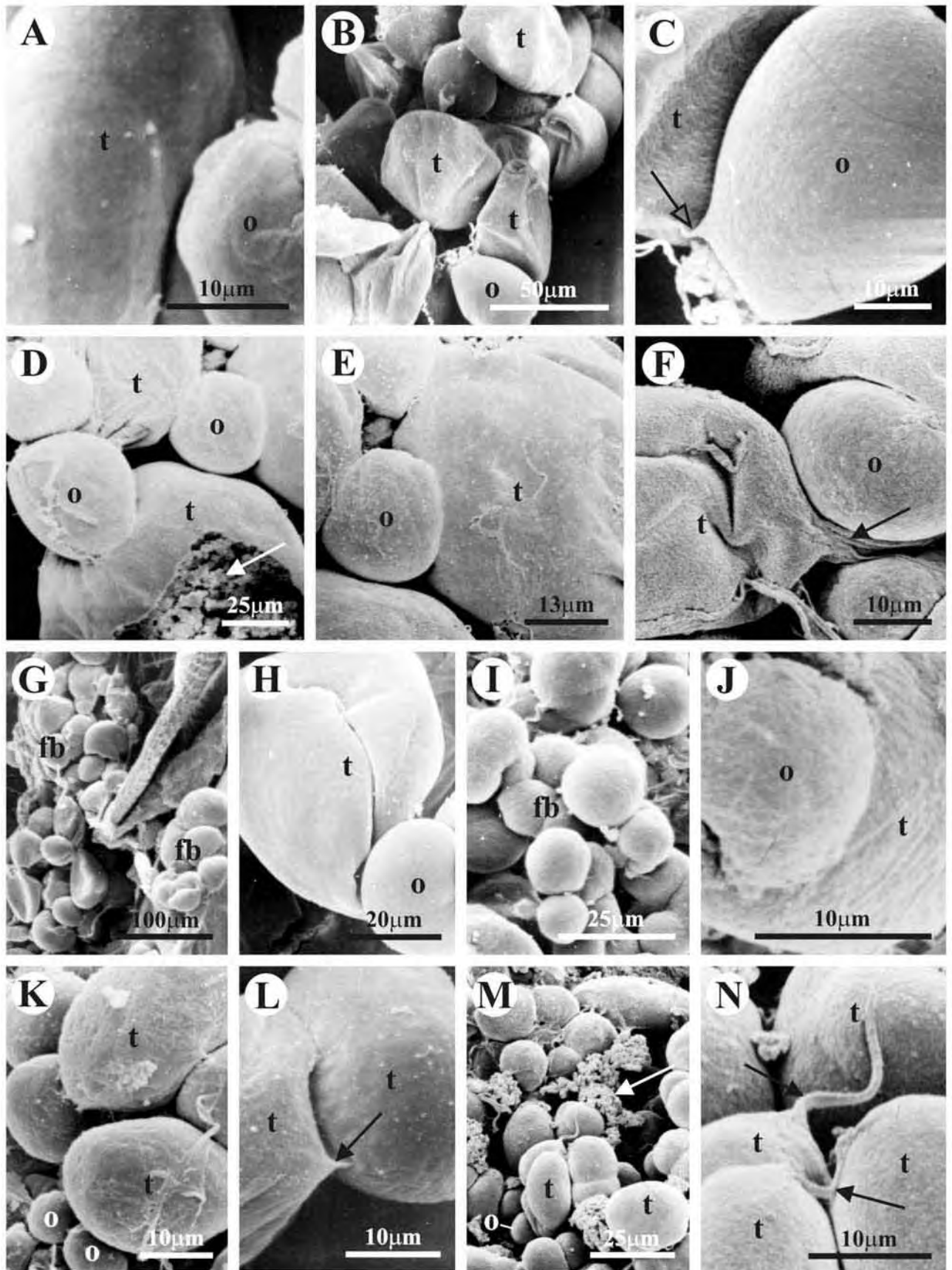


## *FIGURES*



**Figure 1:** Scanning Electron Microscopy (SEM) of the fat body cells from workers of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and media workers of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*.

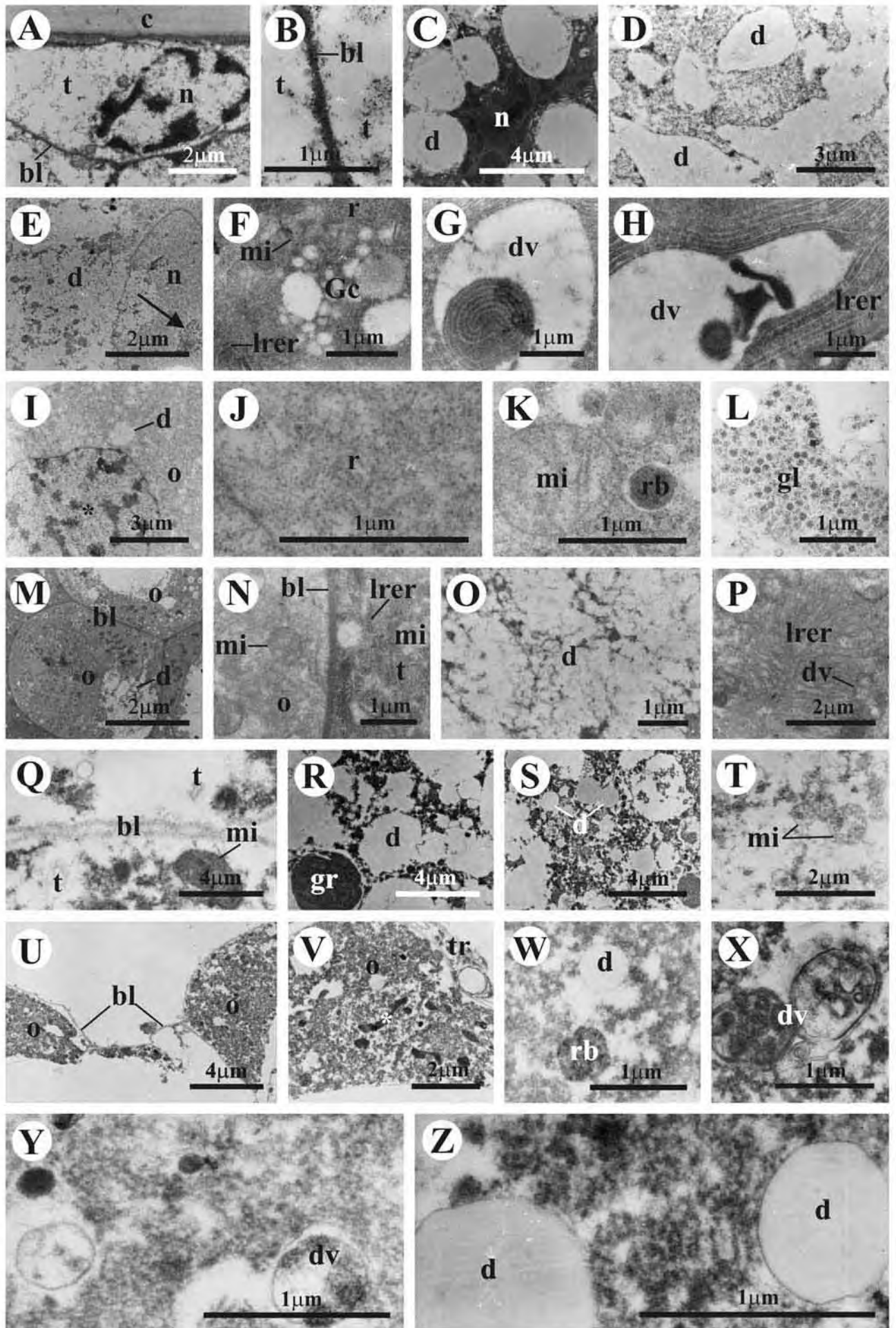
(A) Detail of the *C. rimosus* parietal fat body exhibiting trophocyte (**t**) and oenocyte (**o**). (B) General view and (C) detail of the *C. rimosus* perivisceral fat body showing the oenocyte membranous expansion (—▶). (D-E) Detail of the parietal fat body from *M. parallelus* exhibiting the granules in the cytoplasm trophocyte (**white arrow**). (F) *M. parallelus* perivisceral fat body showing trophocyte membranous expansion (—▶) and the slightly rough surface of the trophocytes. (G) General view of the *A. disciger* parietal fat body (**fb**) and (H) detail. (I) General view of the *A. disciger* perivisceral fat body and (J) detail, exhibiting the inner association between trophocytes (**t**) and oenocytes (**o**) and the slightly rough surface of the trophocytes. (K-L) Detail of the *A. laevigata* parietal fat body, showing the trophocyte membranous expansion (—▶). (M) General view and (N) detail of the *A. laevigata* perivisceral fat body exhibiting the granules in the trophocyte cytoplasm (**white arrow**) and the trophocyte membranous expansion (—▶).



**Figure 2:** Electron micrograph of the fat body cells from workers of the basal species of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus*.

(A-D) Detail of the *C. rimosus* parietal trophocytes (**t**) exhibiting the fusion of basal lamina (**bl**) from adjacent trophocytes. Observe the inner association between trophocytes and cuticle (**c**), star or oval shaped nucleus (**n**) and the electronlucent droplets (**d**). (E-H) *C. rimosus* perivisceral trophocytes showing the oval shaped nucleus (**n**), Golgi complex (**Gc**) and digestive vacuoles (**dv**). (I-L) Parietal oenocytes (**o**) from *C. rimosus* exhibiting the round shaped nucleus (\*) and glycogen deposits (**gl**). (M-P) Perivisceral oenocytes from *C. rimosus*. Observe the fusion of basal lamina from adjacent oenocytes and/or among oenocytes and trophocytes. (Q-R) Detail of the *M. parallelus* parietal trophocytes exhibiting two individual basal lamina of adjacent trophocytes. (S-T) *M. parallelus* perivisceral trophocytes. (U-X) *M. parallelus* parietal oenocytes. Observe the fusion of basal lamina of two adjacent oenocytes without cytoplasm fusion and the tracheoles (**tr**) presence. (Y, Z) *M. parallelus* perivisceral oenocytes.

—▶ = trophocyte nucleolus, **mi** = mitochondria, **r** = free ribosomes, **lrer** = lamellar rough endoplasmic reticulum, **rb** = residual bodies, **gr** = electrondense granules

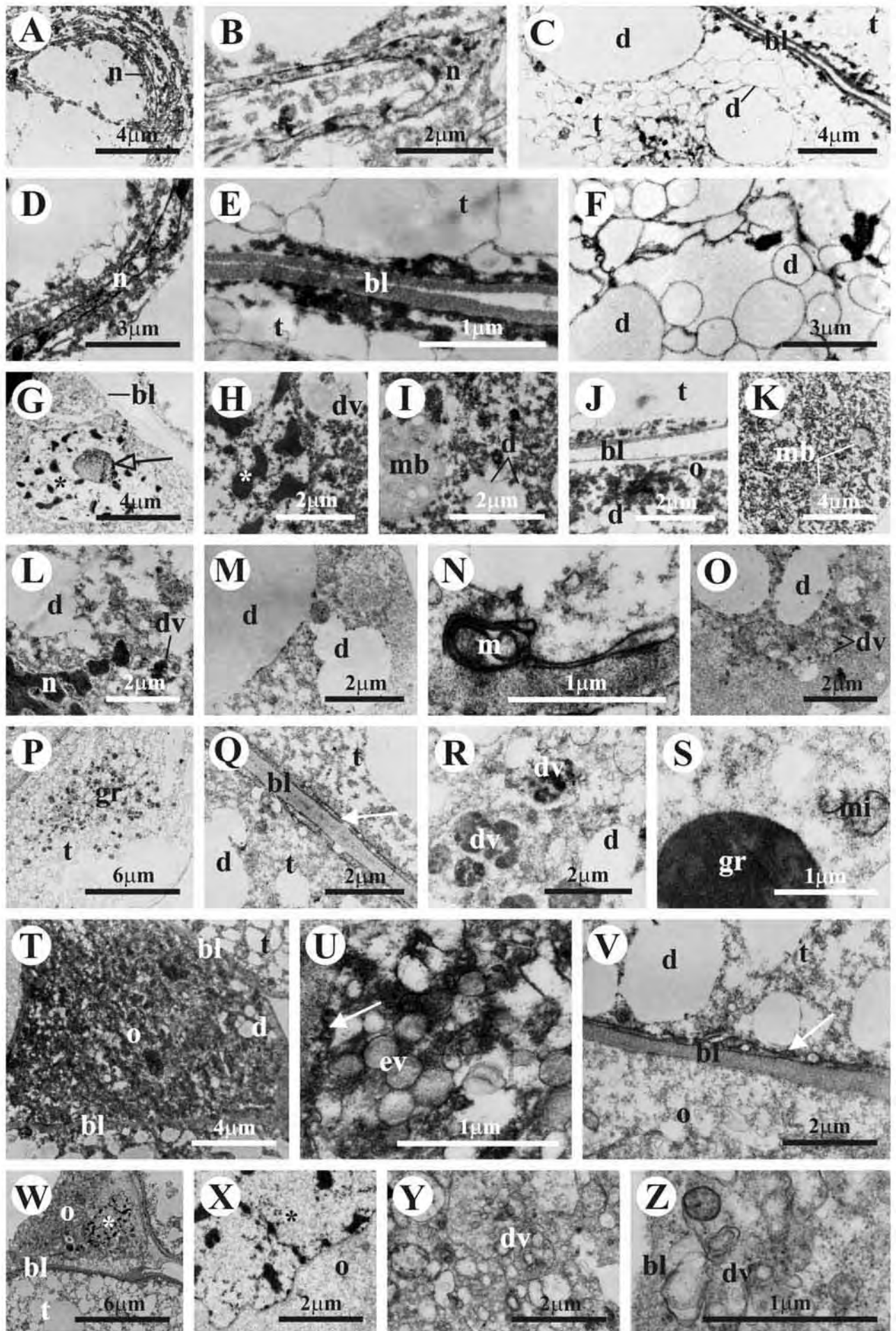


**Figure 3:** Electron micrograph of the fat body cells from workers of the derived species of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*.

(A-C) Parietal trophocytes (**t**) from *A. disciger* exhibiting the irregular nucleus (**n**) and the two individual basal lamina (**bl**) from adjacent trophocytes. (D-F) Detail of the *A. disciger* perivisceral trophocytes. Observe the nucleus, the basal lamina and electronlucent droplets (**d**). (G-I) Parietal oenocytes (**o**) from *A. disciger*. Observe the round shaped nucleus (\*) and the multivesicular bodies (**mb**). (J-K) *A. disciger* perivisceral oenocytes showing the two individual basal lamina of the adjacent trophocytes and oenocytes. (L-O) *A. laevigata* parietal trophocytes exhibiting the irregular nucleus and electronlucent droplets. (P-S) Perivisceral trophocytes from *A. laevigata*. Observe the electrondense granules (**gr**) presence and the fusion of the basal lamina of two trophocytes. (T-V) Parietal oenocytes from *A. laevigata* showing the fusion of the basal lamina among oenocytes and trophocytes and the endocytic vesicles (**ev**). (W-Z) Perivisceral oenocytes from *A. laevigata* showing the oval shaped nucleus with irregular edges and the fusion among basal lamina of oenocyte and trophocytes.

→ = oenocytes nucleolus, **dv** = digestive vacuoles, **m** = membranous remnants, **mi** = mitochondria, **white arrow** = plasma membrane reticular system (PMRS)





## Discussion

The morphological, morphometric, and ultrastructural study on the fat body of workers of *C. rimosus* and *M. parallelus* (basal species) and media workers of *A. disciger* and *A. laevigata* (derived species) revealed that this tissue is located mainly in the abdomen around organs (perivisceral) and right underneath the tegument (parietal), as described for gynes and queens of these same species (Roma et al., 2006b) and insects in general (Chapman, 1998, Gullan and Cranston, 2000).

The morphometric analysis of the fat body cells of the examined species showed that the areas of parietal and perivisceral trophocytes are significantly larger in workers of derived species compared to those of basal ones, confirming the obtained by Roma et al. (2006b) for gynes and queens of these same species. This suggests that during the evolution of these insects, there was a gradual increase in the volume of trophocytes of *A. disciger* and *A. laevigata*, probably due to an increase in the accumulation of substances, such as proteins and lipids, and consequently an increase in their body size.

Regarding parietal and perivisceral oenocytes of workers, the morphometric results confirm those above described for trophocytes, as oenocytes of basal species are significantly smaller than those of derived ones, also leading to an increase in the volume of cells of Attini ants during evolution.

No significant morphometric differences were found between the areas of parietal and perivisceral trophocytes inside each species. The same was obtained for oenocytes. This suggests that in basal species as well as derived ones, there is not a functional compartmentalization between trophocytes and oenocytes, parietal as well as perivisceral, confirming the reported by Ignatti (2001) and Paes de Oliveira and Cruz-Landim (2003) for other insect species.

Among parietal fat body cells of *M. parallelus*, the presence of several tracheoles may facilitate respiratory and oxidative processes occurring in the fat body (Chapman, 1998). This has also been reported for gynes and queens of *Pachycondyla striata* (Thiele and Camargo-Mathias, 2003) and queens of *Atta sexdens* (Ignatti, 2001). In addition, the ramifications of tracheoles in between fat body cells may help support this tissue, as it is extremely slack. The membranous expansions of trophocytes and



oenocytes of the species examined in this study could also be playing this role, as well as binding fat body cells, as observed by Cruz-Landim (1976) in *Apis mellifera* bees. As a result of this arrangement, basal lamina may fuse, although the plasma membrane and the cytoplasm of adjacent cells remain separated.

Roma et al. (2006b) reported that these membranous expansions consisted of only membranous extensions. In the present study, however, cytoplasm was present in these expansions, indicating that they are extensions of the cell itself.

The ultrastructural analysis of the fat body cells showed fused basal lamina in certain regions or individual basal lamina between two trophocytes, between oenocytes and trophocytes, or between two oenocytes. In both cases, they may act as a selective permeable barrier, controlling the transport of material in both directions (intra and extracellular) in oenocytes and especially in trophocytes, which are specialized in the synthesis and export of specific proteins that frequently cross the basal lamina. When the basal lamina of two adjacent cells is fused, the transport of material from the haemolymph is facilitated in areas where lamina is not fused. On the other hand, fused basal lamina may play a role in maintaining cells together, and consequently providing more cohesion to the tissue.

As already reported in the literature for other insects, the plasma membrane reticular system (PMRS) was present in parietal and perivisceral trophocytes of *A. laevigata*. This structure is a result of membrane invaginations forming channels that penetrate the cytoplasm, and consequently increase the surface area for absorbing compounds, mainly proteins, from the haemolymph. These data confirm those obtained by Ignatti (2001) for trophocytes of *A. sexdens*.

The present study supports the hypothesis that perivisceral trophocytes of workers of *C. rimosus* are responsible for an intense protein synthesis, since they have the entire apparatus to perform this activity. This is contrary to the previously proposed by Roma et al. (2006a) that proteins observed in trophocytes of workers of these species are a leavings not used during the metamorphosis.

The presence of electrondense granules, possibly containing proteins, in trophocytes of other species analyzed here also suggests that these cells could be a site of protein synthesis, or that proteins are being absorbed from the haemolymph.

In addition, the ultrastructural analysis of parietal and perivisceral trophocytes revealed the presence of electronlucent droplets in the cytoplasm, probably lipid source. This has been reported for trophocytes of other insects by Kilby (1963), which suggested, similarly to Roma et al. (2006a), that these structures could provide the energy needed during foraging activities of workers. Based on the literature (Zara et al., 2003) fat body cells, especially trophocytes, are thought to be the center of the intermediary metabolism of insects, providing lipids and proteins for other tissues. Thus, in the species examined in this study, lipids may be mobilized from trophocytes to the haemolymph for the maintenance of their metabolism.

Regarding the ultrastructure of oenocytes, a well-developed lamellar rough endoplasmic reticulum was observed in *C. rimosus*. This suggests that these cells may synthesize proteins, supporting cytochemical and ultrastructural studies reporting the presence of protein granules in their cytoplasm (personal communication). On the other hand, our findings contradict studies reporting that oenocytes are characterized mainly by extensive areas of smooth endoplasmic reticulum, due to the synthesis of ecdysteroids (Dean et al., 1985), as this organelle was not frequently observed in the present study. It is also possible that oenocytes absorb proteins from the haemolymph, since plasma membrane invaginations (PMRS) were observed, in addition to endocytic vesicles in the parietal oenocytes of *A. laevigata*.

The cytoplasm of parietal and perivisceral oenocytes of all species examined contained electronlucent droplets that, according to Blomquist and Dillwith (1985), consist of lipids and may contain hydrocarbons. These compounds are eventually deposited in the insect cuticle for impermeability, used in the maintenance and recognition of castes, in addition to serving as precursors of pheromones used in scent trails, often long, especially in derived species (Blomquist and Dillwith, 1985).

In the parietal oenocytes of *C. rimosus*, abundant glycogen deposits were found, suggesting the participation of this compound as a source of energy for several processes, such as the biosynthesis or catabolism of several cell molecules (Candy and Kilby, 1975). In workers of *C. rimosus* examined in this study, glycogen may be providing energy mainly for muscles during foraging activities.

In trophocytes of *C. rimosus* and *A. laevigata* and in oenocytes of *C. rimosus*, *M. parallelus*, *A. disciger*, and *A. laevigata*, many digestive vacuoles of varied shapes

and sizes were observed. They might be associated with protein digestion, since part of these elements may have an exogenous origin, from the haemolymph, as mentioned previously. Similarly, digestive vacuoles may also be autophagic, responsible for autodigestion, a process that allows fat body cells to maintain well-functioning components (Dean et al., 1985).

The residual bodies found in parietal oenocytes of *C. rimosus* and *M. parallelus* could also play a role in digestive processes of compounds from the haemolymph or cell organelles (Dean et al., 1985).

The presence of multivesicular bodies in the parietal oenocytes of *A. disciger* might be involved mainly in the recycling of membranes and digestion of extracellular proteins, which are used in several metabolic processes, as reported for other insects (Locke, 1984; Dean et al., 1985).

Based on the presented data, no significant differences were observed between the fat body cells of basal and derived ants, except regarding the larger size of trophocytes and oenocytes of the derived species *A. disciger* and *A. laevigata*. This suggests that the structural and functional features of this tissue remained unaltered during the evolution of this group of insects.

### **Acknowledgments**

This work was financed by the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Grant nº 04/01768-0. We are grateful to CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) and Eduardo Arrivabene Diniz for the insects supply and to Antonio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte and Rogerio Sueshiro Hatore for the technical support.

## References

- Blomquist, G. J. & Dillwith, J. W. (1985) Cuticular lipids. In: G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3, pp. 117-154. Pergamon Press, Oxford.
- Bolton, B. (2003) *Synopsis and classification of Formicidae*. Memoirs of the American Entomological Institute, Gainesville.
- Candy, D. J. & Kilby, B. A. (1975) *Insect biochemistry and function*. Chapman and Hall, London.
- Chapman, R. F. (1998) *The insect: structure and function*. University Press, Cambridge.
- Cruz-Landim, C. (1976) Connective tissue of *Apis mellifera*: an ultrastructural study. *Insectes Sociaux*, 23, 263-276.
- Dean, R. L., Locke, M. & Collins, J. V. (1985) Structure of fat body. In: G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3, pp. 155-210. Pergamon Press, Oxford.
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2000) *The insects: an outline of entomology*. Blackwell Science, Oxford.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990) *The ants*. Harvard University Press, Cambridge.
- Ignatti, A. C. (2001) Histoquímica e citoquímica ultra-estrutural do corpo gorduroso de rainhas de formigas *Atta sexdens* (L., 1758) (Hymenoptera: Formicidae). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Keeley, L. L. (1985) Physiology and biochemistry of the fat body. In: G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3, pp. 211-248. Pergamon Press, Oxford.
- Kilby, B. A. (1963) The biochemistry of the insect fat body. In: J. W. L. Beament, J. E. Treherne & V. B. Wigglesworth (Eds.), *Advances in insect physiology*, pp. 111-174. Academic Press, New York.
- Locke, M. (1984) The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: R. C. King & H. Akai (Eds.), *Insect ultrastructure*, pp. 151-197. Plenum Press, New York.

Paes de Oliveira, V. T. & Cruz-Landim, C. (2003) Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Sociobiology*, 41, 701-709.

Palli, S. R. & Locke, M. (1988) The synthesis of haemolymph proteins by the larval fat body of an insect *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperidae). *Insect Biochemistry*, 18, 405-413.

Roma, G. C., Camargo-Mathias, M. I. & Bueno, O. C. (2006a) Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*, 37, 234-242.

Roma, G. C., Camargo-Mathias, M. I. & Bueno, O. C. (2006b) Fat body cells of gynes and queens of four species of fungus growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Relationship with the vitellogenesis. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 1, 48-57.

Rosell, R. C. & Wheeler, D. E. (1995) Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Buckley) (Hymenoptera). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 24, 413-426.

Siegel, S. & Castellan Jr., N. J. (1988) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill, New York.

Thiele, E. & Camargo-Mathias, M. I. (2003) Morphology, ultramorphology and morphometry of the fat body of virgin females and queens of the ants *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 42, 243-254.

Zara, F. J., Caetano, F. H., Cabrera, A. C. G. & Jaffé, K. (2003) Ultrastructure of last larval instar fat body cells of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Formicidae: Ponerinae): cytochemical and chemical analysis. *Animal Biology*, 53, 1-16.

**CHEMICAL DETECTION OF PROTEINS AND LIPIDS IN THE FAT BODY  
CELLS FROM WORKERS OF ATTINI ANTS (HYMENOPTERA:  
FORMICIDAE)**

Gislaine Cristina Roma <sup>a</sup>; Maria Izabel Camargo Mathias <sup>a, \*</sup>; Odair Corrêa Bueno <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

<sup>b</sup> Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

**Running Title:** Chemical detection in the Attini fat body cells

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35340009. E-mail address: micm@rc.unesp.br

### Resumo

O estudo citoquímico ultra-estrutural e a análise química realizados no corpo gorduroso das operárias das Attini basais *Cyphomyrmex rimosus* e *Mycetarotes parallelus* e derivadas *Acromyrmex disciger* e *Atta laevigata* revelou nos trofócitos e enócitos parietais e periviscerais a presença de proteínas na forma de grânulos fortemente eletrondensos com tamanhos e formas variados distribuídos por todo o citoplasma. Os lipídios apareceram no citoplasma dos trofócitos como granulação fortemente eletrondensa, devido à técnica aplicada. Em *M. parallelus*, *A. disciger* e *A. laevigata* eles também apareceram na forma de gotículas. Os enócitos tanto parietais quanto periviscerais mostraram presença de lipídios com aspecto de granulação grosseira e fortemente eletrondensa. Em *A. laevigata*, eles apareceram como gotículas. Os resultados da análise química obtidos por meio de cromatografia gasosa mostraram que os principais compostos lipídicos presentes nos trofócitos e enócitos foram ácidos graxos saturados (mirístico, palmítico e esteárico) e insaturados (oléico e linoléico). Revelou-se também que nas espécies basais predominaram os ácidos graxos saturados e nas derivadas apareceram tanto os saturados quanto os insaturados.

**Palavras-chave:** trofócito, enócito, citoquímica ultra-estrutural, cromatografia gasosa, formigas

### Abstract

The ultrastructural cytochemistry study and the chemical analysis carried out to examine the fat body of workers of the basal Attini *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and the derived *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* revealed very electrondense protein granules of varied sizes and shapes distributed throughout the cytoplasm of parietal and perivisceral trophocytes and oenocytes. Lipids were present in the cytoplasm of trophocytes as very electrondense granules, due applied technique. In *M. parallelus*, *A. disciger*, and *A. laevigata*, lipids were present as droplets. In parietal as well as perivisceral oenocytes, lipid granules were very electrondense. In *A. laevigata*, lipids were present as droplets. The chemical analysis using gas chromatography showed that the main lipid compounds present in trophocytes and oenocytes were saturated (myristic, palmitic, and stearic) and unsaturated fatty acids (oleic and linoleic). Also, in basal species, lipid compounds consisted of mainly saturated fatty acids, while in derived species; saturated as well as unsaturated fatty acids were observed.

**Keywords:** trophocyte, oenocyte, ultrastructural cytochemistry, gas chromatography, ants



## 1. Introduction

The insect fat body is a tissue that fills the body cavity and consisted of cells of mesodermal and sometimes ectodermal origin. Mesodermal cells correspond to trophocytes and their derived cells, while ectodermal ones correspond to oenocytes (Paes de Oliveira and Cruz-Landim, 2003).

The fat body is located basically in two regions: arranged as irregular strands right underneath the tegument where it is termed parietal fat body and around internal organs, the perivisceral fat body (Chapman, 1998).

The fat body is thought to have many functions such as synthesis and storage of lipids, carbohydrates, and proteins – mainly vitellogenin, a protein that plays an important role in reproduction and is incorporated by the oocyte during vitellogenesis (Keeley, 1978, Wyatt, 1980, Sayah et al., 1994).

The ants of the Attini tribe (subfamily Myrmicinae) comprise 13 genera with approximately 217 described species, all fungus-growing ants (Hölldobler and Wilson, 1990, Shultz and Meier, 1995, Bolton, 2003). Basal Attini cultivate their fungi using vegetal matter, parts of dead larvae and adult insects, insect feces or even seeds or fresh leaves that fall on the ground. Only derived Attini use leaves of live plants to cultivate their fungi, giving the name leaf-cutting ants; some are considered pest (Hölldobler and Wilson, 1990).

Due to the importance of the fat body in the metabolism of insects and the scarce information regarding the physiology of ants of basal and derived genera of the Attini tribe, the aim of this study was to analyze, through ultrastructural cytochemistry techniques and chemical analysis for lipids, the compounds of fat body cells of workers of the basal species *Cyphomyrmex rimosus* Spinola and *Mycetarotes parallelus* Emery and media workers of the derived species *Acromyrmex disciger* Mayr and *Atta laevigata* Smith. Also, we compared the chemical composition of compounds present in the fat body of these species as they may have diversified throughout evolution.

## 2. Material and Methods

The present study used the parietal and perivisceral fat body from workers of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* (monomorphic species) and media workers of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* (polymorphic species), collected in the field and immediately submitted to the techniques. The individuals were anesthetized by cooling in a freezer and dissected on Petri dishes with physiological saline solution for insects (NaCl 7,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g/L).

### 2.1. Ultrastructural cytochemistry

#### 2.1.1. Detection of basic proteins

The fat body of all species studied was fixed in 2,5% glutaraldehyde 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2), for 2 hours, washed in distilled water, incubated in ammonium silver solution (10% silver nitrate added to a concentrated solution of ammonium hydroxide), according to the method of ammonium silver (MacRae and Meltz, 1970), for 5 minutes at room temperature. Next, the material was washed in distilled water and incubated in 3% formaldehyde for 5 minutes, in which the material acquired a brown coloration. Immediately afterwards, the material was washed in distilled water and post-fixed according to routine procedures.

#### 2.1.2. Detection of unsaturated lipids

The fat body was fixed in 2,5% glutaraldehyde in 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2), for 2 hours. The material was then washed twice in the same buffer for 15 minutes each. The material was post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0,1M imidazole buffer (pH 7,5) for 30 minutes in the dark. Afterwards, the material was washed once in 0,1M imidazole buffer (pH 7,5) for 15 min, followed by acetone dehydration and then include in Epon resin, according to the method of Angermüller and Fahimi (1982).

## 2.2. Chemical analyses

The total fat body (parietal and perivisceral) of 50 workers of *C. rimosus*, 40 of *M. parallelus*, 30 of *A. disciger*, and 25 of *A. laevigata* were removed in physiological solution for insects and stored in amber test tubes with caps and maintained in freezer to conserve chemical properties until used.

### 2.2.1. Extraction of total lipids (Folch et al., 1957)

One milliliter of chloroform and 0,5 mL of methanol were added to each sample and then left at room temperature for 24 hours. One fourth of the total volume of 0,85% KCl saline solution was added to the mixture for the separation of phases, one containing chloroform and lipids and another containing, methanol with KCl and non-lipid compounds such as proteins and carbohydrates. The lower phase was carefully removed with a Pasteur pipette and transferred to another tube. The solvent was removed in nitrogen atmosphere at room temperature and tubes were placed in a vacuum desiccator.

### 2.2.2. Preparation of fatty acid methyl esters

The composition of fatty acids of lipids was determined by gas chromatography after prior esterification or transesterification to form methyl esters that increase the volatility of these compounds and yielding better results. Thus, base-catalyzed esterification and transesterification were used.

To this end, 50  $\mu\text{L}$  of 2M methanolic sodium hydroxide were added to each sample and maintained in a tube shaker Phoenix AT56 for 30 seconds and allowed to stand for 30 minutes. Later, 100 mg of anhydrous calcium chloride were added to each sample to absorb water molecules formed during esterification, followed by centrifugation at 4000 rpm during 8 minutes. The upper phase was collected and injected in a gas chromatographer Finnigan–Tremetrics 9001.

### 2.2.3. Analysis of the composition of fatty acids by gas chromatography

After methylation of total lipids, methyl esters were analyzed by gas chromatography in an FFAP column (Free Fatty Acid Phase – 30 m, 1 µm film) under the following conditions: hydrogen flow = 20 mL/min, nitrogen flow = 25 mL/min, synthetic air flow = 175 mL/min, carrier gas = hydrogen, work pressure = 4 psi, injector temperature = 210°C, detector temperature = 250°C, sample division = 10:1, column temperature = 50°C for 1 min, programmed from 45°C/min to 190°C maintained for 1 minute, followed by 2°C/min until 196°C maintained for 2 min, and 10°C/min until 336°C maintained for 3 min.

The identification of fatty acids was conducted by integration of components of the sample with those of standards (Sigma) of fatty acid methyl esters using the software Borwin installed in computer coupled to the gas chromatographer.

### 2.2.4. Analysis by external standardization

Calibration samples were prepared containing different concentrations of standard solutions of methyl ester of the acids: myristic (MA: C14:0), palmitic (PA: C16:0), stearic (SA: C18:0), oleic (OA: C18:1), and linoleic (LA: 18:2) that were injected into the gas chromatographer. After identification of the corresponding peaks, linearity was determined with concentration in the abscissa and peak area in the ordinate (Ciola, 1985).

## 3. Results

### 3.1. Detection of basic proteins

Basic proteins are not detected in the basal lamina of parietal and perivisceral trophocytes of the examined species (Figs. 2E, S). However, very electrondense protein granules of varied sizes and shapes are observed in the cytoplasm of these cells (Figs. 1B-I, M-N; 2A-H, M-N; 3). In *C. rimosus*, some parietal trophocytes give a positive reaction only in the periphery of the cell (Fig. 1A).

In the parietal trophocytes of *A. laevigata*, a positive reaction is observed in very electrondense granules in vacuoles (Figs. 2O-P), while in some perivisceral trophocytes, the periphery of the cells, near the basal lamina (Fig. 2S) has the strongest reaction.

In general, the results are similar in trophocytes of basal and derived species (Figs. 1B-I, M-N; 2A-H, M-S) and in parietal and perivisceral trophocytes within each species (Figs. 1A-I, M-N; 2A-H, M-S).

Regarding oenocytes, basic proteins are not detected in the basal lamina of these cells (Figs. 1Q-R; 2I, V).

In parietal and perivisceral oenocytes of this species, the test is positive, characterized by small and very electrondense granules distributed throughout the cytoplasm (Figs. 1J-L, O-R; 2I-L, T-X).

As observed in trophocytes, oenocytes of basal and derived species exhibit similar results (Figs. 1J-L, O-R; 2I-L, T-X). Also, differences are not observed between parietal and perivisceral oenocytes within each species (Figs. 1J-L, O-R; 2I-L; T-X).

Thus, this test detected larger quantities of basic proteins in trophocytes than oenocytes of these species (Figs. 1; 2).

### 3.2. Detection of unsaturated lipids

In parietal and perivisceral trophocytes of workers of all examined species, the basal lamina has intermediate positivity to the test (Figs. 4G, I; 5A-B, G, P). However, in the cytoplasm of these trophocytes, lipids are present as very electrondense granules (Figs. 4A-B, G-J; 5G, O-Q). In some perivisceral trophocytes of *C. rimosus* the reaction is positive only around droplets, which probably consists of lipids (Fig. 4C).

In parietal trophocytes of *M. parallelus*, lipids are also found inside membranous structures that also contain myelin figures (Fig. 4H).

In parietal and perivisceral trophocytes of *M. parallelus*, *A. disciger*, and *A. laevigata*, the reaction is positive in droplets in the cytoplasm, which are spherical but may also have other shapes and sizes, probably due to fusion (Figs. 4K; 5B, F, N-O, Q). In *M. parallelus*, boundaries of droplets are more electrondense than the inside (Fig. 4K). In *A. disciger*, droplets exhibit homogeneous content and intermediate

electron density (Figs. 5B, F), or have a very electron dense stick-shaped material, mostly in the center (Figs. 5C-E, H-I). In trophocytes of *A. disciger*, small lipid droplets are present mainly in the periphery of the cells (Figs. 5A, G). In parietal and perivisceral trophocytes of *A. laevigata*, droplets are irregular and very electron dense with homogeneous contents (Figs. 5N-O, Q).

In parietal and perivisceral trophocytes of *M. parallelus*, spherical mitochondria are present (Figs. 4G, K).

Regarding oenocytes, the basal lamina has intermediate positivity to the test in all species of workers (Figs. 4E, G; 5J, L).

In parietal and perivisceral oenocytes of all species, lipids with large electron dense granules are distributed throughout the cytoplasm (Figs. 4D-G, L-N; 5J-K, M, R-S, U-V).

In the parietal and perivisceral oenocytes of *A. laevigata*, the reaction is also positive in irregular droplets of varied sizes (Figs. 5S-T, V).

In parietal and perivisceral oenocytes of *C. rimosus* and *M. parallelus* spherical mitochondria are also observed (Figs. 4D-F, L, N).

### 3.3. Chemical analyses

Gas chromatography revealed that the main lipid compounds present in the fat body cells of workers examined are saturated fatty acids (myristic, palmitic, and stearic) and unsaturated acids (oleic and linoleic). Also, saturated fatty acids predominate in the basal species, while in derived ones; both saturated and unsaturated acids are present. Stearic acid is the most abundant in the species *C. rimosus* (98,2%), *A. disciger* (75,2%) and *A. laevigata* (65,8%), while palmitic acid is predominant in the fat body of *M. parallelus* (68%) (Table 1).

**Table 1:** Comparative chemical results of the total concentration ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) and relative abundance (%) of the main compounds present in the fat body cells of workers of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and media workers of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*.

Species	Fatty Acids ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )				
	MA	PA	SA	OA	LA
<i>C. rimosus</i>	1,4 (0,4%)	4,63 (1,4%)	331,29 (98,2%)	tr	tr
<i>M. parallelus</i>	0,73 (0,6%)	85,71 (68%)	25,97 (20,4%)	13,75 (11%)	tr
<i>A. disciger</i>	3,42 (2,8%)	2,90 (2,4%)	90,74 (75,2%)	17,26 (14,3%)	6,37 (5,3%)
<i>A. laevigata</i>	2,17 (0,8%)	32,63 (12,7%)	168,37 (65,8%)	36,5 (14,3%)	16,31 (6,4%)

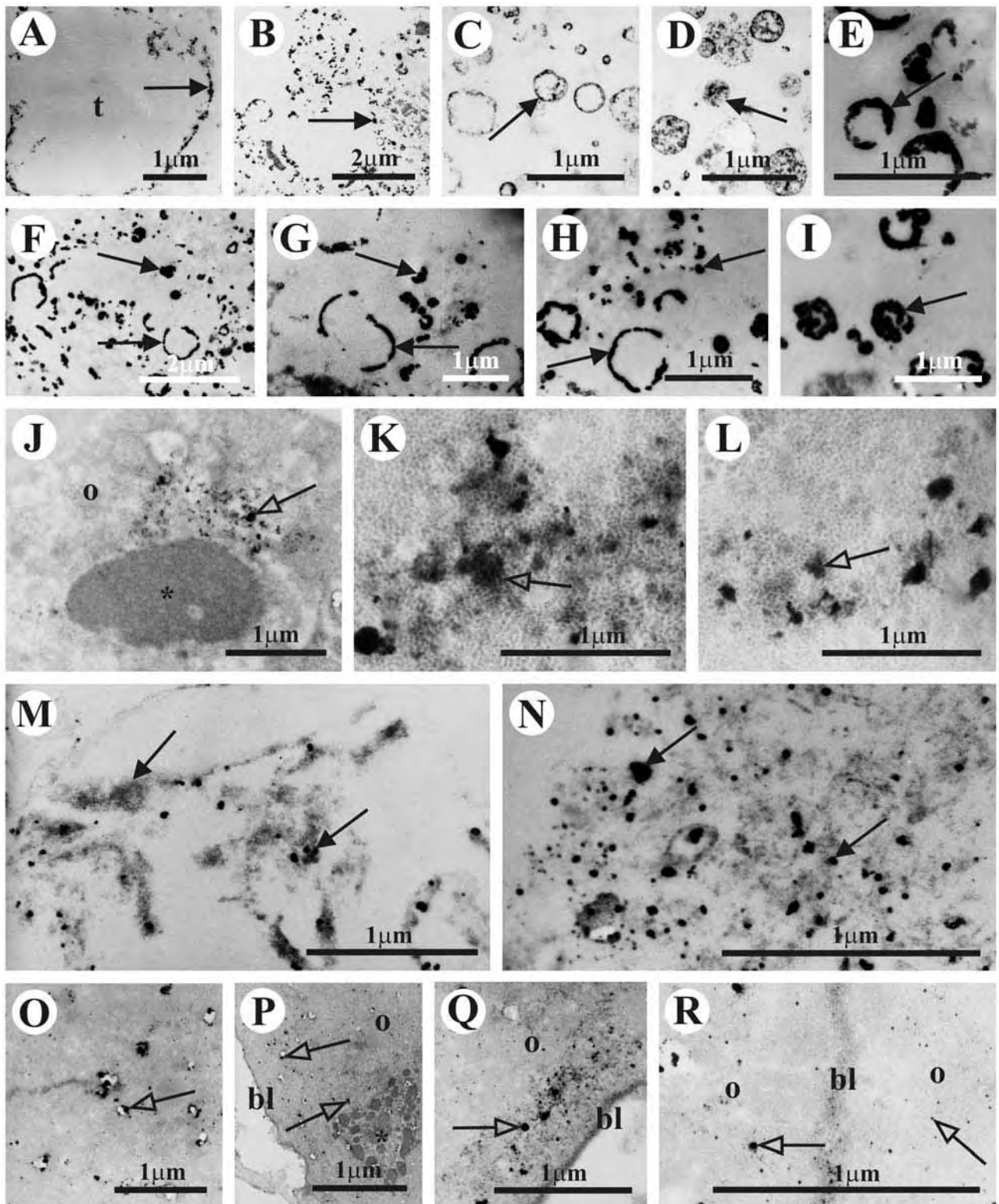
MA (C14:0) = Myristic Acid  
 PA (C16:0) = Palmitic Acid  
 SA (C18:0) = Stearic Acid  
 OA (C18:1) = Oleic Acid  
 LA (C18:2) = Linoleic Acid  
 tr = traces (<0,01%)

## *FIGURES*



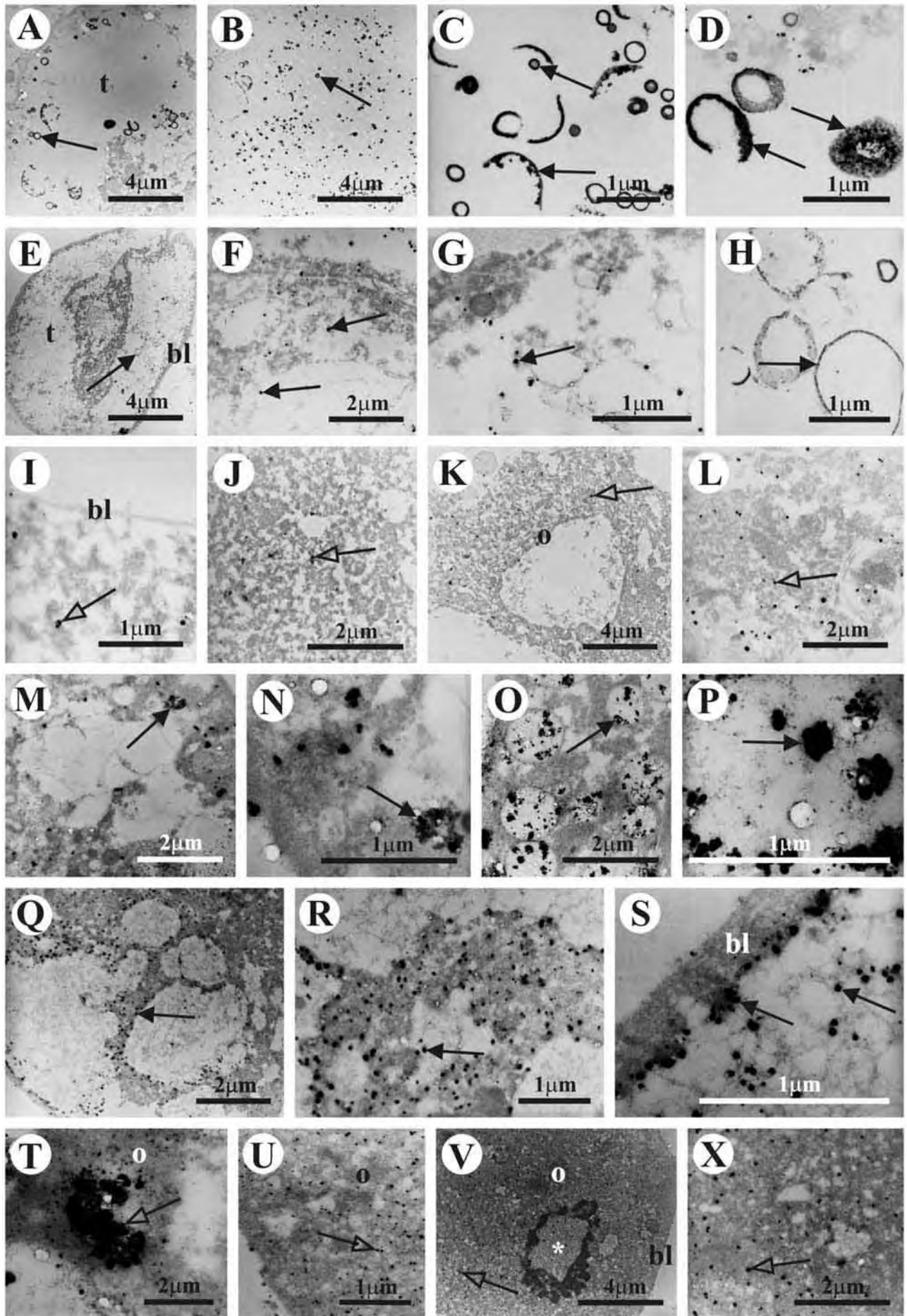
**Figure 1:** Electron micrograph of the fat body cells from workers of the basal species of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* submitted to the cytochemical test for basic proteins detection.

(**A-E**) Detail of *C. rimosus* parietal trophocytes (**t**) and (**F-I**) perivisceral ones showing the protein granules (—→). (**J-K**) *C. rimosus* parietal oenocytes (**o**) and (**L**) perivisceral ones. Observe the nucleus (\*) and the strongly electron-dense protein granules (—▷). (**M**) Detail of *M. parallelus* parietal trophocytes and (**N**) perivisceral ones, showing the protein granules (—→). (**O-P**) *M. parallelus* parietal oenocytes (**o**) and (**Q-R**) perivisceral ones. Observe the negativity to the test of basal lamina (**bl**) and strongly electron-dense protein granules (—▷).

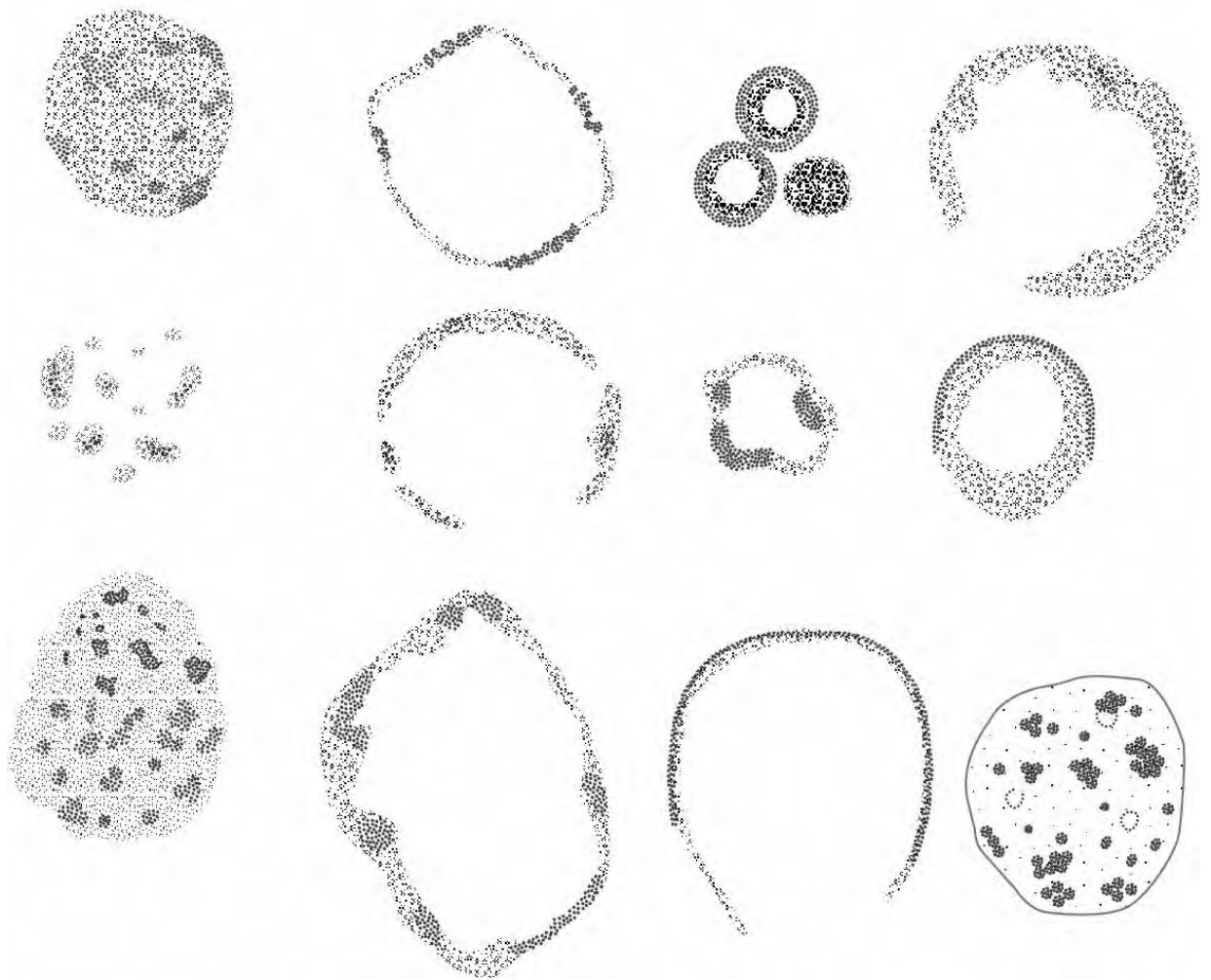


**Figure 2:** Electron micrograph of the fat body cells from workers of the derived species of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* submitted to the cytochemical test for basic proteins detection.

(**A-D**) Detail of *A. disciger* parietal trophocytes (**t**) and (**E-H**) perivisceral ones showing the strongly electron-dense protein granules (→). Observe the negativity to the test of basal lamina (**bl**). (**I-J**) *A. disciger* parietal oenocytes and (**K-L**) perivisceral ones (**o**), exhibiting the protein granules (→) and the negativity to the test of basal lamina (**bl**). (**M-P**) Detail of *A. laevigata* parietal trophocytes showing the strongly electron-dense proteic granules (→). Observe in **O** and **P** the protein granules inside vesicular structures (→). (**Q-S**) *A. laevigata* perivisceral trophocytes, observe the protein granules (→) and the negativity to the test of basal lamina (**bl**). (**T-U**) Detail of *A. laevigata* parietal oenocytes (**o**) and (**V-X**) perivisceral ones exhibiting the oenocyte nucleus (\*), the protein granules (→) and the negativity to the test of basal lamina (**bl**).



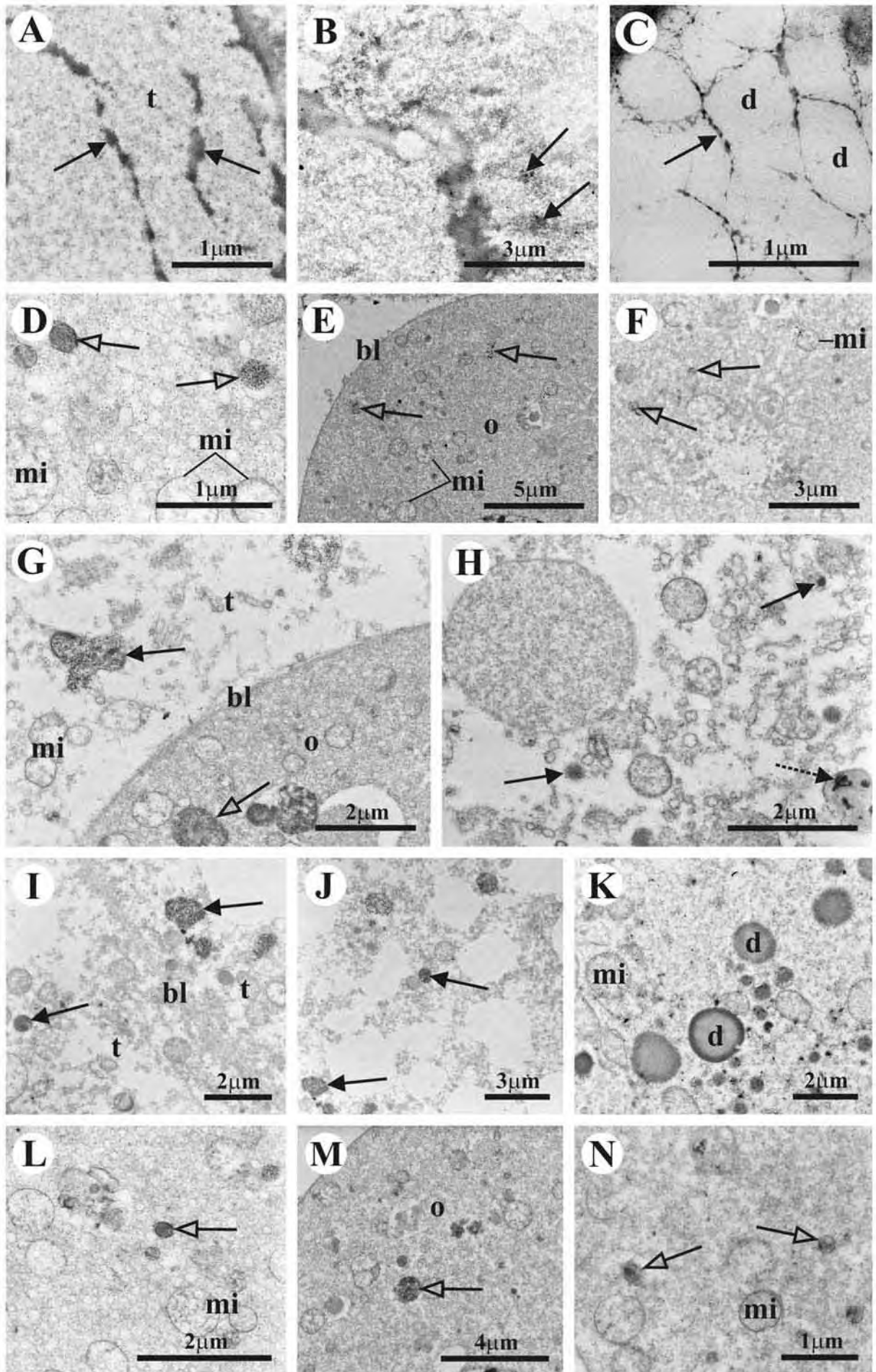
**Figure 3:** Schematic representation of the main types of protein granules of the fat body cells from workers of the basal species *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and derived species *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*.



**Figure 4:** Electron micrograph of the fat body cells from workers of the basal species of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* submitted to the cytochemical test for unsaturated lipids detection.

(A) Detail of *C. rimosus* parietal trophocytes (**t**) and (B-C) perivisceral ones showing the lipids granules (→). Observe in C the positive reaction only in the periphery of the droplets (**d**). (D) Parietal oenocytes from *C. rimosus* exhibiting the lipids granules (→) and mitochondria (**mi**). (E-F) *C. rimosus* perivisceral oenocytes (**o**) showing the intermediate positivity to the test of basal lamina (**bl**), besides of lipids granules (→) and mitochondria (**mi**). (G-H) Detail of the parietal trophocytes from *M. parallelus*. Observe in G the mitochondria (**mi**), the lipids granules of trophocytes (→) and oenocytes (→) and the fusion of basal lamina (**bl**) from adjacent trophocytes (**t**) and oenocytes (**o**). In H, besides the lipids granules (→), observe the lipids inside of membranous structures (·····→). (I-K) *M. parallelus* perivisceral trophocytes showing the granules (→) and the droplets (**d**) of lipids, mitochondria (**mi**) and the basal lamina (**bl**) with intermediate positivity to the test (L) Detail of the *M. parallelus* parietal oenocytes and (M-N) perivisceral ones (**o**), showing the lipids granules (→) and the mitochondria (**mi**).

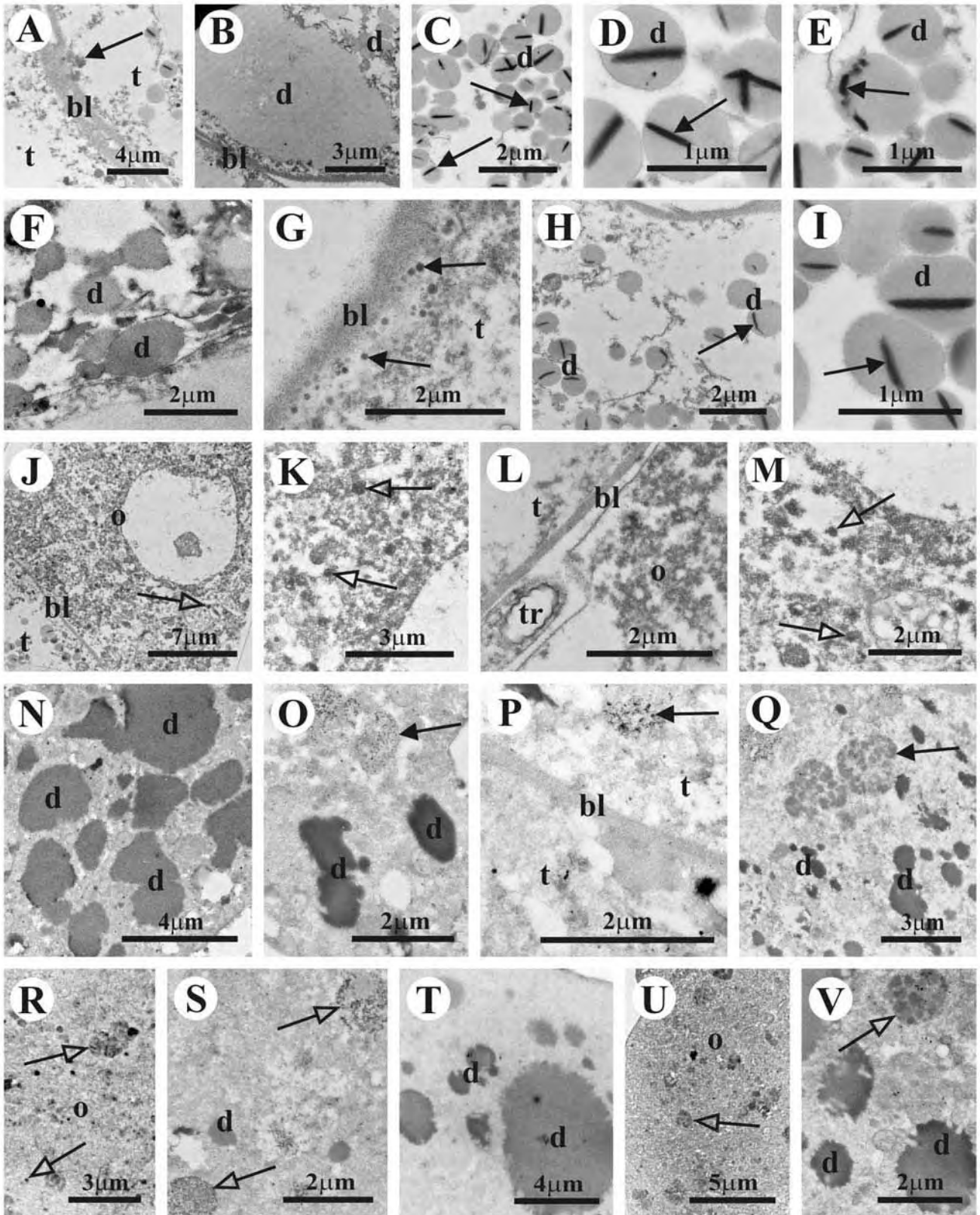






**Figure 5:** Electron micrograph of the fat body cells from workers of the derived species of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* submitted to the cytochemical test for unsaturated lipids detection.

(**A-E**) *A. disciger* parietal trophocytes (**t**) and (**F-I**) perivisceral ones showing the intermediate positivity to the test of basal lamina (**bl**), lipids granules (—▶) and the lipids droplets (**d**). In **C-E** and **H-I**, observe the strongly electron-dense lipids in the stick-shaped (—▶) inside the droplets (**d**). (**J-K**) *A. disciger* parietal oenocytes (**o**) and (**L-M**) perivisceral ones. Observe the lipids granules (—▶), tracheoles (**tr**) and the intermediate positivity to the test of basal lamina (**bl**). (**N-O**) Detail of the *A. laevigata* parietal trophocytes and (**P-Q**) perivisceral ones (**t**). Observe the electron-dense lipids droplets (**d**), lipids granules (—▶) and the intermediate positivity to the test of basal lamina (**bl**). (**R-T**) *A. laevigata* parietal oenocytes (**o**) and (**U-V**) perivisceral ones. Observe the electron-dense lipids droplets (**d**) and lipids granules (—▶).



#### 4. Discussion

The ultrastructural cytochemistry study and the chemical analysis using gas chromatography performed in parietal and perivisceral trophocytes and oenocytes of workers of the basal species *C. rimosus* and *M. parallelus* and media workers of the derived species *A. disciger* and *A. laevigata* revealed the presence of basic proteins and saturated and unsaturated lipids, confirming the obtained by Rosell and Wheeler (1995) and Zara et al. (2002) for workers of *Camponotus festinatus* and larvae of *Pachycondylla villosa*, respectively

In the present study, the presence of basic proteins in trophocytes suggests two hypothesis: 1) excess proteins used during metamorphosis, or 2) proteins actively synthesized by trophocytes for the maintenance of the insect's metabolism or energy storages for foraging. The former confirms histochemical studies conducted previously by Roma et al. (2006) for workers of these species. However, the ultrastructural analysis carried out by these same authors revealed the presence of an entire apparatus necessary for protein synthesis (rough endoplasmic reticulum, Golgi complex, and mitochondria) in the trophocytes of these species, especially in *C. rimosus*, indicating that proteins may be produced continuously by these cells.

These elements would be probably synthesized to be released in the haemolymph and from which they would be absorbed by other tissues (export proteins), playing a role in the maintenance of the metabolism of these insects, as trophocytes are known to be the main providers of proteins to the haemolymph quantitatively as well as qualitatively, confirming the reported by Dean et al. (1985), Palli and Locke (1988), and Gullan and Cranston (2000) for other species of insects. On the other hand, proteins present in the trophocytes might provide the energy necessary for foraging activities, especially in derived species that form long trails to plants to be inspected and cut (Fowler et al., 1986).

In parietal and perivisceral trophocytes of the species examined, protein granules exhibit many shapes revealed by ultrastructural cytochemistry, indicating that some of them may have different chemical compositions and form complex with polysaccharides and lipids, which were identified in these cells through other techniques (Roma et al., 2006).

The occurrence of basic proteins in the trophocytes of workers of basal and derived species was similar, corroborating the histochemical results obtained previously for these species by Roma et al. (2006).

Regarding oenocytes, the ultrastructural and cytochemical analysis for basic proteins revealed the presence of protein granules in parietal and perivisceral oenocytes of all species. According to Roma et al. (personal communication), proteins present in oenocytes might be synthesized by the cell, as a well-developed rough endoplasmic reticulum was observed in the oenocytes of these workers, mainly in *C. rimosus*, or may be absorbed from the haemolymph through the plasma membrane reticular system (PMRS), also observed in the oenocytes of *A. laevigata*.

One possible role for the basic proteins present in the parietal and perivisceral oenocytes might be associated with the processes of maintenance of the cuticle, in the synthesis lipoprotein compounds deposited in the epicuticle (Hepburn, 1985, Zara et al., 2003), making it impermeable.

Lipids were also detected in parietal and perivisceral trophocytes of the species examined in this study and might play a role in the regulation of the chemical composition of the haemolymph, similarly to proteins, as storage sites in the cells to meet the metabolic needs of these workers, confirming the reported in the literature for other species of insects (Keeley, 1985, Zara et al., 2003). Moreover, lipids may be sources of energy, especially for leg muscles during searches for food for the colony, as the main activity of these workers is foraging.

The presence of lipids inside membranous structures in the cytoplasm of trophocytes may indicate that these compounds are frequently mobilized by these cells to provide energy for the several processes involved in the metabolism of the cell. These results are in agreement with those obtained by Paes de Oliveira (2002) and Zara et al. (2003) for workers of bees *Melipona quadrifasciata anthidioides* and larvae of the ant *P. villosa*, respectively.

The different shapes of lipid deposits in trophocytes of workers of *C. rimosus*, *M. parallelus*, *A. disciger*; and *A. laevigata* indicate that they might form complexes with other compounds, such as proteins, confirming the observed by Cruz-Landim (1985) that reported that lipids stored in trophocytes of bees might form lipoprotein complexes. In addition, differences in electron density found in lipid droplets of the

species examined suggest different types of triglycerides containing different fatty acids (saturated and unsaturated) of various chain sizes and levels of saturation, or even association with other compounds (Locke, 1984).

The presence of large amount of mitochondria in trophocytes suggest that they may be responsible for part of the synthesis of lipids present in these cells, confirming the observed by Caperucci and Camargo-Mathias (2006) and Denardi et al. (2006) in oocytes of the ant *Neoponera villosa* and salivary gland cells of ticks *Amblyomma cajennense*, respectively. However, lipids may also be absorbed from the haemolymph to be stored, as reported by other authors of other insects (Chapman, 1998, Zara et al., 2003).

Regarding oenocytes, large electrondense lipid granules or droplets were observed in parietal as well as perivisceral oenocytes of the species examined in the present study, corroborating Camargo-Mathias and Caetano (1996) in *P. villosa* workers.

Roma et al. (2006), based on histochemical analyses, suggested that in workers of the species examined in this study, as well as in many other insects (Wigglesworth, 1970, Blomquist and Dillwith, 1985), these elements might be involved in the synthesis of waxes and hydrocarbons, which are deposited in the epicuticle to waterproof its surface and prevent water and ion loss, in addition to playing a role in the recognition of individuals of the same caste and species (Blomquist and Dillwith, 1985). Also, hydrocarbons synthesized by oenocytes may be pheromone precursors (Wei et al., 2003), especially in workers of derived species, which form long trails.

Lipids present in oenocytes of the studied species may be absorbed directly from the haemolymph through the plasma membrane reticular system (PMRS), which was observed in oenocytes of *A. laevigata* (Roma et al., personal communication). These data corroborate the reported by Ignatti (2001) for oenocytes of *Atta sexdens*. Another hypothesis is that elements are being synthesized in mitochondria, since parietal and perivisceral oenocytes of *C. rimosus* and *M. parallelus* exhibited large quantities of this organelle near lipid storages.

The ultrastructural cytochemistry analysis for unsaturated lipids revealed that these compounds were more abundant in derived workers than basal ones, in parietal

and perivisceral trophocytes as well as oenocytes, confirming the results reported by Roma et al. (2006) based on histochemical analyses for these species.

The chemical analysis using gas chromatography of the fat body of workers revealed that the main lipid compounds found in this tissue were myristic, palmitic, stearic, oleic, and linoneic acids, as reported by Howard and Stanley-Samuelson (1996) and Zara et al. (2002) for adults beetles of *Zophobas atratus* and larvae of *P. villosa*, respectively.

Fatty acids may be present as triglycerides, the main form of storage in fat body cells, especially in trophocytes, which play a role in energy storage for the several metabolic processes in these insects, as this tissue is characterized by having high quantities of lipid compounds, as also suggested by other authors (Blomquist and Dillwith, 1985, Zara et al. 2003). However, stearic acid is the main fatty acid found in fat body cells of *C. rimosus*, *A. disciger* and *A. laevigata*, while in *M. parallelus*, is palmitic acid.

Fatty acids present in trophocytes and oenocytes of workers examined may be part of structural lipids present in cell membranes. Another hypothesis is that these compounds are a source for the synthesis of cuticular hydrocarbons, especially myristic, palmitic, and stearic acids in the fat body cells, mainly in oenocytes to be later transported to the cuticle. These findings are supported by the observed by Blomquist and Dillwith (1985) and Zara et al. (2002) in other insects.

This analysis also revealed that saturated acids predominate in basal species, while in derived ones, saturated as well as unsaturated acids are found. This suggests that there are differences in the synthesis of chemical products in the fat body cells of basal and derived species. According to Blomquist and Dillwith (1985), oleic and linoleic acids are pheromone precursors used mainly in scent-marking of trails and therefore are essential for derived species, which form long trails during foraging, while basal species have foraging areas of few centimeters around their nests.

### **Acknowledgments**

This work was financed by the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Grant nº 04/01768-0. We are grateful to CEIS (Centro de Estudos

de Insetos Sociais) and Eduardo Arrivabene Diniz for the insects supply, to CEA (Centro de Estudos Ambientais) and Alex Fernando de Almeida for the technical assistance in conducting the experiments of Gas Chromatography, to Antonio Teruyoshi Yabuki, Cristiane Marcia Miléo, Mônica Iamonte and Rogerio Sueshiro Hatore for the technical support.

## 5. References

Angermüller S, Fahimi DH. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem J* 1982; 14: 823-25.

Blomquist GJ, Dillwith JW. Cuticular lipids. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press; 1985. p. 117-54.

Bolton B. *Synopsis and classification of Formicidae*. Gainesville: Memoirs of the American Entomological Institute, 2003.

Camargo-Mathias MI, Caetano FH. Ultrastructural cytochemistry of oenocytes of *Pachycondyla villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Acta Microsc* 1996; 5A: 6000-03.

Caperucci D, Camargo-Mathias MI. Lipids in oocytes of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Sociobiology* 2006; 47: 531-42.

Chapman RF. *The insect: structure and function*. Cambridge: University Press, 1998.

Ciola R. *Fundamentos da cromatografia a gás*. Oxford: Pergamon Press, 1985.

Cruz-Landim C. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. *Rev Bras Biol* 1985; 45: 221-32.

Dean RL, Locke M, Collins JV. Structure of fat body. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press; 1985. p. 155-210.

Denardi SE, Camargo-Mathias MI, Bechara GH. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): salivary glands cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. *Exp Parasitol* 2006; 113: 30-5.

Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.

Fowler HG, Pereira-da-Silva V, Forti LC, Saes NB. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: Lofgren CS, Vander Meer RK, editors. *Fire ants and leaf-cutting ants – biology and management*. Boulder: Westview Press; 1986. p. 123-45.

Gullan PJ, Cranston PS. *The insects: an outline of entomology*. Oxford: Blackwell Science, 2000.

Hepburn HR. Structure of the integument. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press; 1985. p. 1-58.

Hölldobler B, Wilson EO. *The ants*. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

Howard RW, Stanley-Samuelson DW. Fatty acid composition of fat body and Malpighian tubules of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*: significance in eicosanoid-mediated physiology. *Comp Biochem Physiol* 1996;115B: 429-37.

Ignatti AC. Histoquímica e citoquímica ultra-estrutural do corpo gorduroso de rainhas de formigas *Atta sexdens* (L., 1758) (Hymenoptera: Formicidae). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 2001.

Keeley LL. Endocrine regulation of fat body development and function. *Annu Rev Entomol* 1978; 23: 329-52.

Keeley LL. Physiology and biochemistry of the fat body. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press; 1985. p. 211-48.

Locke M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: King RC, Akai H, editors. *Insect ultrastructure*. New York: Plenum Press; 1984. p. 151-97.

MacRae EK, Meltz GD. Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. *J Cell Biol* 1970; 45: 235-45.



Paes de Oliveira VT. Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 2002.

Paes de Oliveira VT, Cruz-Landim C. Morphology and function of insect fat body cells: A review. *Biociências* 2003; 11: 195-205.

Palli SR, Locke M. The synthesis of haemolymph proteins by the larval fat body of an insect *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperidae). *Insect Biochem* 1988; 18: 405-13.

Roma GC, Camargo-Mathias MI, Bueno OC. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron* 2006; 37: 234-42.

Rosell RC, Wheeler DE. Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Buckley) (Hymenoptera). *Int J Insect Morphol Embryol* 1995; 24: 413-26.

Sayah F, Karlinski A, Brecizet M. Hormones regulating structural changes in the adipocytes of the female earwig *Labidura riparia*. *Tissue Cell* 1994; 26: 587-97.

Shultz TR, Meier R. A phylogenetic analyses of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *System Entomol* 1995; 20: 337-70.

Wei W, Miyamoto T, Endo M, Murakawa T, Pu GQ, Ando T. Polyunsaturated hydrocarbons in the haemolymph: biosynthetic precursors of epoxy pheromones of geometrid and arctiid moths. *Insect Biochem Mol Biol* 2003; 33: 397-405.

Wigglesworth VB. Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue Cell* 1970; 2: 155-79.

Wyatt GR. The fat body as a protein factory. In: Locke M, Smith DS, editors. *Insect biology in the future*. New York: Academic Press; 1980. p. 201-25.

Zara FJ, Cabrera AC, Jaffé K, Caetano FH. Chemical analysis of different larval instars and tissues of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Hymenoptera: Formicidae, Ponerinae). *Sociobiology* 2002; 39: 89-101.

Zara FJ, Caetano FH, Cabrera ACG, Jaffé K. Ultrastructure of last larval instar fat body cells of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Formicidae: Ponerinae): cytochemical and chemical analysis. *Animal Biol* 2003; 53: 1-16.

**FAT BODY CELLS OF FEMALE REPRODUCTIVE CASTES OF ATTINI  
ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) FOCUSING AN  
ULTRASTRUCTURAL AND CHEMICAL ANALYSES**

Gislaine Cristina Roma <sup>a</sup>, Odair Corrêa Bueno <sup>a,b</sup>, Maria Izabel Camargo Mathias <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

<sup>b</sup> Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A nº 1515, Rio Claro, SP, Brasil, CEP: 13506-900, C. P. 0199

**Running Title:** Fat body cells of gynes and queens of Attini ants

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35340009. E-mail address: micm@rc.unesp.br

### Resumo

O estudo ultra-estrutural do corpo gorduroso das “gynes” das espécies de formigas basais *Cyphomyrmex rimosus* e *Mycetarotes parallelus* e das rainhas derivadas *Acromyrmex disciger* e *Atta laevigata* revelou nos trofócitos retículo endoplasmático rugoso vesicular, complexos de Golgi e mitocôndrias, sugerindo o envolvimento dessas células nos processos de síntese protéica, além de vacúolos digestivos relacionados com a digestão de componentes endocitados, ou então, com o descarte de organelas celulares. Os enócitos, outra célula presente no corpo gorduroso destas espécies, apresentaram mitocôndrias, vacúolos digestivos e vesículas, indicando a mobilização de materiais por essas células. Na espécie *A. laevigata* os enócitos também mostraram grandes depósitos de glicogênio, além de retículo endoplasmático rugoso vesicular muito desenvolvido, sugerindo a intensa participação dessas células na síntese de proteínas. O estudo citoquímico ultra-estrutural revelou ainda nos trofócitos a presença de proteínas básicas na forma de grânulos eletrondensos distribuídos por todo o citoplasma, o mesmo sendo observado nos enócitos, porém, nesses últimos a quantidade de proteínas encontrada foi menor. No citoplasma dos trofócitos e dos enócitos também foram encontrados lipídios na forma de gotículas ou grânulos eletrondensos, devido à técnica aplicada. Nos enócitos de *A. disciger* e nos trofócitos de *A. laevigata* foram encontradas mitocôndrias com lipídios no seu interior, sugerindo ser aí também um provável sítio de síntese destes elementos. A análise química dos lipídios revelou que nas “gynes” os principais compostos presentes nas células do corpo gorduroso foram os ácidos graxos saturados, enquanto que nas rainhas tanto os saturados quanto os insaturados.

**Palavras-chave:** trofócito, enócito, proteínas, lipídios, cromatografia gasosa, formigas

### Abstract

The ultrastructural study on the fat body of gynes of the basal ant species *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and the derived *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* queens revealed vesicular rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes, and mitochondria in trophocytes, suggesting the involvement of these cells in protein synthesis, in addition to digestive vacuoles associated with the digestion of endocytosed compounds or rejected cell organelles. Oenocytes, another cell type present in the fat body of these species exhibit mitochondria, digestive vacuoles, and vesicles, indicating a mobilization of compounds by these cells. In *A. laevigata*, oenocytes also exhibited large storage sites of glycogen, in addition to a well-developed vesicular rough endoplasmic reticulum, suggesting an intensive participation of these cells in protein synthesis. The ultrastructural cytochemistry study also revealed electron-dense granules of basic proteins present throughout the cytoplasm of trophocytes. The same was observed in oenocytes, although with smaller amounts of proteins. In the cytoplasm of trophocytes and oenocytes were also found droplets or electron-dense granules of lipids, due applied technique. In oenocytes of *A. disciger* and in trophocytes of *A. laevigata*, lipids were observed in mitochondria, suggesting that this organelle might be a site of synthesis of these compounds. The chemical analysis of lipids revealed that in gynes, the main compounds present in fat body cells were saturated fatty acids, while in queens, saturated as well as unsaturated fatty acids were found.

**Keywords:** trophocyte, oenocyte, proteins, lipids, gas chromatography, ants

## 1. Introduction

The fat body of insects is a diffuse and irregular tissue that functions as a storage site of food reserves (Staurengo da Cunha and Cruz-Landim, 1983).

This tissue consists mostly of only one cell type termed trophocyte, with several functions and capable of storing proteins, carbohydrates, and lipids. Other specialized cell types may also be associated with trophocytes, such as urate cells, mycetocytes, chromatocytes, and oenocytes (Staurengo da Cunha and Cruz-Landim, 1983).

Trophocytes are found in all life stages of insects. Their shape, content, and volume vary depending on the developmental stage and nutritional condition of the insect. However, a characteristic of this cell type is a cytoplasm filled with lipids (Locke, 1984).

In adult reproductive females of insects, trophocytes are mainly involved in the synthesis of vitellogenin, a lipoglycoprotein secreted into the haemolymph and absorbed by developing oocytes through the follicular epithelium (Paes de Oliveira and Cruz-Landim, 2004).

The Attini tribe is comprised of ants classified in basal and derived genera. Both cultivate a type of symbiotic fungus used to feed larvae and sometimes adults (Shultz and Meier, 1995). Basal species feed seeds, animal feces, insect bodies, pieces of fruits, and dead insects to their symbiotic fungi; while derived species use fresh leaves and flowers (Hölldobler and Wilson, 1990).

The aim of the present study was to describe the ultrastructure of fat body cells of gynes of ants of the basal species *Cyphomyrmex rimosus* Spinola and *Mycetarotes parallelus* Emery and queens of the derived species *Acromyrmex disciger* Mayr and *Atta laevigata* Smith of the Attini tribe, and also to demonstrate through ultrastructural cytochemistry techniques what compounds are produced by these cells, as well as to identify through chemical analysis, the specific types of fatty acids synthesized.

## 2. Material and Methods

The present study used the parietal and perivisceral fat body from gynes of *C. rimosus* and *M. parallelus* (monomorphic species) and queens of *A. disciger* and *A. laevigata* (polymorphic species), collected in the field and immediately submitted to the techniques. The individuals were anesthetized by cooling in a freezer and dissected on Petri dishes with physiological saline solution for insects (NaCl 7,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g/L).

### 2.1. Ultrastructure - Transmission Electron Microscopy (TEM)

The fat body was fixed in 2,5% glutaraldehyde fixative solution in 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2) for 2 hours. Two 15 minutes washes in cacodylate buffer followed this process. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide in 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2) for 2 hours, in the darkness followed by another two 15 minutes washes in the same buffer. For contrast, the material was immersed in a solution of 2% uranyl acetate in 10% acetone, for 4 hours, in the darkness. The dehydration was performed in a graded 50, 70, 90, 95 and 100% acetone series, for 5 minutes each. Then, the material was embedded in Epon resin diluted in acetone (1:1) for 12 hours, included in pure Epon resin and incubated at 60°C for 24 hours. After polymerized semithin sections were obtained with ultramicrotome Sorvall – Porter Blum MT2-B and stained with Azur II (1%) and Methylene Blue (1%).

Grids containing ultrathin sections of the material were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 45 minutes and 10 minutes, respectively. Then, they were analysed and photographed in a PHILIPS CM 100 Transmission Electron Microscopy.

### 2.2. Ultrastructural cytochemistry

#### 2.2.1. Detection of basic proteins

The fat body of all species were fixed in 2,5% glutaraldehyde 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2), for 2 hours, washed in distilled water, incubated in ammonium silver

solution (10% silver nitrate added to a concentrated solution of ammonium hydroxide), according to the method of ammonium silver (MacRae and Meltz, 1970), for 5 minutes at room temperature. Next, the material was washed in distilled water and incubated in 3% formaldehyde for 5 minutes, in which the material acquired a brown coloration. Immediately afterwards, the material was washed in distilled water and post-fixed according to routine procedures.

### 2.2.2. Detection of unsaturated lipids

The fat body were fixed in 2,5% glutaraldehyde in 0,1M cacodylate buffer (pH 7,2), for 2 hours. The material was then washed twice in the same buffer for 15 minutes each. The material was post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0,1M imidazole buffer (pH 7,5) for 30 minutes in the dark. Afterwards, the material was washed once in 0,1M imidazole buffer (pH 7,5) for 15 min, followed by acetone dehydration and then include in Epon resin, according to the method of Angermüller and Fahimi (1982).

## 2.3. Chemical analyses

The total fat body (parietal and perivisceral) of 20 gynes of *C. rimosus* and, 15 of *M. parallelus* and 10 queens of *A. disciger*, and 8 of *A. laevigata* were removed in physiological solution for insects and stored in amber test tubes with caps and maintained in a freezer to conserve chemical properties until used.

### 2.3.1. Extraction of total lipids (Folch et al., 1957)

One milliliter of chloroform and 0,5 mL of methanol were added to each sample and then left at room temperature for 24 hours. One forth of the total volume of 0,85% KCl saline solution was added to the mixture for the separation of phases, one containing chloroform and lipids and another, methanol with KCl and non-lipid compounds such as proteins and carbohydrates. The lower phase was carefully removed with a Pasteur pipette and transferred to another tube. The solvent was removed in nitrogen atmosphere at room temperature and tubes were placed in a vacuum desiccator.

### 2.3.2. Preparation of fatty acid methyl esters

The composition of fatty acids of lipids was determined by gas chromatography after prior esterification or transesterification to form methyl esters that increase the volatility of these compounds and yielding better results. Thus, base-catalyzed esterification and transesterification were used.

To this end, 50  $\mu\text{L}$  of 2M methanolic sodium hydroxide were added to each sample and maintained in a tube shaker Phoenix AT56 for 30 seconds and allowed to stand for 30 minutes. Later, 100 mg of anhydrous calcium chloride were added to each sample to absorb water molecules formed during esterification, followed by centrifugation at 4000 rpm during 8 minutes. The upper phase was collected and injected in a gas chromatographer Finnigan–Tremetrics 9001.

### 2.3.3. Analysis of the composition of fatty acids by gas chromatography

After methylation of total lipids, methyl esters were analyzed by gas chromatography in an FFAP column (Free Fatty Acid Phase – 30 m, 1  $\mu\text{m}$  film) under the following conditions: hydrogen flow = 20 mL/min, nitrogen flow = 25 mL/min, synthetic air flow = 175 mL/min, carrier gas = hydrogen, work pressure = 4 psi, injector temperature = 210°C, detector temperature = 250°C, sample division = 10:1, column temperature = 50°C for 1 min, programmed from 45°C/min to 190°C maintained for 1 minute, followed by 2°C/min until 196°C maintained for 2 min, and 10°C/min until 336°C maintained for 3 min.

The identification of fatty acids was conducted by integration of components of the sample with those of standards (Sigma) of fatty acid methyl esters using the software Borwin installed in computer coupled to the gas chromatographer.

### 2.3.4. Analysis by external standardization

Calibration samples were prepared containing different concentrations of standard solutions of methyl ester of the acids: myristic (MA: C14:0), palmitic (PA: C16:0), stearic (SA: C18:0), oleic (OA: C18:1), and linoleic (LA: 18:2) that were injected into the gas chromatographer. After identification of the corresponding peaks,



linearity was determined with concentration in the abscissa and peak area in the ordinate (Ciola, 1985).

### 3. Results

#### 3.1. Ultrastructure

The parietal and perivisceral trophocytes of gynes and queens examined in this study lay on a basal lamina that may be individual or fused when two or more trophocytes are adjacent. The same occurs between trophocytes and oenocytes, or between oenocytes (Figs. 1A, E, H, S; 2A, B-D, J, L, P). In some trophocytes of *A. disciger*, the basal lamina exhibits deep invaginations (Figs. 2A, J). Accompanying the plasma membrane, an extensive plasma membrane reticular system (PMRS) is present in trophocytes of this species (Figs. 2D, H), as a result of invaginations.

In parietal and perivisceral trophocytes of *C. rimosus*, *M. parallelus* and *A. disciger*, electronlucent droplets, probably lipids, of varied shapes and sizes are present, some apparently are undergoing fusion (Figs. 1A, D, M, N, P; 2A, G). In addition, very electrondense granules are observed in parietal and perivisceral trophocytes of *C. rimosus* (Figs. 1B-D) and parietal trophocytes of *M. parallelus* (Fig. 1M), possibly consisted of proteins.

Many vesicles are distributed throughout the cytoplasm (Figs. 1A; 2D, H) in trophocytes of *C. rimosus* and *A. disciger*. In the latter, large storage sites of glycogen are also present (Figs. 2C, E, G).

The ultrastructural analysis of the trophocytes of gynes of *C. rimosus* and queens of *A. disciger* and *A. laevigata* also revealed the presence of digestive vacuoles (Figs. 1B; 2I, Q, S), characterized as electrondense structures enclosed by a membrane containing compounds undergoing digestion, which may be organelles or components endocytosed by the cell.

In the trophocytes of all species, extensive portions of the cytoplasm are occupied by vesicular rough endoplasmic reticulum, especially in the regions near the nucleus (Figs. 1B-C, L; 2E-G, O-P, R), Golgi complexes (Figs. 1J-K, O), in addition to mitochondria (Figs. 1B; 2F, P).

The nuclei of parietal and perivisceral trophocytes are irregular, star-shaped in gynes (Figs. 1B, N) and ramified in queens (Figs. 2F, R). In figure 2O, ramifications of a single nucleus of *A. laevigata* are observed in cross sections, giving its spherical shape.

In general, electronlucent droplets are present (Figs. 1Q-R) in the cytoplasm of parietal and perivisceral oenocytes, as well as mitochondria (Figs. 1F-G, I; 2M-N, U), digestive vacuoles (Figs. 1G, I; 2K), in addition to several vesicles (Figs. 1G, I; 2M-N). In parietal and perivisceral oenocytes of *A. laevigata*, vesicles are characterized by very electrondense granules, possibly containing proteins, around as well as inside these cells (Fig. 2X). In *M. parallelus*, the Golgi complex is not well developed (Fig. 1S), while in *A. laevigata*, oenocytes exhibit a well-developed vesicular rough endoplasmic reticulum (Figs. 2U, X) and abundant storage sites of glycogen (Figs. 2V, Z).

The nuclei of oenocytes are in general spherical, although they may be irregular in some cells (Figs. 1F, Q-R; 2K, T, X).

Several tracheoles are observed near trophocytes and oenocytes of gynes and queens (Figs. 2H; 4K).

### 3.2. Detection of basic proteins

Parietal and perivisceral trophocytes of gynes and queens exhibit a basal lamina devoid of basic proteins (Figs. 3G, L, V). However, in the cytoplasm of these cells, proteins are found as very electrondense granules of varied shapes and sizes distributed throughout the cytoplasm (Figs. 3A-D, G-J, N-O, S-W). In *C. rimosus*, some of these granules have a intermediate electrondensity (Figs. 3A, C).

In general, the results are similar for trophocytes of gynes and queens and no differences are observed between parietal and perivisceral trophocytes within each species (Figs. 3A-D, G-J, N-O, S-W).

In oenocytes, basic proteins are not detected in the basal lamina (Figs. 3L, P, Y). However, a positive reaction is observed in very electrondense granules distributed throughout the cytoplasm (Figs. 3E-F, K, M, P-R, X, Z). As observed in trophocytes, oenocytes of the examined species had similar results. No differences are observed

between parietal and perivisceral oenocytes within each species (Figs. 3E-F, K, M, P-R, X, Z).

Based on these results, a larger amount of basic proteins is observed in trophocytes than oenocytes of the studied species (Fig. 3).

### 3.3. Detection of unsaturated lipids

The basal lamina of parietal and perivisceral trophocytes of species of gynes and queens has intermediate positivity for unsaturated lipids (Figs. 4A, H, P, Q, X).

The results also show lipids present as electrondense granules of different shapes and sizes distributed throughout the cytoplasm of these cells (Figs. 4C, E, H-J, O, Q, T-U). In trophocytes of *C. rimosus* and *A. disciger*, droplets gave a positive reaction; most are spherical (Figs. 4B, D, P-Q). In general, in *C. rimosus*, the boundaries of droplets are more electrondense than the interior (Figs. 4B, D).

In the trophocytes of *C. rimosus*, membranous structures, probably digestive vacuoles, are positive to the test. In *A. laevigata*, mitochondria containing lipids are also found (Figs. 4T-U).

Regarding oenocytes, the basal lamina has intermediate positivity to this test in the studied species (Figs. 4K, X).

Lipids exhibit large and very electrondense granules in oenocytes of *M. parallelus* (Figs. 4L, N), or an intermediate electrondensity in *C. rimosus* (Figs. 4F-G) and *A. laevigata* (Figs. 4V, Z). In parietal and perivisceral oenocytes of *M. parallelus* and *A. disciger*, lipids are present as spherical and electrondense droplets (Figs. 4M, R-S).

In oenocytes of *A. disciger*, mitochondria containing lipids (Fig. 4S) are observed, while in *M. parallelus* and *A. laevigata* membranous structures are positive to the test (Figs. 4L, Z).

In general, this test reveals that unsaturated lipids are present in larger amounts in trophocytes than in oenocytes in the examined species (Fig. 4).

### 3.4. Chemical analyses

In present study, the chemical analysis using gas chromatography of the total fat body (parietal and perivisceral) of gynes and queens reveals that the main lipid compounds found in these cells are the saturated fatty acids myristic, palmitic, and stearic; and the unsaturated ones oleic and linoleic. This analysis also detects that in gynes of basal species, saturated fatty acids are more abundant, while in derived queens, saturated as well as unsaturated are found (Table 1).

**Table 1:** Comparative chemical results of the total concentration ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) and relative abundance (%) of the main compounds present in the fat body cells of gynes of the ants *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and queens of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*.

	Species	Fatty Acids ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )				
		MA	PA	SA	OA	LA
<b>Gynes</b>	<i>C. rimosus</i>	1,37 (3%)	2,30 (5%)	40,41 (92%)	tr	tr
	<i>M. parallelus</i>	0,46 (0,5%)	0,76 (0,8%)	78,84 (83,4%)	14,43 (15,3%)	tr
<b>Queens</b>	<i>A. disciger</i>	3,82 (1,7%)	5,75 (2,6%)	168,22 (75,8%)	30,31 (13,6%)	13,78 (6,2%)
	<i>A. laevigata</i>	4,18 (0,7%)	26,63 (4,3%)	420,76 (67,5)	131,36 (21%)	40,43 (6,5%)

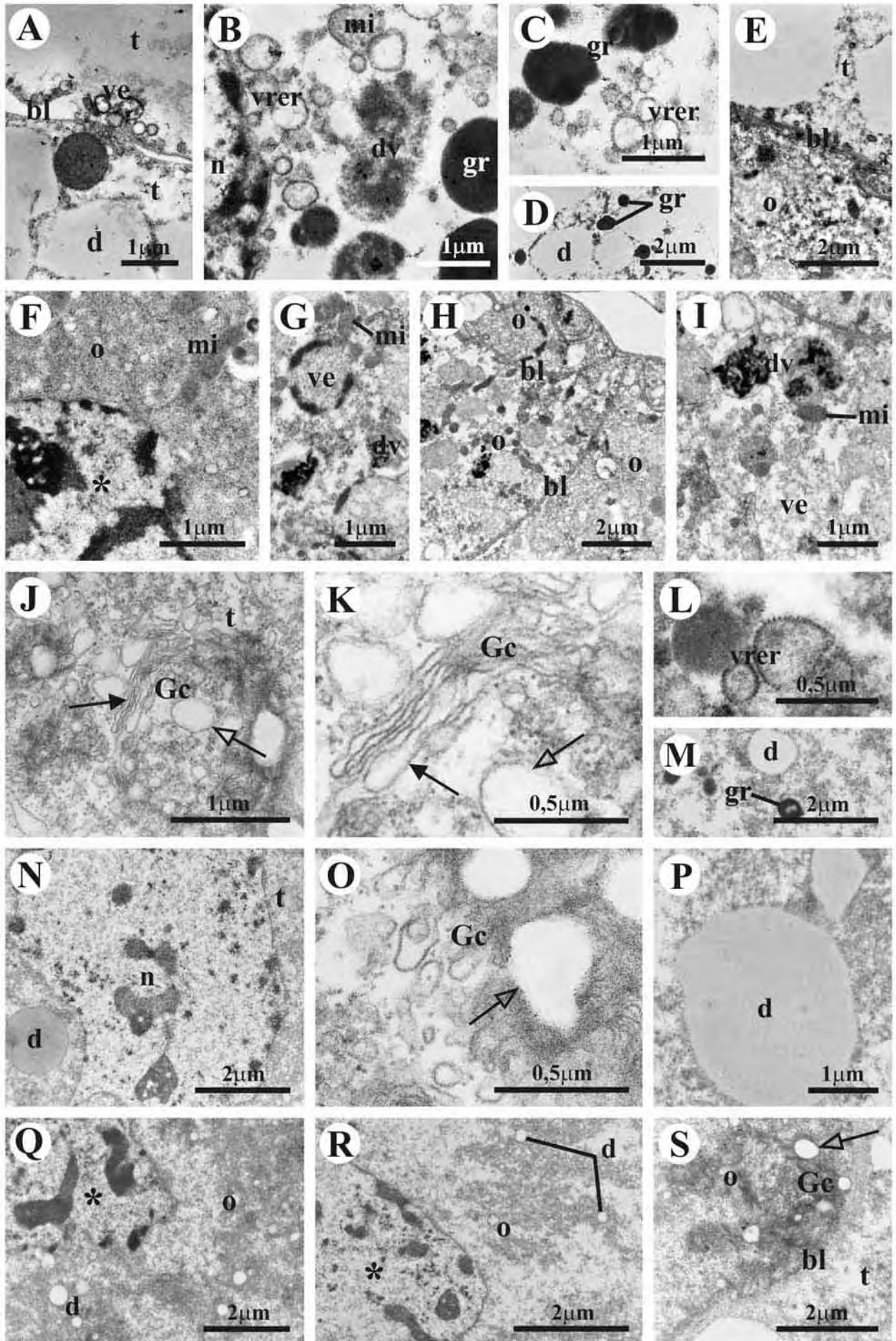
MA (C14:0) = Myristic Acid  
PA (C16:0) = Palmitic Acid  
SA (C18:0) = Stearic Acid  
OA (C18:1) = Oleic Acid  
LA (C18:2) = Linoleic Acid  
tr = traces (<0,01%)

## *FIGURES*



**Figure 1:** Electron micrograph of the fat body cells from gynes of the basal species of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus*.

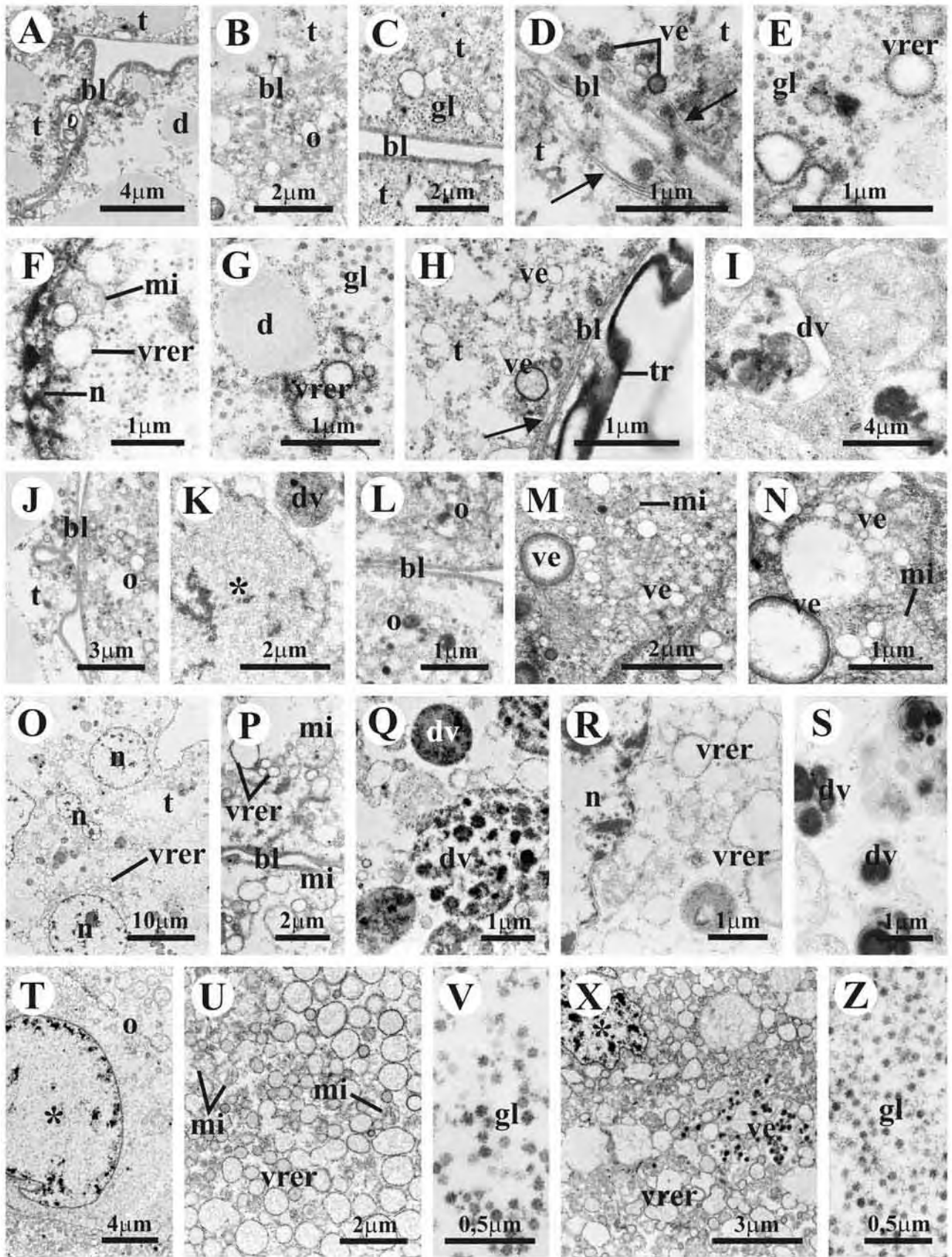
(**A-B**) *C. rimosus* parietal trophocytes (**t**) and (**C-E**) perivisceral ones showing nucleus (**n**), electronlucent droplets (**d**), eletrondense granules (**gr**), mitochondria (**mi**), vesicular rough endoplasmic reticulum (**vrer**), vesicles (**ve**) and digestive vacuoles (**dv**). Observe in **A** the individual basal lamina (**bl**) of adjacent trophocytes and in **E** the fusion of basal lamina among trophocytes and oenocytes (**o**). (**F-G**) Detail of *C. rimosus* parietal oenocytes (**o**) and (**H-I**) perivisceral ones exhibiting the nucleus (\*), mitochondria (**mi**), vesicles (**ve**) and digestive vacuoles (**dv**). Observe in **H** the fusion of basal lamina (**bl**) among oenocytes. (**J-M**) *M. parallelus* parietal trophocytes (**t**) and (**N-P**) perivisceral ones showing well-developed Golgi complex (**Gc**) with flattened (—→) and dilated (—▷) vesicles, besides the nucleus (**n**), electronlucent droplets (**d**), eletrondense granules (**gr**) and vesicular rough endoplasmic reticulum (**vrer**). (**Q**) Detail of *M. parallelus* parietal oenocytes (**o**) and (**R-S**) perivisceral ones exhibiting the nucleus (\*), electronlucent droplets (**d**) and the Golgi complex (**Gc**) few-developed with dilated vesicles (—▷). Observe in **S** the fusion of basal lamina (**bl**) among oenocytes and trophocytes (**t**).



**Figure 2:** Electron micrograph of the fat body cells from queens of the derived species of *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata*.

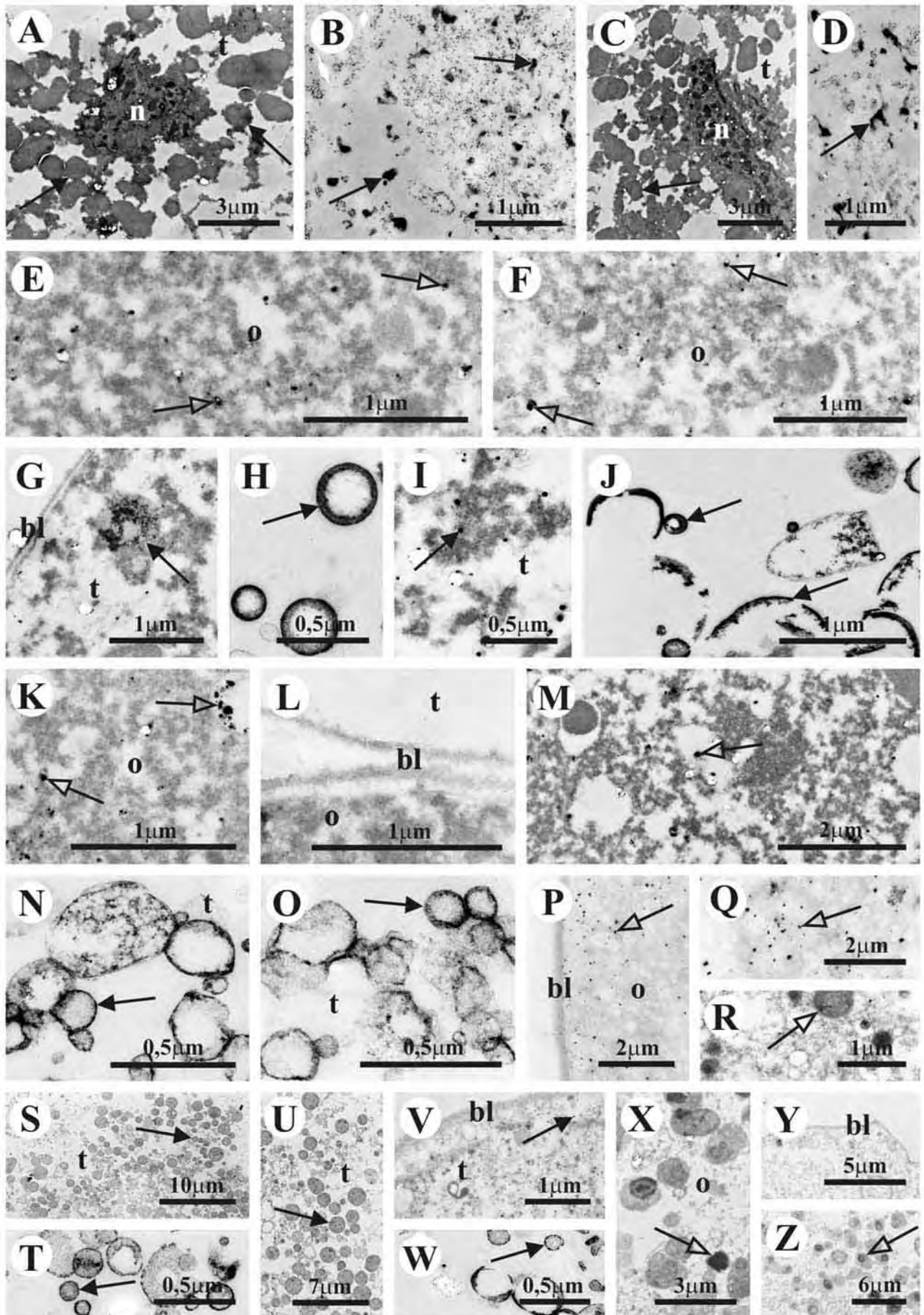
(**A-E**) *A. disciger* parietal trophocytes (**t**) and (**F-I**) perivisceral ones showing nucleus (**n**), electronlucent droplets (**d**), mitochondria (**mi**), vesicular rough endoplasmic reticulum (**vrer**), vesicles (**ve**), digestive vacuoles (**dv**), tracheoles (**tr**) and deposits of glycogen (**gl**). Observe in **A** the deep invaginations of plasma membrane and basal lamina (**bl**). The figure **B** shows the fusion of basal lamina among trophocytes (**t**) and oenocytes (**o**) and in **C-D** the individual basal lamina among adjacent trophocytes. Observe in **D** and **H** the plasma membrane reticular system (PMRS) of the trophocytes (—▶). (**J-L**) Detail of *A. disciger* parietal oenocytes (**o**) and (**M-N**) perivisceral ones exhibiting the nucleus (\*), mitochondria (**mi**), vesicles (**ve**) and digestive vacuoles (**dv**). Observe in **J** and **L** the individual basal lamina (**bl**) between trophocytes (**t**) and oenocytes (**o**), and among oenocytes, respectively. (**O-Q**) *A. laevigata* parietal trophocytes (**t**) and (**R-S**) perivisceral ones showing nucleus (**n**), vesicular rough endoplasmic reticulum (**vrer**), mitochondria (**mi**) and digestive vacuoles (**dv**). Observe in **P** the individual basal lamina (**bl**) among adjacent trophocytes. (**T-V**) Detail of *A. laevigata* parietal oenocytes (**o**) and (**X-Z**) perivisceral ones exhibiting the nucleus (\*), mitochondria (**mi**), large extensions of vesicular rough endoplasmic reticulum (**vrer**) and deposits of glycogen (**gl**). Observe in **X** the eletrondense granules around and inside vesicles (**ve**).





**Figure 3:** Electron micrograph of the fat body cells from gynes of the basal species of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and queens of the derived species *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* submitted to the cytochemical test for basic proteins detection.

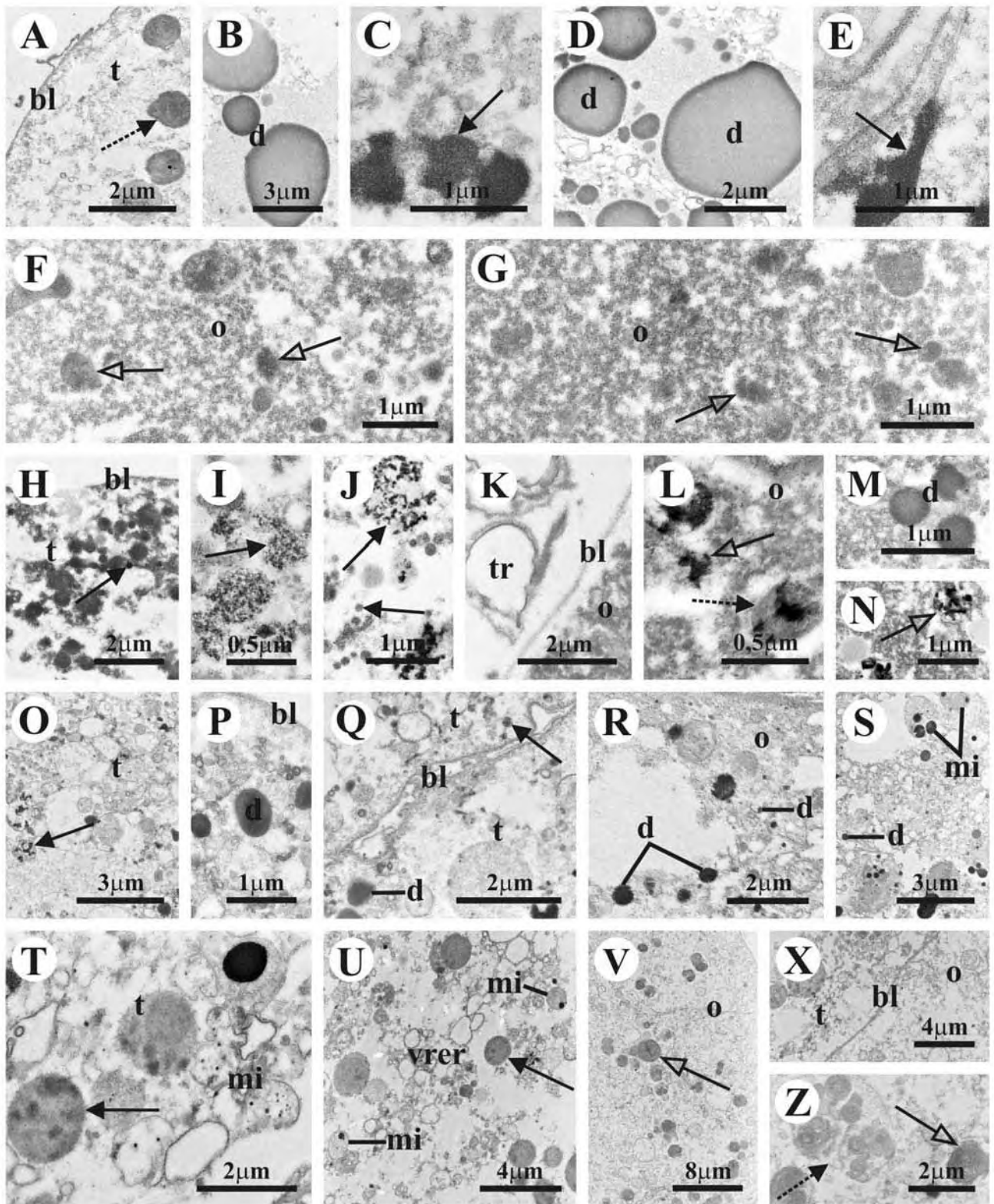
(A-B) *C. rimosus* parietal trophocytes (t) and (C-D) perivisceral ones showing the protein granules (→) and nucleus (n). Observe in A and C the intermediate electron-dense protein granules and in B and D the strongly electron-dense ones. (E) Detail of *C. rimosus* parietal oenocytes (o) and (F) perivisceral ones exhibiting the few strongly electron-dense protein granules (→). (G-H) *M. parallelus* parietal trophocytes (t) and (I-J) perivisceral ones showing the strongly electron-dense protein granules (→). Observe in G the negativity to the test of the basal lamina (bl). (K) Detail of *M. parallelus* parietal oenocytes (o) and (L-M) perivisceral ones showing the strongly electron-dense protein granules (→). Observe in L the basal lamina (bl) negative to the test. (N) *A. disciger* parietal trophocytes (t) and (O) perivisceral ones showing the strongly electron-dense protein granules (→). (P) Detail of *A. disciger* parietal oenocytes (o) and (Q-R) perivisceral ones exhibiting the strongly electron-dense protein granules (→). Observe in P the negativity to the test of the basal lamina (bl). (S-T) *A. laevigata* parietal trophocytes (t) and (U-W) perivisceral ones showing the strongly electron-dense protein granules (→). Observe in V the basal lamina (bl) negative to the test. (X) Detail of *A. laevigata* parietal oenocytes (o) and (Y-Z) perivisceral ones exhibiting the strongly electron-dense protein granules (→). Observe in Y the basal lamina (bl) negative to the test.



**Figure 4:** Electron micrograph of the fat body cells from gynes of the basal species of *Cyphomyrmex rimosus* and *Mycetarotes parallelus* and queens of the derived species *Acromyrmex disciger* and *Atta laevigata* submitted to the cytochemical test for unsaturated lipids detection.

(A-C) Parietal trophocytes (t) from *C. rimosus* and (D-E) perivisceral ones showing droplets (d) and granules (→) of lipids. Observe in A membranous structures (·····→) positive to the test and the intermediate positivity of the basal lamina (bl). (F) Detail of *C. rimosus* parietal oenocytes (o) and (G) perivisceral ones exhibiting the few lipids granules (→). (H-I) *M. parallelus* parietal trophocytes (t) and (J) perivisceral ones showing the lipids granules (→). Observe in H the intermediate positivity to the test of basal lamina (bl). (K-L) Detail of *M. parallelus* parietal oenocytes (o) and (M-N) perivisceral ones exhibiting droplets (d) and granules (→) of lipids. Observe in K the intermediate positivity of basal lamina (bl) and the tracheoles (tr) near the oenocytes. In figure L the lipids appears inside membranous structures (·····→). (O-P) Parietal trophocytes (t) from *A. disciger* and (Q) perivisceral ones showing droplets (d) and granules (→) of lipids and the intermediate positivity to the test of basal lamina (bl). (R) Detail of *A. disciger* parietal oenocytes (o) and (S) perivisceral ones exhibiting the lipids droplets (d). Observe in S lipids inside mitochondria (mi). (T) *A. laevigata* parietal trophocytes (t) and (U) perivisceral ones showing the lipids granules (→) and vesicular rough endoplasmic reticulum (vrer). Observe lipids inside mitochondria (mi). (V) Detail of *A. laevigata* parietal oenocytes (o) and (X-Z) perivisceral ones exhibiting lipids granules (→). Observe in X the intermediate positivity of basal lamina (bl) and in Z membranous structures (·····→) positive to the test.





#### 4. Discussion

The ultrastructural study of the fat body of gynes of *C. rimosus* and *M. parallelus* and queens of *A. disciger* and *A. laevigata* confirmed the results using light microscopy (histology and histochemistry) previously obtained by Roma et al. (2006). These authors reported that cells comprising this tissue are trophocytes and oenocytes, both located near the tegument (parietal) and surrounding organs (perivisceral).

Among cells of the fat body of gynes and queens, tracheoles were observed aiding the cohesion of cells, as this is a loose tissue, in addition to facilitating oxidative and respiratory processes (Chapman, 1998).

Regarding the basal lamina of trophocytes and oenocytes of the examined species, it is present in two forms depending on the distribution and proximity among fat body cells: individual or fused in certain regions. The basal lamina is known to play a role in supporting cells, as well as acting as a selective barrier for compounds from the haemolymph or from cell to cell when two adjacent cells present fused basal lamina.

In some trophocytes of *A. disciger*, the basal lamina also exhibited deep invaginations, accompanying the invaginations of the plasma membrane. In addition, a plasma membrane reticular system (PMRS) was observed in which only the membrane invaginates into the cell, forming a complex system of channels that deeply penetrate the cells, significantly increasing the surface area for absorption of compounds, mainly proteins from the haemolymph. These data confirm those obtained by Paes de Oliveira (2002) in trophocytes of *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

In queens of *A. disciger*, many vesicles were observed near the PMRS, suggesting that they might have been endocytosed by trophocytes and carry proteins from the haemolymph into the cytoplasm of these cells. These results are supported by those obtained by Ignatti (2001) and Thiele (2001) in queens of *Atta sexdens* and *Pachycondyla striata*, respectively. However, in addition to being found adjacent to the membrane, a large quantity of these vesicles was also observed distributed throughout the cytoplasm, suggesting that they might be a result of endocytosis and also contain compounds for the haemolymph, since during this life stage of adult females, many compounds, especially proteins, are released into the haemolymph to be incorporated into developing oocytes.

In general, the ultrastructural analysis of parietal and perivisceral trophocytes of gynes and queens showed extensive portions of the cytoplasm occupied by vesicular rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes, and mitochondria. These results indicate that during reproductive cycles, these castes have a highly specialized apparatus to produce proteins, especially vitellogenins, which are used during vitellogenesis (endogenous production), aiding the development of oocytes and consequently, of new individuals, including in gynes of *C. rimosus* and *M. parallelus*, which have ovaries with developed oocytes (Roma et al., 2006).

Results also confirming protein synthesis in trophocytes of gynes and queens are: 1) presence of vesicular rough endoplasmic reticulum, which according to Han and Bordereau (1982), is more active than the lamellar form, 2) irregular shaped nucleus, indicating that the cell is actively synthesizing proteins, and 3) presence of several protein granules stored in trophocytes demonstrated by the cytochemical and ultrastructural analysis.

According to Tanaka and Ishizaki (1974) and Cruz-Landim (1985), trophocytes of insect queens do not store vitellogenin. Thus, these proteins are released into the haemolymph immediately after being produced. The same may occur in the studied species and the granules stored in the cytoplasm of these cells might be structural and energy storages for the insect's general metabolism. For gynes of *C. rimosus* and *M. parallelus*, these proteins may also have a role in the insect's nutrition during colony founding, as this is a period when the insect does not feed (Thiele, 2001).

In parietal and perivisceral trophocytes of queens of *A. disciger*, glycogen storage sites were also found throughout the cytoplasm. The presence of this compound in this caste may be associated mainly with protein production of oocytes and all processes involving vitellogenesis, which demands high energy levels. This information is supported by the reported by Thiele (2001) in queens of *P. striata*.

The ultrastructural and cytochemical analysis also showed the presence of lipids stored in trophocytes of the reproductive castes examined. Since specific organelles for lipid synthesis were not found with frequency in trophocytes, these compounds might be directly absorbed from the haemolymph to be stored, similarly to the suggested by other authors for other insects (Cruz-Landim, 1985, Chapman, 1998). However, in queens of *A. laevigata*, part of these compounds might be also produced in

mitochondria, as many contained lipids, indicating the participation of this organelle in lipid synthesis. This information confirms the reported by Caperucci and Camargo-Mathias (2006) and Denardi et al. (2006) for the ant *Neoponera villosa* and the tick *Amblyomma cajennense*, respectively.

Lipids present in the trophocytes of the studied gynes and queens play a role mainly during oogenesis, which requires high levels of structural and energetic compounds, confirming the results by Paes de Oliveira (2002) in *M. quadrifasciata anthidioides* queens. In gynes, lipids may also be a source of energy necessary for the nuptial flight, confirming the results obtained by Lorenz and Anand (2004) in the grasshopper *Gryllus bimaculatus*.

Oenocytes of *A. laevigata* queens exhibit a well-developed vesicular rough endoplasmic reticulum and protein granules, confirming that these cells are mainly involved in protein synthesis, contrary to studies suggesting that these cells are characterized by well-developed smooth endoplasmic reticulum and are directly associated with lipid synthesis (Dean et al. 1985). Also, the presence of glycogen in oenocytes confirms the supply of energy needed for protein synthesis.

Although the presence of specific organelles for protein synthesis were not found with frequency in oenocytes of *A. disciger* queens, these cells might also be involved in this process, as their nuclei are irregular, indicative of cells with synthesis activity. In gynes, most proteins present in oenocytes might be absorbed from the haemolymph, as many vesicles were observed in the cytoplasm, especially in *C. rimosus*.

The proteins present in oenocytes are certainly associated with the final processes of oogenesis, especially in the formation of the membrane that involves the eggs of insects, confirming the observed by Camargo-Mathias and Caetano (1996) in another ants species.

Also regarding the oenocytes of reproductive castes, these cells exhibit granules or droplets of lipids, indicating that they consist of different fatty acids (saturated and unsaturated) (Locke, 1984). A possible role of lipids present in oenocytes may be waterproofing the cuticle against water and ion loss. Also, cuticular hydrocarbons may play a role in the recognition between species and castes (Blomquist; Dillwith, 1985). In the species examined in this study, lipids may also participate in the



composition of the chorion of eggs of these insects, which in addition to proteins, also contains lipids in its composition (Camargo-Mathias and Caetano, 1996).

In general, in trophocytes as well as oenocytes of gynes and queens, digestive vacuoles were observed mostly containing cell organelles being recycled, or proteins or lipids mobilized by the cell.

The chemical analysis conducted using gas chromatography of the total fat body (parietal and perivisceral) of gynes and queens revealed that the main lipids found were myristic, palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids, confirming the obtained by Howard and Stanley-Samuels (1996) in cells of the fat body of the beetle *Zophobas atratus*.

The fatty acids present might be lipids stored as triglycerides, especially in trophocytes, as reported in other insects (Blomquist and Dillwith, 1985, Zara et al. 2003). The results also showed that the main fatty acid stored in fat body cells of the reproductive castes examined is stearic acid, confirming the obtained by Roma et al. (personal communication), for workers of the same species. However, these authors described that in *M. parallelus* workers, palmitic acid is the main fatty acid most abundant, showing that fatty acids are stored differently between castes within the same species.

Although the ultrastructural and cytochemical analysis detected unsaturated lipids in the fat body cells of gynes, they were present in very low amounts in the analysis conducted using gas chromatography, except oleic acid found in *M. parallelus* gynes.

The fatty acids present in the fat body cells of these species may also be a source of compounds for cuticular hydrocarbons, especially saturated fatty acids, especially in oenocytes, to be later transported to the cuticle. These data confirm those obtained by Blomquist and Dillwith (1985) and Zara et al. (2002) for other insects. Cuticular hydrocarbons may also be involved especially in the recognition among species and castes, as mentioned previously. In *M. parallelus* gynes, in addition to saturated fatty acids, oleic acid (unsaturated) may also be a precursor of these elements, as it represents 15,3% of the total fatty acids found in this species.

In *A. disciger* and *A. laevigata* queens, oleic and linoleic fatty acids are probably mainly pheromone precursors (Blomquist and Dillwith, 1985), which, as

reported by Endler et al. (2004) in *Camponotus floridanus* queens, may prevent that workers of the colony develop ovaries and consequently reproduce, a form of auto control within the nest. Also, queens may mark their eggs with pheromones allowing workers to distinguish them from those of workers, signaling that the latter should be destroyed.

### Acknowledgments

This work was financed by the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Grant nº 04/01768-0. We are grateful to CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) and Eduardo Arrivabene Diniz for the insects supply, to CEA (Centro de Estudos Ambientais) and Alex Fernando de Almeida for the technical assistance in conducting the experiments of Gas Chromatography, to Antonio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte and Rogerio Sueshiro Hatore for the technical support.

### 5. References

- Angermüller S, Fahimi DH. 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem J* 14: 823-835.
- Blomquist GJ, Dillwith JW. 1985. Cuticular lipids. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3. Oxford: Pergamon Press. p 117-154.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. 1996. Ultrastructural cytochemistry of oenocytes of *Pachycondyla villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Acta Microsc* 5A: 6000-6003.
- Caperucci D, Camargo-Mathias MI. 2006. Lipids in oocytes of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Sociobiology* 47: 531-542.
- Chapman RF. 1998. *The insect: structure and function*. Cambridge: University Press. 770 p.
- Ciola R. 1985. *Fundamentos da cromatografia a gás*. Oxford: Pergamon Press. 207 p.

- Cruz-Landim C. 1985. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. *Rev Bras Biol* 45: 221-232.
- Dean RL, Locke M, Collins JV. 1985. Structure of fat body. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3. Oxford: Pergamon Press. p 155-210.
- Denardi SE, Camargo-Mathias MI, Bechara GH. 2006. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): salivary glands cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. *Exp Parasitol* 113: 30-35.
- Endler A, Liebig J, Schmitt T, Parker JE, Jones GR, Schreier P, Hölldobler B. 2004. Surface hydrocarbons of queens eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2945-2950.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Han SH, Bordereau C. 1982. Origin and formation of the royal fat body of higher termite queens. *J Morphol* 173: 17-28.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. *The ants*. Cambridge: Harvard University Press. 732 p.
- Howard RW, Stanley-Samuelson DW. 1996. Fatty acid composition of fat body and Malpighian tubules of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*: significance in eicosanoid-mediated physiology. *Comp Biochem Physiol* 115B: 429-437.
- Ignatti AC. 2001. Histoquímica e citoquímica ultra-estrutural do corpo gorduroso de rainhas de formigas *Atta sexdens* (L., 1758) (Hymenoptera: Formicidae). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.
- Locke M. 1984. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: King RC, Akai H, editors. *Insect ultrastructure*. New York: Plenum Press. p 151-197.
- Lorenz MW, Anand AN. 2004. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Grillus bimaculatus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 56: 110-119.
- MacRae EK, Meltz GD. 1970. Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. *J Cell Biol* 45: 235-245.

Paes de Oliveira VT. 2002. Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

Paes de Oliveira VT, Cruz-Landim C. 2004. Protein content and eletrophoretic profile of fat body and ovary extracts from workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Meliponini). *Ineringia* 94: 417-419.

Roma GC, Camargo-Mathias MI, Bueno OC. 2006. Fat body cells of gynes and queens of four species of fungus growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Relationship with the vitellogenesis. *Am J Agric Biol Sci* 1: 48-57.

Shultz TR, Meier R. 1995. A phylogenetic analyses of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *System Entomol* 20: 337-370.

Staurengo da Cunha MA, Cruz-Landim C. 1983. Modificações histológicas e histoquímicas do corpo gorduroso de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) durante o primeiro ciclo reprodutivo. *Acta Biol Parana* 12: 11-22.

Tanaka A, Ishizaki H. 1974. Immunohistochemical detection of vitellogenin in the ovary and fat body during a reproductive cycle of the cockroach, *Blattella germanica*. *Dev Growth Differ* 16: 247-255.

Thiele E. 2001. Estudo morfo-histológico, morfométrico, histoquímico e ultra-estrutural do corpo gorduroso de fêmeas aladas e rainhas de formigas *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Ponerinae). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

Zara FJ, Cabrera AC, Jaffé K, Caetano FH. 2002. Chemical analysis of different larval instars and tissues of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Hymenoptera: Formicidae, Ponerinae). *Sociobiology* 39: 89-101.

Zara FJ, Caetano FH, Cabrera ACG, Jaffé K. 2003. Ultrastructure of last larval instar fat body cells of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Formicidae: Ponerinae): cytochemical and chemical analysis. *Animal Biol* 53: 1-16.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo por meio da utilização de técnicas de microscopia de luz e eletrônica trouxe informações sobre duas espécies basais e duas derivadas das formigas Attini, fornecendo pela primeira vez dados sobre a morfologia, a morfometria, a histoquímica, a citoquímica de proteínas e de lipídios e a análise química dos lipídios das células do corpo gorduroso das operárias e das “gynes” (fêmeas aladas) das espécies de *Cyphomyrmex rimosus* e de *Mycetarotes parallelus* e das operárias médias e das rainhas das espécies de *Acromyrmex disciger* e de *Atta laevigata*, dados até o momento inexistentes na literatura.

O corpo gorduroso dos indivíduos das espécies e castas analisadas constitui-se de um tecido localizado principalmente ao redor dos órgãos do abdômen, onde é chamado de corpo gorduroso perivisceral, e logo abaixo do tegumento, ou corpo gorduroso parietal. Este mesmo arranjo é freqüentemente descrito para os insetos em geral (CRUZ-LANDIM, 1985a; GILLOTT, 1995; CHAPMAN, 1998; GULLAN; CRANSTON, 2000).

As principais células encontradas no corpo gorduroso das espécies aqui estudadas, assim como relatado também para outros insetos (GILLOTT, 1995; CHAPMAN, 1998; GULLAN; CRANSTON, 2000), foram os trofócitos, no entanto, outro tipo celular, o enócito, também foi encontrado a estes associado.

No presente estudo a análise morfométrica das células do corpo gorduroso mostrou que as áreas dos trofócitos e dos enócitos parietais e periviscerais foram significativamente maiores nas operárias e rainhas das espécies derivadas do que nas

operárias e “gynes” basais. Estes resultados sugeririam que durante a evolução desses insetos poderia ter havido um gradual aumento no volume dessas células, provavelmente devido ao maior acúmulo de substâncias, o qual foi acompanhado por um aumento no tamanho corpóreo ao longo da evolução das formigas Attini. Esta análise, no entanto, não mostrou diferenças significativas entre as áreas dos trofócitos parietais e periviscerais dentro de cada espécie, o mesmo sendo observado no caso dos enócitos, provável indicativo da ausência de compartimentalização funcional entre as células, dados corroborados por outros autores em estudos com outros insetos (IGNATTI, 2001; PAES DE OLIVEIRA; CRUZ-LANDIM, 2003b).

O fato dos trofócitos e dos enócitos parietais e periviscerais das operárias terem sido menores do que os das “gynes” e rainhas, sugere que nestas últimas, estas células estariam produzindo e/ou acumulando mais lipídios e proteínas, que seriam utilizados nos processos reprodutivos inerentes à casta reprodutiva. Em *C. rimosus*, no entanto, os enócitos foram maiores nas operárias do que nas “gynes”, sugerindo que nestas últimas os produtos sintetizados não se acumulariam, sendo tão logo produzidos, secretados e/ou utilizados pela própria célula.

A análise morfológica do corpo gorduroso das espécies em questão mostrou a presença de traqueíolas entre as células deste tecido, corroborando dados encontrados para as “gynes” e rainhas de formigas *Pachycondyla striata* (THIELE; CAMARGO-MATHIAS, 2003). As traqueíolas funcionariam como facilitadores dos processos respiratórios e oxidativos que ocorreriam no corpo gorduroso e, além disso, suas ramificações dariam maior compactação a este tecido, confirmando dados descritos para outros insetos (CHAPMAN, 1998).

Do mesmo modo, a sustentação das células do corpo gorduroso também seria desempenhada pelas expansões membranosas dos trofócitos e dos enócitos, o que causaria a fusão das lâminas basais em determinadas regiões da célula, contudo, a membrana plasmática e o citoplasma de células adjacentes ainda permaneceriam individualizados. Baseado nos resultados obtidos verificou-se ainda que estas expansões seriam na verdade prolongamentos da própria célula, uma vez que, o presente estudo mostrou a presença de citoplasma no interior dos mesmos.

Ultraestruturalmente as células do corpo gorduroso mostraram a lâmina basal dos trofócitos e dos enócitos parietais e periviscerais em duas condições:

individualizada ou fundida, embora, nesta última condição, apenas em determinadas regiões e ocorrendo entre trofócitos, entre enócitos e trofócitos, ou ainda, entre enócitos. Em ambos os casos, além de suporte, ela teria a função de servir de barreira de permeabilidade seletiva, separando o citoplasma da hemolinfa. No caso em que a lâmina basal de duas células contíguas encontrar-se-ia fundida ela também atuaria na passagem de elementos de célula para célula e/ou na união de células, fornecendo maior coesão a este tecido extremamente frouxo.

As análises ultra-estruturais ainda revelaram que os trofócitos e os enócitos de operárias de *A. laevigata* e os trofócitos de rainhas de *A. disciger* apresentaram invaginações na membrana plasmática (SRMP), formando um sistema de canais que penetraria no citoplasma, aumentando assim, a área de superfície, com conseqüente aumento da absorção dos elementos vindos da hemolinfa, porém, as lâminas basais não acompanhariam essas invaginações. Estes dados corroboram os de Ignatti (2001) para os trofócitos de *Atta sexdens*. Esse sistema reticular de membrana plasmática (SRMP) estaria diretamente relacionado com uma das principais funções do corpo gorduroso que seria o centro do metabolismo intermediário dos insetos (GULLAN; CRANSTON, 2000), produzindo e absorvendo lipídios e proteínas principalmente, e os armazenando para posterior utilização por outros tecidos, especialmente no caso das fêmeas reprodutivas, as quais necessitariam de maiores quantidades, principalmente de proteínas, para os processos relacionados à ovogênese.

Além disso, o estudo ultra-estrutural mostrou que os trofócitos de operárias *C. rimosus* possuem todo o aparato para realização de síntese protéica, contrariando a hipótese de que as proteínas encontradas nos trofócitos das operárias de insetos seriam sobras que não foram utilizadas durante a metamorfose (DUTKOWSKI, 1974; DEAN *et al.*, 1985; KEELEY, 1985; GULLAN; CRANSTON, 2000). Embora nos trofócitos das demais operárias analisadas este aparato não tenha sido detectado com muita freqüência, muitos grânulos protéicos foram encontrados, sugerindo que esses elementos poderiam estar sendo produzidos por essas células (síntese endógena) ou então, absorvidos da hemolinfa (fonte exógena). A forma irregular dos núcleos nas operárias analisadas confirmaria que os trofócitos estariam ativos, sugerindo assim, que as proteínas neles sintetizadas estariam principalmente relacionadas com a manutenção

do metabolismo geral do inseto, assim como relatado para outras espécies (DEAN *et al.*, 1985).

O presente estudo mostrou ainda ausência de diferenças na detecção de proteínas nos trofócitos das operárias das espécies basais e derivadas.

Já os trofócitos das castas reprodutivas estudadas apresentaram extensas áreas do citoplasma ocupadas por retículo endoplasmático rugoso vesicular, além de mitocôndrias e complexos de Golgi, confirmando para estas espécies não só a ocorrência de síntese de proteínas estruturais, como também daquelas para exportação. Além disso, os núcleos irregulares dos trofócitos das “gynes” e das rainhas confirmariam que essas células estariam ativas na síntese protéica, assim como citado anteriormente para as operárias dessas mesmas espécies.

Dessa forma, sugere-se que nas “gynes” e nas rainhas analisadas os trofócitos estariam sintetizando proteínas, neste caso especialmente as vitelogeninas, que seriam endocitadas pelos ovócitos durante a vitelogênese, uma vez que, todos os espécimens das castas reprodutivas analisadas apresentaram ovários com ovariolos bem desenvolvidos e contendo ovócitos em diversos estágios de desenvolvimento. Essas afirmações contrariam as de Paes de Oliveira (2002) que relatou que as fêmeas aladas dos insetos, especialmente as de abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides*, se encontrariam em fase pré-vitelogênica, na qual ainda não estariam sendo armazenadas substâncias nos ovócitos.

Com relação às “gynes” de *C. rimosus* e de *M. parallelus* acredita-se ainda que os grânulos protéicos armazenados nos trofócitos seriam utilizados na nutrição desses insetos durante a fundação da colônia, período no qual eles não se alimentariam.

Nos trofócitos das “gynes” e das rainhas analisadas o retículo endoplasmático rugoso foi encontrado com mais frequência na forma vesicular, enquanto que, nas operárias dessas mesmas espécies, na forma lamelar. Segundo Han e Bordereau (1982) a forma vesicular seria mais ativa do que a lamelar, sugerindo então, que a produção de proteínas nas castas reprodutivas seria maior do que nas operárias devido a vitelogênese, porém, alguns autores relataram que não existiriam diferenças funcionais entre as formas vesicular e lamelar, visto que, só o fato de haver presença de ribossomos aderidos à membrana desta organela já indicaria atividade da mesma (THIELE, 2001; NUNES; CAMARGO-MATHIAS, 2006).



Nas castas reprodutivas também foram observadas muitas vesículas distribuídas por todo o citoplasma dos trofócitos, o que não ocorreu nas operárias dessas mesmas espécies. Estes dados sugeririam que durante a vitelogênese os trofócitos das “gynes” e das rainhas intensificariam a mobilização de material, principalmente protéico, o qual, assim que produzido, seria secretado para a hemolinfa a fim de ser incorporado aos ovócitos em desenvolvimento.

As análises histoquímicas das células do corpo gorduroso mostraram presença de grandes quantidades de polissacarídeos neutros nos trofócitos das operárias de *M. parallelus* e de *A. laevigata*, sugerindo que esses elementos seriam utilizados como fonte de energia, especialmente pela musculatura acionada durante as atividades de procura de alimento para a colônia. Entretanto, como em *M. parallelus* as distâncias de forrageamento seriam menores, os trofócitos poderiam ainda estar envolvidos na síntese de lipídios, a partir de precursores não-lipídicos, como os polissacarídeos aí presentes. Estas afirmações encontram apoio nos relatos de Candy e Kilby (1975) e de Keeley (1985) para outros insetos.

Já para as operárias de *C. rimosus* e de *A. disciger* foram encontrados poucos polissacarídeos neutros nos trofócitos, sugerindo que como as distâncias de forrageamento na primeira espécie seriam menores, menos energia estaria sendo necessária para a realização desta tarefa. Porém, nas operárias de *A. disciger*, seria esperado encontrar mais polissacarídeos neutros nos trofócitos, uma vez que, assim como em *A. laevigata*, longas distâncias seriam percorridas durante o forrageamento e, conseqüentemente, mais energia seria gasta. Assim, esses resultados sugeririam que os polissacarídeos assim que produzidos, seriam imediatamente liberados na hemolinfa para utilização por outros tecidos.

Com base nos dados obtidos acredita-se que a elevada produção de polissacarídeos neutros pelos trofócitos das operárias de *M. parallelus* e de *A. laevigata* não seria uma particularidade encontrada apenas em espécies com determinada posição filogenética, uma vez que, esta característica foi observada tanto nas espécies basais quanto nas derivadas.

Em relação às “gynes” e rainhas analisadas os polissacarídeos neutros dos trofócitos apareceram fortemente marcados. Na casta reprodutiva esses elementos também seriam utilizados em larga escala para finalidades energéticas dos processos

metabólicos do próprio inseto e, neste caso, principalmente àqueles relacionados à reprodução (STEELE, 1985). Ainda, com relação às “gynes”, os polissacarídeos poderiam também ser utilizados como fonte de energia para o vôo nupcial.

As análises histológicas revelaram também nos trofócitos de todas as espécies de operárias, “gynes” e rainhas analisadas a presença de muitos vacúolos citoplasmáticos, corroborando dados descritos para os trofócitos de outros insetos (LOCKE, 1984; PAES DE OLIVEIRA; CRUZ-LANDIM, 2003a). Entretanto, as análises ultra-estruturais mostraram que esses supostos vacúolos seriam na realidade gotículas eletrólucidas armazenadas no citoplasma, arredondadas ou em processo de fusão, portanto, irregulares. De acordo com dados da literatura (DEAN *et al.*, 1985), as mesmas teriam origem lipídica, o que foi aqui confirmado através da análise citoquímica.

Nas operárias, os lipídios presentes nos trofócitos, assim como os polissacarídeos, estariam fornecendo a energia necessária para as atividades de forrageamento. Além disso, segundo Zara *et al.* (2003), os trofócitos seriam o centro do metabolismo intermediário dos insetos, fornecendo, sempre que necessário, elementos para outros tecidos. Nas operárias aqui analisadas os lipídios poderiam ser mobilizados para a hemolinfa com esta mesma finalidade. Para as “gynes” e rainhas, sugere-se que isso também estivesse ocorrendo, contudo, nesta casta os lipídios ainda seriam utilizados como fonte de energia para a ovogênese, além de serem incorporados aos ovócitos em vitelogênese.

Por meio das análises ultra-estruturais das células do corpo gorduroso das espécies e castas aqui analisadas verificou-se pouca presença de organelas envolvidas com a síntese lipídica nos trofócitos, tais como retículo endoplasmático liso, sugerindo que esses elementos seriam absorvidos da hemolinfa, exceto no caso dos trofócitos de *A. laevigata* onde muitas mitocôndrias foram encontradas com lipídios no seu interior, sugerindo então, que parte deles seria aí produzida. Esses dados corroboram os de Denardi *et al.* (2006) para os trofócitos de carrapatos *Amblyomma cajennense*.

Com relação aos enócitos, as análises realizadas mostraram a presença de proteínas nas castas operária e reprodutiva. Nas operárias de *C. rimosus* e nas rainhas de *A. laevigata*, parte das proteínas seriam sintetizadas pelo próprio enócito, uma vez que, nessas espécies foi encontrado retículo endoplasmático rugoso lamelar e vesicular,

respectivamente, muito desenvolvidos. Entretanto, nas operárias e nas “gynes” das demais espécies esta organela foi pouco observada, indicando que a maioria das proteínas seria retirada da hemolinfa, hipótese esta embasada na presença de muitas vesículas próximas à membrana plasmática dos enócitos parietais de operárias *A. laevigata*. Contudo, nas rainhas de *A. disciger*, a presença de núcleos irregulares, poderia também sugerir a participação dessas células na síntese protéica.

A presença de proteínas nos enócitos das espécies em questão e, principalmente de organelas relacionadas com sua síntese, contraria dados registrados na literatura que descrevem que essas células estariam envolvidas inclusive com a produção de lipídios (CHAPMAN, 1998; GULLAN; CRANSTON, 2000).

As proteínas sintetizadas e/ou armazenadas nos enócitos de todas as espécies e castas analisadas certamente estariam relacionadas com a formação de compostos lipoprotéicos que seriam depositados na cutícula principalmente para impermeabilização da mesma, assim como descrito para outros insetos (DIELPH, 1975; BLOMQUIST; DILLWITH, 1985; HEPBURN, 1985). Além disso, nas “gynes” e rainhas as proteínas dos enócitos poderiam ainda ser utilizadas na composição do cório que envolve e protege os ovos dos insetos (CAMARGO-MATHIAS; CAETANO, 1996).

As análises histoquímicas realizadas nos enócitos também mostraram poucos polissacarídeos neutros em todas as espécies e castas, sugerindo que os mesmos seriam utilizados nas reações químicas e estruturais da própria célula, assim como relatado para outros insetos (CANDY; KILBY, 1975). Porém, nos enócitos das rainhas de *A. laevigata* a ultra-estrutura revelou abundantes depósitos de glicogênio, os quais ainda atuariam no fornecimento de energia para a síntese protéica que estaria ocorrendo nessas células, como descrito anteriormente.

Os lipídios presentes nos enócitos parietais e periviscerais das operárias, “gynes” e rainhas estudadas poderiam estar participando na formação de hidrocarbonetos que seriam depositados na cutícula desses insetos, os quais atuariam no reconhecimento entre espécies e castas (BEEKMAN, 2004; ENDLER *et al.*, 2004), além de terem papel como precursores de feromônios (BLOMQUIST; DILLWITH, 1985), inclusive utilizados na marcação de trilhas, especialmente nas operárias das espécies derivadas, nas quais elas seriam mais longas.

Outro fato a ser considerado seria a localização dos enócitos quando ao redor dos ovários das “gynes” e rainhas analisadas, sugerindo que, neste caso, essas células poderiam estar participando dos processos finais da ovogênese, fornecendo lipídios para os ovócitos, e auxiliando na formação da membrana lipoprotéica dos ovos dos insetos, assim como relatado por Camargo-Mathias e Caetano (1996) em formigas *P. villosa*.

Assim como descrito para os trofócitos, nos enócitos das operárias, “gynes” e rainhas foram pouco observadas organelas relacionadas com a síntese de lipídios, como retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, sugerindo então, que esses elementos seriam absorvidos da hemolinfa. Porém, nos enócitos de rainhas de *A. disciger* as mitocôndrias mostraram conteúdo lipídico, confirmando que parte desses elementos, nesta espécie, seria aí sintetizada, corroborando dados de Caperucci e Camargo-Mathias (2006) para os ovócitos de formigas *Neoponera villosa*.

A análise ultra-estrutural dos trofócitos e dos enócitos das espécies analisadas mostrou ainda a presença de muitos vacúolos digestivos, os quais estariam relacionados principalmente com a digestão de proteínas, pois parte delas, segundo a literatura seria de origem exógena (KEELEY, 1985; ZARA *et al.*, 2003). Por outro lado, estes vacúolos também poderiam ser autofágicos e responsáveis pela reciclagem das organelas celulares, permitindo às células do corpo gorduroso a manutenção dos seus componentes em quantidades adequadas às necessidades metabólicas.

A análise química realizada através de cromatografia gasosa no corpo gorduroso total (parietal e perivisceral) das operárias, “gynes” e rainhas das espécies aqui estudadas revelou que os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oléico e linoléico seriam os principais compostos lipídicos encontrados neste tecido, corroborando dados de Howard e Stanley-Samuels (1996) e Zara *et al.* (2002) para outras espécies de insetos.

Estes dados poderiam sugerir que os ácidos graxos seriam armazenados nos trofócitos como triglicerídeos, sendo o ácido esteárico o principal ácido graxo de reserva encontrado nas operárias, “gynes” e rainhas, com exceção das operárias de *M. parallelus* onde o ácido graxo predominante seria o palmítico, mostrando que existiriam diferenças no acúmulo destes entre castas da mesma espécie.

Além disso, os ácidos graxos saturados presentes no corpo gorduroso de todas as espécies aqui analisadas ainda poderiam estar sendo utilizados na síntese dos

hidrocarbonetos cuticulares, armazenados, neste caso, principalmente pelos enócitos, para posteriormente serem transportados para a cutícula, corroborando dados de Blomquist e Dillwith (1985) para outras espécies de insetos.

Com base nos dados obtidos observou-se ainda que nas espécies basais de operárias e “gynes” predominariam os ácidos graxos saturados, enquanto que, as operárias e rainhas derivadas teriam tanto os saturados quanto os insaturados. Isto sugeriria a ocorrência de diferenças na síntese de produtos químicos entre as células do corpo gorduroso das espécies basais e derivadas. Segundo Blomquist e Dillwith (1985), os ácidos oléico e linoléico seriam precursores de feromônios e, no caso das operárias derivadas, eles atuariam também na marcação de trilhas, sendo, portanto, indispensáveis nessas espécies que formariam longas trilhas durante o forrageamento, como citado anteriormente.

Entretanto, nas rainhas de *A. disciger* e de *A. laevigata* os feromônios sintetizados a partir dos ácidos graxos insaturados poderiam estar sendo produzidos para que as rainhas controlassem as atividades de reprodução da colônia, como, por exemplo, impedindo o desenvolvimento dos ovários das operárias. Estas afirmações encontram apoio nos relatos de Endler *et al.* (2004) para rainhas de formigas *Camponotus floridanus*.

De acordo com os dados obtidos para os trofócitos e os enócitos das espécies basais e derivadas de operárias, “gynes” e rainhas, verificou-se que as diferenças observadas entre as castas sugerem a especialização funcional do indivíduo, e que os produtos sintetizados pelas células do corpo gorduroso das operárias participariam, principalmente, nas atividades de forrageamento, enquanto que nas “gynes” e rainhas, na síntese e/ou armazenamento de componentes para os processos vitelogênicos inerentes à casta reprodutiva.

Dessa forma, com base nas análises do corpo gorduroso aqui realizadas pode-se afirmar que durante a evolução das formigas Attini as modificações ocorridas nas células deste tecido foram: maior acúmulo de lipídios nos trofócitos e nos enócitos das castas operária e reprodutiva das espécies derivadas em relação a essas mesmas castas nas espécies basais, o qual foi acompanhado pelo aumento no tamanho das células do corpo gorduroso. Além disso, as células do corpo gorduroso das operárias derivadas se especializaram na síntese de lipídios insaturados. Assim sendo, com exceção das poucas

modificações acima citadas, o presente estudo mostrou que as células do corpo gorduroso de todas as espécies de operárias, “gynes” e rainhas, de modo geral, mantiveram os mesmos componentes e características morfológicas originais ao longo do processo evolutivo da tribo Attini.

## 6. CONCLUSÕES

Por meio de aplicações de técnicas morfo-histológicas, morfométricas, histoquímicas, ultra-estruturais, citoquímicas e da análise química dos lipídios nas células do corpo gorduroso de operárias e “gynes” de formigas de *Cyphomyrmex rimosus* e de *Mycetarotes parallelus* e operárias médias e rainhas de *Acromyrmex disciger* e de *Atta laevigata*, o presente estudo demonstrou que:

- O corpo gorduroso é um tecido frouxo, porém, sua sustentação se dá através das ramificações das traqueíolas e das expansões membranosas das suas células, além da fusão das lâminas basais em determinadas regiões, onde existem células contíguas;
- O corpo gorduroso de todas as espécies analisadas, é constituído por trofócitos e enócitos, distribuídos ao redor dos órgãos do abdômen (perivisceral) ou logo abaixo do tegumento (parietal);
- Nas operárias e rainhas das espécies derivadas de *A. disciger* e de *A. laevigata* os trofócitos e os enócitos são maiores do que nas operárias e “gynes” basais de *C. rimosus* e de *M. parallelus*, mostrando que durante a evolução da tribo Attini, houve um gradual aumento no volume dessas células devido ao maior acúmulo de proteínas, lipídios e polissacarídeos;

- Os trofócitos e os enócitos das castas reprodutivas são significativamente maiores que os das operárias, devido à necessidade das “gynes” e rainhas sintetizarem e acumularem mais lipídios e proteínas para os processos de ovogênese e vitelogênese;
- As proteínas encontradas nos trofócitos das operárias basais de *C. rimosus* e de *M. parallelus* e derivadas de *A. disciger* e de *A. laevigata* estariam relacionadas com a manutenção do metabolismo geral do inseto, enquanto que nas “gynes” e rainhas, além disso, também com os processos vitelogênicos;
- Os polissacarídeos dos trofócitos das operárias de *M. parallelus* e de *A. laevigata* seriam utilizados como fonte de energia para o forrageamento, enquanto que, para as operárias de *A. disciger*, que formam longas trilhas, assim que produzidos, seriam imediatamente liberados na hemolinfa para utilização por outros tecidos. Nas “gynes” de *C. rimosus* e de *M. parallelus* e rainhas de *A. disciger* e de *A. laevigata* os polissacarídeos seriam utilizados como fonte energética para os processos de vitelogênese e nas “gynes” também para o vôo nupcial;
- Os lipídios dos trofócitos estariam envolvidos com a energia para o forrageamento nas operárias e na produção dos ovos nas castas reprodutivas;
- Nos enócitos, a presença de organelas relacionadas com a síntese de proteínas contraria os dados da literatura, onde estas células seriam caracterizadas pela presença de extensas áreas de retículo endoplasmático liso e, conseqüentemente, com a síntese de lipídios;
- Os enócitos de todas as espécies analisadas estariam envolvidos com síntese de compostos lipoprotéicos da cutícula. Nas castas reprodutivas eles também poderiam ser a fonte de lipídios e proteínas para a formação da membrana envoltória dos ovos;
- As células do corpo gorduroso das operárias derivadas de *A. disciger* e de *A. laevigata* se especializaram na síntese de lipídios insaturados, essenciais na marcação de trilhas durante o forrageamento;



- Os principais ácidos graxos encontrados no corpo gorduroso das espécies em questão foram: mirístico, palmítico, esteárico, oléico e linoléico, com predomínio dos ácidos graxos saturados nas operárias e “gynes” basais de *C. rimosus* e de *M. parallelus*;
- Não foram observadas diferenças morfológicas e funcionais entre os trofócitos parietais e periviscerais dentro de cada espécie, o mesmo sendo relatado para os enócitos.

## 7. REFERÊNCIAS

AGOSTI, D.; JOHNSON, M. **The Taxon Formicidae**. Disponível em: <[http://atbi.biosci.ohiostate.edu:210/hymenoptera/tsa.sppcount?the\\_taxon=Formicidae](http://atbi.biosci.ohiostate.edu:210/hymenoptera/tsa.sppcount?the_taxon=Formicidae)> Acesso em: 3 abr. 2006.

ANGERMÜLLER, S.; FAHIMI, D. H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochemistry Journal**, London, v. 14, p. 823-825, 1982.

BARBOSA-HETEM, J. M. N.; PAULINO-SIMÕES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. Ultrastructural study of the effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on the late larval fat body of africanized bees (*Apis mellifera* L.), after “*in vitro*” incubation. **Brazilian Journal of Morphology Science**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 191-201, 1998.

BEEKMAN, M. Is her majesty at home? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 19, n. 10, p. 505-507, 2004.

BEHAN, M.; HAGEDORN, H. H. Ultrastructural changes in fat body of adult female *Aedes aegypti* in relationship to vitellogenin synthesis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 186, p. 499-506, 1978.

BLOMQUIST, G. J.; DILLWITH, J. W. Cuticular lipids. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 117-154.

BOLTON, B. **Synopsis and classification of Formicidae**. Gainesville: Memoirs of the American Entomological Institute, 2003. 370p.

BROWN Jr., W. L. Diversity of ants. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Org.). **Ants: Standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 45-79.

CAETANO, F. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; TOMOTAKE, M. E. Ultra-estrutura do corpo gorduroso visceral de formigas *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae): Pontes citoplasmáticas. In: COLÓQUIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, 14., 1993, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 1993. p. 253-254.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CAETANO, F. H. Ultrastructural cytochemistry of oenocytes of *Pachycondyla villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). **Acta Microscopica**, Caracas, v. 5A, p. 6000-6003, 1996.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 21, p. 23-46, 2001.

CANDY, D. J.; KILBY, B. A. **Insect biochemistry and function**. London: Chapman and Hall, 1975. 314p.

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Lipids in oocytes of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). **Sociobiology**, California, v. 47, p. 531-542, 2006.

CHAPMAN, R. F. **The insect: structure and function**. 4. ed. Cambridge: University Press, 1998. 770p.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a gás**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1985. 207p.

COLL, O. R. Morfología y patrón de nido de *Atta vollenweideri* Forel (Formicidae) en Misiones, Argentina. In: INTERNATIONAL PEST SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIMERCOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: Imprima Universitária, 1997. p. 93.

COLLINS, J. V. The hormonal control of fat body development in *Calpododes ethlius* Stoll (Lepidoptera: Hesperiiidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 15, p. 341-352, 1969.

COTTON, G.; ANSTEE, J. H. A biochemical and structural study on the effects of methoprene on fat body development in *Locusta migratoria* L. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 525-539, 1991.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo do corpo gorduroso de *Apis mellifera adansoni* ao microscópio óptico e eletrônico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 3. 1975, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba, ESALQ-USP, 1975. p. 137-144.

CRUZ-LANDIM, C. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae: Meliponinae). **Naturalia**, São Paulo, v. 8, p. 7-23, 1983.

CRUZ-LANDIM, C. Modificações das células do corpo gorduroso de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 471-475, 1985a.

CRUZ-LANDIM, C. Oenocytes of honey bee workers, structural modifications during their adult life. **Revista de Biologia**, Lisboa, v. 78, p. 107-122, 1985b.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, p. 701-704, 1999.

DEAN, R. L. The induction of autophagy in isolated insect fat body of  $\beta$ -ecdysone. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 24, p. 439-447, 1978.

DEAN, R. L.; LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Structure of fat body. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985, v. 3, p. 155-210.

DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): salivary glands cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 113, p. 30-35, 2006.

DIELPH, P. A. Paraffin synthesis in the oenocytes of the desert locust. **Nature**, London, v. 243, p. 468-470, 1973.

DIELPH, P. A. Synthesis and released of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust *Shistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 21, p. 1237-1246, 1975.

DINIZ, J. L. M.; BRANDÃO, C. R. F.; YAMAMOTO, C. I. Biology of *Blepharidatta* ants, the sister group the Attini: a possible origin of fungus-ants symbiosis. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 85, p. 270-274, 1998.

DORTLAND, J. F.; ESCH, T. H. A fine structural survey of the development of the adult fat body of *Leptinotarsa decemlineata*. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 201, p. 423-430, 1979.

DOWNER, R. G. H. Lipid metabolism. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 10, p. 77-113.

DUTKOWSKI, A. B. Fat body of *Galleria mellonella* during metamorphosis. Cytochemical and ultrastructural studies. **Folia Histochemica et Cytochemica**, Warsaw, v. 12, n. 3-4, p. 269-280, 1974.

ENDLER, A.; LIEBIG, J.; SCHMITT, T.; PARKER, J. E.; JONES, G. R.; SCHREIER, P.; HÖLLDOBLER, B. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, New York, v. 101, n. 9, p. 2945-2950, 2004.

ENGELMANN, F. Juvenile hormone – controlled synthesis of female – specific protein in the cockroach *Leucophaea maderae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 145, p. 439-447, 1971.

ENGELMANN, F. Induction of the insect vitellogenin “*in vivo*” and “*in vitro*”. In: GILBERT, L. I. (Org.). **The juvenile hormones**. New York: Plenum Press, 1976. p. 470-485.

EVANS, J. J. T. Development and ultrastructure of the fat body cells and oenocytes of the Queensland fruit fly *Dacus tryoni* (Frogg). **Zeitschrift fuer Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Berlin, v. 81, p. 49-61, 1967.

FARJI-BRENER, A. G. F.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 21, p. 391-399, 1994.

FERNÁNDEZ, F. Breve introducción a la biología social de las hormigas: In: FERNÁNDEZ, F. (Org.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá: Instituto Humboldt Press, 2003. p. 89-95.

FITTKAU, E. J.; KLINGE, H. On biomass and trophic structure of the Central Amazonia rain forest ecosystem. **Biotropica**, Washington, v. 5, p. 2-14, 1973.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOWLER, H. G. Foraging trails of leaf-cutting ants. **Journal of New York Entomology Society**, New York, v. 86, p. 132-136, 1978.

FOWLER, H. G. Latitudinal gradients and diversity of the leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 31, p. 213-216, 1983.

GARLING, L. Origin of ants-fungus mutualism: a new hypothesis. **Biotropica**, Washington, v. 11, p. 284-291, 1979.

GILLOTT, C. **Entomology**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1995. 798p.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. 470p.

HAGEDORN, H. H.; KUNKEL, J. G. Vitellogenin and vitelin insects. In: MITTLER, T. E.; RADOVSKY, F. J.; RESH, V. G. (Org.). **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 24, p. 475-505, 1979.

HAN, S. H.; BORDEREAU, C. Origin and formation of the royal fat body of higher termite queens. **Journal of Morphology**, New York, v. 173, p. 17-28, 1982.

HAUNERLAND, N. H.; NAIR, K. N.; BOWERS, W. S. Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. **Insect Biochemistry**, London, v. 20, p. 829-837, 1990.

HEPBURN, H. R. Structure of the integument. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 1-58.

HINTON, H. E. On the nature and metamorphosis of the colour pattern of *Thaumalea* (Diptera: Thaumaleidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 2, p. 249-260, 1958.

HINTON, H. E. Function of chromatocytes in the Simuliidae, with notes on their behaviour at the pupal-adult stage moult. **Quartely Journal Microscopical Science**, Colchester, v. 100, p. 65-71, 1959.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732p.

HOWARD, R. W.; STANLEY-SAMUELSON, D. W. Fatty acid composition of fat body and Malpighian tubules of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*: significance

in eicosanoid-mediated physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 115B, p. 429-437, 1996.

IGNATTI, A. C. **Histoquímica e citoquímica ultra-estrutural do corpo gorduroso de rainhas de formigas *Atta sexdens* (L., 1758) (Hymenoptera: Formicidae)**. 2001. 247f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2001.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KEELEY, L. L. Physiology and biochemistry of the fat body. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 211-248.

KILBY, B. A. The biochemistry of the insect fat body. In: BEAMENT, J. W. L.; TREHERNE, J. E.; WIGGLESWORTH, V. B. (Org.). **Advances in insect physiology**, New York: Academic Press, 1963. v. 1, p. 111-174.

KING, R. C.; AKAI, H. **Insect ultrastructure**. New York: Plenum Press, 1984. 624p.

KUNKEL, J. G.; NORDIN, J. H. Yolk proteins. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 1, p. 83-111.

LOCKE, M. The cuticle and wax secretion in *Calpodex ethlius* (Lepidoptera: Hesperiiidae). **Quarterly Journal of Microscopical Sciences**, Colchester, v. 101, p. 333, 1960.

LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: KING, R. C.; AKAI, H. (Org.). **Insect Ultrastructure**. New York: Plenum Press, 1984. p. 151-197.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 26, p. 857-884, 1965.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Sequestration of protein by the fat body of an insect. **Nature**, London, v. 210, n. 5035, p. 552-553, 1966.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Protein uptake in multivesicular bodies in the molt/intermolt cycles of an insect. **Science**, Washington, v. 155, p. 467-469, 1967.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 36, p. 453-483, 1968.

LOCKE, M.; SYKES, A. K. The role of the Golgi complex in the isolation and digestion of organelles. **Tissue and Cell**, Essex, v. 7, p. 143-158, 1975.

MACRAE, E. K.; MELTZ, G. D. Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 45, n. 3, p. 235-245, 1970.

MARX, R. Changes in the fat body ultrastructure during the fifth larval instar in workers, queens and drones of the honey bee, *Apis mellifera* L. In: EDER, J.; REMBOLD, N. (Org.). **Chemistry and biology of social insects**. Berlin: Peperny Verlag München, 1987. p. 86-87.

NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae). **Micron**, New York, v. 37, p. 57-66, 2006.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. **Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.** 2002. 164f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2002.

PAES DE OLIVEIRA, V. T.; CRUZ-LANDIM, C. Morphology and function of insect fat body cells: A review. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 195-205, 2003a.

PAES DE OLIVEIRA, V. T., CRUZ-LANDIM, C. Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Sociobiology**, California, v. 41, 701-709, 2003b.

PAGE, R. E. Sperm utilization in social insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 31, p. 297-320, 1986.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1985. 530p.

PRICE, G. M. Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. **Biology Review**, Cambridge, v. 48, p. 333-375, 1973.

PRICE, S. L.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Recent findings in fungus-growing ants: evolution, ecology, and behaviour of a



complex microbial symbiosis. In: KIKUCHI, T.; AZUMA, N.; HIGASHI, S. (Org.). **Genes, behaviours and evolution of social insects**. Sapporo: Hokkaido University Press, 2003. p. 255-280.

QUIRÁN, E. M. Hormigas cortadoras em Argentina. SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 57-75.

RAMOS, L. S. **Bioecologia comparada de duas espécies de *Cyphomyrmex* Mayr (Formicidae: Myrmicinae)**. 2006. 293p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2006.

RÖSELER, P.; RÖSELER, I. Caste specific differences in fat body glycogen metabolism of the bumblebee, *Bombus terrestris*. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 501-508, 1986.

ROSELL, R. C.; WHEELER, D. E. Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Buckley) (Hymenoptera). **International Journal of Insect Morphology and Embriology**, Kidlington, v. 24, n. 4, p. 413-426, 1995.

SAYAH, F.; KARLINSKI, A.; BRECIZET, M. Hormones regulating structural changes in the adipocytes of the female earwig *Labidura riparia*. **Tissue and Cell**, Essex, v. 26, n. 4, p. 587-597, 1994.

SHULTZ, T. R.; BEKKEVOLD, D.; BOOMSMA, J. J. *Acromyrmex insinuator* new species: an incipient social parasite of fungus-growing ants. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 45, p. 457-471, 1998.

SHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analyses of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 20, p. 337-370, 1995.

SIEGEL, S.; CASTELLAN Jr., N. J. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1988. 399p.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. New York: Mc-Graw-Hill, 1935. 407p.

STEELE, J. E. Control of metabolic process. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 8, p. 99-145.

STRADLING, D. J. An introduction to the fungus-growing ants, Attini. In: HUXLEY, C.; CUTLER, D. F. (Org.). **Ant-plant interactions**. Oxford: Oxford University Press, 1991. p. 15-18.

TELFER, W. H. Immunological studies of insect metamorphosis II. The role of a sex limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 37, p. 539-558, 1954.

TELFER, W. H. The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 118, p. 338-351, 1960.

THIELE, E. **Estudo morfo-histológico, morfométrico, histoquímico e ultra-estrutural do corpo gorduroso de fêmeas virgens e rainhas de formigas *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Ponerinae)**. 104f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2001.

THIELE, E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphology, ultramorphology and morphometry of the fat body of virgin females and queens of the ants *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, California, v. 42, n. 1, p. 243-254, 2003.

THOMSEN, E.; THOMSEN, M. Production of specific protein secretion granules by fat body cells of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 193, p. 25-33, 1978.

TOJO, S.; BETCHAKU, T.; ZICCARDI, V. J.; WYATT, G. R. Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 78, p. 823-838, 1978.

TRENCZEK, T.; ZILLIKENS, A.; ENGELS, W. Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titer and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 475-481, 1989.

TSCHENKEL, W. Fire ant longevity and age: estimation by sperm depletion. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 80, p. 263-266, 1987.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 153, p. 587-604, 1966.

WEBER, N. A. Northern extent of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 72, p. 414-415, 1970.

WEBER, N. A. **The gardening ants. The Attines.** Philadelphia: American Philosophical Society, 1972. 146p.

WHITTEN, J. M. Breakdown and formation of connective tissue in the pupal stage of an insect. **Quartely Journal Microscopical Science**, Colchester, v. 103, p. 359-367, 1962.

WIGGLESWORTH, V. B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larva. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 19, p. 56-77, 1942.

WIGGLESWORTH, V. B. Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. **Tissue and Cell**, Essex, v. 2, p. 155-179, 1970.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology.** London: Chapman and Hall, 1972. 827p.

WÜEST, J. Histological and cytological studies on the fat body of the cockroach *Nauphoeta cinerea* during the first reproductive cycles. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 188, p. 481-490, 1978.

WYATT, G. R. The fat body as a protein factory. In: LOCKE, M.; SMITH, D. S. (Org.). **Insect biology in the future.** New York: Academic Press, 1980. p. 201-225.

ZARA, F. J.; CABRERA, A. C.; JAFFÉ, K.; CAETANO, F. H. Chemical analysis of different larval instars and tissues of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Hymenoptera: Formicidae, Ponerinae). **Sociobiology**, California, v. 39, p. 89-101, 2002.

ZARA, F. J.; CAETANO, F. H.; CABRERA, A. C. G.; JAFFÉ, K. Ultrastructure of last larval instar fat body cells of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Formicidae: Ponerinae): cytochemical and chemical analysis. **Animal Biology**, Palermo, v. 53, n. 1, p. 1-16, 2003.