

ARIELE CRISTINA MOREIRA

**O FUTURO DO CONTROLE DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS: METABOLISMO DE
LIPÍDEOS.**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Centro de Estudo de
Insetos Sociais, Rio Claro.

Supervisor(a): Prof. Dr. Odair Correa
Bueno

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -
115842/2022-5

Rio Claro
2023

RESUMO

As formigas, no ambiente em equilíbrio, de um modo geral são extremamente importantes e contribuem com diversas funções, alterando as condições físicas e químicas do solo, promovendo aeração e ciclagem de nutrientes. Além disso, as formigas têm um papel na polinização de plantas e na dispersão de sementes. Poucas espécies conhecidas de formigas são consideradas pragas, menos que 1%, contudo as perdas econômicas causadas por elas são enormes, especialmente considerando aquelas que ocorrem na silvicultura e na agricultura. Dentre as espécies de formigas economicamente importantes no Brasil, as formigas-cortadeiras se destacam, sendo que os efeitos também podem ser indiretos, como os decorrentes da contaminação ambiental causados pela utilização de agrotóxicos para o seu controle. Já é sabido, de muito tempo que as suas características comportamentais e biológicas, como organização social, a associação ao fungo simbiote e a estrutura dos ninhos com diversas câmaras interligadas dificultam e até inviabilizam a utilização de algumas técnicas de controle, tornando-se ainda mais desafiador. Por este motivo, apesar das várias restrições, o controle químico é a única metodologia disponível em escala comercial para o controle de formigas-cortadeiras, diferindo pelo tipo de formulação do produto tóxico e modo de aplicação. Os ingredientes ativos mais utilizados presentes nas iscas tóxicas são o fipronil, o clorpirifós e a sulfluramida. Compostos já sancionados em diversos países, mantidos aqui no Brasil devido a ineficácia de outros componentes para o controle de formigas cortadeiras. Neste cenário, as otimizações de iscas tóxicas, assim como a busca por novos ativos torna-se indispensáveis. Com base no conhecimento de que o mecanismo de produção de ATP poderia ser a via mais eficiente para o controle dessas formigas, o metabolismo de lipídio produz um elevado conteúdo energético, além disso, as formigas apresentam um órgão especializado na cabeça responsável pelo armazenamento e metabolismo de lipídios. Neste trabalho, pretende-se ampliar os conhecimentos sobre a importância do metabolismo de lipídios para a formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa* na obtenção de energia e na manutenção da espécie. Genes das enzimas envolvida na primeira reação do processo de β -oxidação, tanto nas mitocôndrias como nos peroxissomos, assim como algumas peroxidases foram identificados. Os níveis de transcrição foram avaliados e se mostraram inicialmente mais ativos na cabeça após a alimentação suplementada com óleo, confirmando o metabolismo inicial na glândula pós-faríngea e posterior distribuição para o corpo. Os estudos para utilização de dsRNA em operárias foram iniciados, contudo ainda não conseguimos classifica-los como alvos bons ou ruins por desafios encontrados na metodologia que ainda devem ser acompanhados, principalmente relacionados à internalização do dsRNA nas formigas.

INTRODUÇÃO

A ampla diversidade de espécies de formigas presentes em quase todos os habitats da terra indica o sucesso desse inseto no ambiente terrestre. Estima-se que existam mais de 46.000 espécies de formigas no mundo, das quais aproximadamente 16.000 espécies e subespécies já foram formalmente descritas (AntWeb, 2017).

A importância ecológica das formigas é indiscutível, uma vez que contribuem para o equilíbrio do ambiente, alterando as condições físicas e químicas do solo, a aeração e ao acúmulo e ciclagem de nutrientes, além de contribuir para a polinização e para a dispersão de sementes (BROWN Jr., 2000; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Entretanto, as alterações do ambiente resultante da atividade humana na agricultura, na silvicultura e na construção de cidades reduzem a complexidade do meio ambiente e a biodiversidade, o que pode favorecer animais oportunistas (KASPARI e MAJER, 2000). Dentre eles, a densidade populacional de formigas pode aumentar drasticamente e tornar-se pragas nessas regiões (DELLA-LUCIA, 2011; MONTOYA-LERMA et al., 2012).

Poucas espécies conhecidas de formigas são consideradas pragas, menos que 1%, contudo as perdas econômicas causadas por elas são enormes, especialmente considerando aquelas que ocorrem na silvicultura e na agricultura, tanto na produção, como na estocagem de alimentos (MARICONI, 1970). Dentre as espécies de formigas economicamente importantes no Brasil, as formigas-cortadeiras se destacam, sendo que os efeitos também podem ser indiretos, como os decorrentes da contaminação ambiental causados pela utilização de agrotóxicos para o seu controle (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

As formigas-cortadeiras pertencem à tribo Attini, subfamília Myrmicinae, família Formicidae. Os gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) representam as cortadeiras de folhas e que mantem mutualismo com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual é cultivado sobre material vegetal fresco e constitui a base da alimentação da colônia (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

No Brasil, a subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, também conhecida como saúva-limão, apresenta uma ampla distribuição geográfica (FORTI e BOARETTO, 1997). Muitos estudos envolvendo essa espécie são realizados, por ser a formiga que mais contribui para os prejuízos causados em reflorestamentos, pastagens e na agricultura do país (MARICONI, 1970). As perdas ocasionadas por elas e a ausência de uma metodologia eficiente e segura para o seu controle vem motivando novos estudos para ampliar o conhecimento dessa formiga.

Diversas técnicas de combate têm sido utilizadas para controlar as formigas-cortadeiras, como o controle cultural, físico, mecânico, biológico e químico. Entretanto as características

comportamentais e biológicas das cortadeiras, como organização social, a associação ao fungo simbiote e a estrutura dos ninhos com diversas câmaras interligadas dificultam e até inviabilizam a utilização de algumas dessas técnicas (MARINHO et al, 2006; MARTIN e WEBER, 1969; WILSON, 1971). Por este motivo, apesar das várias restrições, o controle químico é a única metodologia disponível em escala comercial para o controle de formigas-cortadeiras, diferindo pelo tipo de formulação do produto tóxico e modo de aplicação (BOARETTO, FORTI, 1997). Dentre as diversas metodologias, as iscas tóxicas têm se tornado uma importante forma de controle de pragas, por apresentarem alta eficiência, custo não elevado, praticidade no manuseio e segurança ao aplicador. Dois outros métodos químicos são utilizados no Brasil, o uso de formicidas pó e de termo nebulização (DELLA LUCIA e VILELA, 1993; FORTI e BOARETTO, 1997).

O ingrediente ativo presente nas iscas tóxicas é dissolvido em óleo de soja e incorporado ao substrato atrativo, normalmente, a polpa cítrica desidratada. Outros materiais derivados do milho, mandioca, trigo e cana também têm sido utilizados (BOARETTO, FORTI, 1997; BUENO, 2005). No Brasil, os ingredientes ativos registrados e comercializados para uso em iscas no controle de formigas-cortadeiras são o fipronil, o clorpirifós e a sulfluramida (BRITO et al., 2016).

O fipronil (do grupo químico dos fenil pirazóis) atua no sistema nervoso/sistema GABA e o clorpirifós (do grupo dos organofosforados) inibe a transmissão dos receptores do sistema nervoso, como a acetilcolinesterase. Já a sulfluramida (do grupo das sulfonas fluoroalifáticas) atua no processo de fosforilação oxidativa, interrompendo a produção de ATP nas mitocôndrias. Entretanto desde 2009, o ácido perfluorooctano sulfônico, base para a síntese final da sulfluramida foi incluído no anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes com restrições de produção e uso somente para o controle de formigas-cortadeiras nas Américas e em áreas certificadas de reflorestamento em todo o continente americano até que um ingrediente ativo substituto seja encontrado (STOCKHOLM CONVENTION, 2009).

Vários estudos indicam que dos ingredientes ativos que atuam como inibidores da respiração, comprometendo principalmente a geração de energia (ATP) são os mais promissores na busca de compostos eficientes no controle das formigas-cortadeiras. Associado a isso, também foi verificado que para diversos compostos, a sua administração na presença de óleo vegetal aumenta sua atividade (BUENO et al., 2013; CECCATO, 2010; DECIO et al., 2013).

Com base no conhecimento de que o mecanismo de produção de ATP poderia ser a via mais eficiente para o controle dessas formigas, que o metabolismo de lipídio produz um elevado

conteúdo energético e que as formigas apresentam um órgão especializado no armazenamento e metabolismo de lipídios, pretende-se ampliar os conhecimentos sobre a importância do metabolismo de lipídios para a formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa* na obtenção de energia e na manutenção da espécie.

O sistema salivar das formigas em geral é constituído por quatro pares de glândulas: 1) as glândulas salivares do tórax, com a porção excretora localizada no mesossomo e desembocam entre as peças bucais, bases dos lábios; 2) as glândulas hipofaríngeas, que se abrem aos lados da placa hipofaríngea; 3) as glândulas mandibulares, que estão em conexão com as mandíbulas; 4) as glândulas pós-faríngeas (PPGs) exclusivas dos imagos das formigas, independente de sexo, casta ou modo de vida, apresentam-se em pares e, se localizam dorsalmente na transição entre o final da faringe e o início do esôfago (GAMA, 1985; CAETANO, 1998). Na formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa* as PPGs apresentam basicamente a mesma constituição anatômica e ultramorfológica tanto para as rainhas como para as operárias, sendo maiores nas primeiras (BUENO, 2005).

A função desempenhada pela PPG é muito discutida, uma vez que vários autores têm realizado estudos e, ainda, não foram conclusivos sobre a verdadeira função desse órgão, como relatado: a) Para Markin (APUD VANDER MEER et al., (1982) as PPGs seriam responsáveis pela alimentação das larvas; b) para Caetano et al. (2002) elas funcionariam como um divertículo do trato digestório; c) para Zylberberg et al. (1974), Peregrine et al. (1973), Delage-Darchen (1976), Vinson et al. (1980), Vander Meer et al. (1982) e Gama (1985) as PPGs teriam função de cecos cefálicos ou gástricos; d) Bagnères e Morgan (1991) verificaram que essas glândulas apresentam hidrocarbonetos com as mesmas características daqueles da cutícula e, Soroker et al. (1998) sugeriram que elas teriam a função de misturar hidrocarbonetos exógenos e endógenos, obtidos durante a trofalaxia, gerando um odor característico da colônia, ou seja, identidade química para a colônia em *Cataglyphis niger*.

Ayre (1963), Caetano et al. (1990) e Hölldobler e Wilson (1990) relataram indícios da existência de um material alimentar completo no interior da glândula, o qual seria regurgitado para os demais membros da colônia, ou seja, poderia ser um tipo de reserva alimentar para operárias e larvas. Porém, histologicamente a PPG não apresenta tecido muscular para eliminar o conteúdo do seu interior (BUENO, 2005). Além disso, a trofalaxia, não foi constatada entre as operárias adultas de *A. sexdens rubropilosa* (BUENO et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; SCHNEIDER, 2003).

A função digestiva da PPG foi refutada por Febvay e Kermarrec (1986) ao verificar que em *Acromyrmex octospinosus* o seu interior apresentava baixa quantidade de glucosidase e

esterase, sugerindo que essas glândulas não teriam função digestiva. Por outro lado, Delage-Darchen (1976), Forbes e Macfarlane (1961) sugeriram que as glândulas pós-faríngeas seriam responsáveis pela digestão de gorduras ingeridas, por apresentarem enzimas digestivas no lúmen, por exemplo, lipases (PEREGRINE et al., 1973; VINSON et al., 1980). Ainda, estudos ultraestruturais realizados com a PPG verificaram que as células secretoras estariam repletas de retículo endoplasmático liso e de gotas lipídicas, o que sugeriria participação da composição do complemento nutricional absorvido pela glândula, fundamental para a sobrevivência do indivíduo (CAETANO, 1998).

Assim, a presença de lipídio no interior das PPGs tem sido observada em várias espécies de formigas, cuja origem é contraditória. Uma delas seria que o lipídio resultaria de secreções do próprio epitélio glandular e, para outros, do alimento ingerido. Delage-Darchen (1976) propôs três hipóteses sobre a presença do lipídio: 1) via transcelular, o material entraria nas células glandulares e seria metabolizado; 2) via extra oral, o material seria regurgitado diretamente das glândulas para os demais membros da colônia; 3) via digestiva, o material seguiria do interior das glândulas em direção ao papo e depois para o ventrículo. Phillips e Vinson (1980) utilizando isótopos radioativos do carbono verificaram, por meio de isótopos radioativos, que moléculas de ácidos graxos e triglicerídeos injetados na hemolinfa não atingem o interior das glândulas pós-faríngeas de *Solenopsis invicta* e, sugeriram que os lipídios seriam oriundos da alimentação. De acordo com Bueno (2005) as operárias de *A. sexdens rubropilosa* são capazes de separar seletivamente compostos lipídicos dos não lipídicos do alimento ingerido na porção final da faringe. Numa dieta alimentar rica em lipídios, esses compostos atingiriam as PPGs e aqueles não lipídicos se deslocariam para o papo (BUENO et al., 2008).

Utilizando-se de técnicas de auto-radiografia com o ácido oleico tritiado, Bueno (2005), verificou que ocorre o deslocamento de lipídios para o lúmen dessas glândulas de operárias e rainhas de *A. sexdens rubropilosa*, com posterior absorção pelo epitélio glandular e transferência para a hemolinfa. Análise de cintilação líquida do material marcado revelou a distribuição do ácido oleico que, depois de absorvido pelas PPGs seria distribuído para a cabeça e para o restante do corpo da formiga, além de manter um estoque na própria glândula.

Vieira e Bueno (2015) analisaram o efeito da suplementação de lipídios no interior das células das glândulas pós-faríngeas, especialmente sobre as mitocôndrias e peroxissomos, de *A. sexdens rubropilosa*, utilizando microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de transmissão. Corroborando Bueno (2005), as análises revelaram que ocorre acúmulo de lipídios no interior do lúmen das glândulas e posteriormente no interior das células glandulares e destas

para a hemolinfa. Esses fatos sugerem que as glândulas pós-faríngeas apresentam papel na nutrição de lipídios.

Decio et al. (2016) analisaram a função dessas glândulas de *A. sexdens rubropilosa* utilizando a expressão proteica. Para tal, fêmeas recém acasaladas receberam uma suplementação de lipídios e após diferentes tempos de exposição suas glândulas foram extraídas e analisadas usando abordagem proteômica. O protocolo utilizado combinou eletroforese bidimensional e “shotgun”, seguido de espectrometria de massa. Também foi analisada a β -oxidação lipídica por marcadores imunofluorescente da enzima acil-CoA desidrogenase. A suplementação lipídica provocou respostas nas células da glândula pós-faríngea: aumento da expressão de proteínas relacionadas com os mecanismos de defesa, sinais de transdução e reorganização do citoesqueleto devido aumento celular. Algumas proteínas foram super expressadas, especialmente aquelas envolvidas nos metabolismos de lipídios e energético. Essas informações sugerem que as glândulas pós-faríngeas são estruturas especializadas para realização da nutrição lipídica nos adultos de *A. sexdens rubropilosa* e caracterizadas como um divertículo do intestino anterior.

Vieira e Bueno 2017 investigaram se as glândulas pós-faríngeas de operárias de *A. sexdens rubropilosa* executam mobilização de lipídios para a hemolinfa e se essa glândula seria capaz de oxidar parte dos lipídios a acetil-CoA. Verificaram que ocorre aumento de ácidos graxos tanto na glândula como na hemolinfa após 48 horas de suplementação lipídica. Diferentemente, após 120 horas da suplementação, o nível de ácidos graxos foi reduzido nas glândulas e aumentou significativamente na hemolinfa. As células glandulares das operárias que receberam suplementação exibiram altas quantidades da acil-CoA desidrogenase, e parte do lipídio foi metabolizado, pela β -oxidação para acetil-CoA. Essas observações corroboram com a hipótese de que as glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa* mobilizam ácidos graxos do interior das células glandulares para a hemolinfa.

Com base nesses estudos, pode-se inferir que o metabolismo de lipídio deve ser uma importante via de obtenção de energia pelas formigas-cortadeiras, uma vez que os lipídios provenientes da dieta são transferidos para a glândula pós-faríngea, cujas células são especializadas em metabolizar, absorver, estocar e mobilizar lipídios para a hemolinfa. Associado a isso foi verificado que, após a suplementação das operárias com ácidos graxos de cadeia média, houve um aumento significativo na abundância de mitocôndrias, peroxissomos e acil-CoA desidrogenase nas células dessa glândula, sugerindo que os lipídios foram oxidados a acetil-CoA. Uma vez confirmada a importância dessa via para a obtenção de energia pelas formigas-cortadeiras, ela pode se tornar um importante alvo para o controle específico desses insetos.

Diversos organismos utilizam a acetil-CoA como via central de produção de energia a partir da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, devido ao maior conteúdo energético liberado se comparado com a oxidação do mesmo peso de carboidratos ou proteínas. Este processo é conhecido por β -oxidação e embora a matriz mitocondrial seja o principal local de oxidação de ácidos graxos a acetil-CoA, outros compartimentos também podem apresentar esta função, por uma via similar, mas não idêntica à da mitocôndria, como é o caso dos peroxissomos. O processo ocorre em quatro etapas nas duas organelas, embora as enzimas catalisem o mesmo tipo de reação, elas diferem significativamente. Nas mitocôndrias, a primeira reação do processo de β -oxidação é catalisada por três isoenzimas de acil-CoA desidrogenase (ACAD), cada uma responsável por uma série de comprimentos de cadeia de acil graxo-CoA, que leva a formação de uma ligação dupla produzindo um trans- Δ^2 -enoil-CoA. Estas enzimas são flavoproteínas com o FAD como grupo prostético, atuando como aceptor de elétrons na reação de desidrogenação, os quais são transportados para o O_2 na cadeia respiratória, produzindo H_2O e ATP. Nos peroxissomos a mesma reação é catalisada pela acil-CoA oxidase (ACOX), a qual também possui três isoenzimas descritas como responsáveis pela especificidade ao substrato, sendo esta via é mais ativa com ácidos graxos de cadeia longa e de cadeia ramificada. Diferentemente da ACAD, esta flavoproteína transfere os elétrons da reação de desidrogenação diretamente para o O_2 produzindo H_2O_2 , que é imediatamente degradado a H_2O e O_2 pela ação da catalase, uma peroxidase (NELSON e COX, 2011). Esta via justifica o fato da suplementação com lipídios promover a superexpressão de enzimas envolvidas na detoxificação celular, como glutathione S-transferase, peroxiredoxina-6 e peroxidase, sendo que as duas últimas apresentam domínio com função peroxidase, atuando como protetivas em um ambiente submetido ao stress oxidativo (DÉCIO et al., 2016).

Atta cephalotes e *Atta colombica* são as únicas espécies do gênero *Atta* que apresentam sequenciamento do genoma depositado em banco de dados e especificamente para a ACAD existem 22 sequências de proteínas anotadas, a maioria são sequências preditas e há isoenzimas com diferentes especificidades ao substrato acil graxo-CoA. Para as ACOX, há quatro sequências depositadas, uma ACOX-1 e uma ACOX-3 para cada espécie. Quanto às oxidases, não há sequências anotadas de catalase para as espécies de *Atta*, contudo há sequências de catalases para outros gêneros, como *Solenopsis* e *Acromyrmex*. O mesmo ocorre para as enzimas com função peroxidase, peroxiredoxina-6 e peroxidase, identificadas por proteômica na PPG de *A. sexdens rubropilosa*.

A identificação dessas sequências, a análise da expressão gênica e do silenciamento gênico envolvendo tais enzimas em *A. sexdens rubropilosa* podem revelar a importância do metabolismo de lipídio e da sobrevivência desses insetos quando essa via foi inibida. Este estudo, além de contribuir para ampliar o conhecimento da fisiologia dessa formiga, também pode vir a mostrar novos alvos específicos para seu controle.

OBJETIVOS

O objetivo deste projeto será avaliar a importância do metabolismo de lipídios na formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* na obtenção de energia e para a manutenção da espécie através a avaliação da expressão gênica e do silenciamento gênico das enzimas envolvida na primeira reação do processo de β -oxidação, tanto nas mitocôndrias (ACADs - três isoenzimas para cadeias médias, longas e curtas de acil graxo-CoA) como nos peroxissomos (ACOXs - ACOX-1 e ACOX-3). As peroxidases (catalase, peroxiredoxina-6 e peroxidase) também serão avaliadas devido a importância dessas enzimas no ambiente oxidativo dos peroxissomos durante a degradação de lipídios e sua ação protetiva nos formigueiros.

METODOLOGIA

1. Bioensaios

Neste trabalho serão utilizadas operárias generalistas de *A. sexdens rubropilosa* (tamanho da cabeça ~1,4 mm), responsáveis por realizar o corte de material vegetal dentro do ninho e incorporá-lo no jardim de fungos. Os exemplares de formigas cortadeiras foram coletados randomicamente em ninhos artificiais mantido nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências/UNESP Campus Rio Claro.

2. Obtenção das sequências de DNA que codificam para as ACADs, ACOXs e peroxidases

2.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi extraído de cabeças de operárias utilizando o método de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) seguindo as especificações do fabricante. A integridade do RNA foi

analisada por gel desnaturante de agarose 1,2% (m/v) contendo 1,8 M de formaldeído em tampão MOPS para eletroforese. O RNA total foi tratado com DNase (DNaseI, RNase-free -Thermo Fisher Scientific) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante.

A fita de cDNA foi sintetizada utilizando 1,35 µg de RNA total tratado com DNase e o SuperScript® VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

2.2 Amplificação dos transcritos de *A. sexdens rubropilosa*

Inicialmente foi proposto identificar os genes que codificam para as enzimas descritas na tabela 1. Para isso, foi realizada alinhamento das sequências de DNA disponíveis na literatura para outras espécies de formigas, como *Atta cephalotes* e *Atta colombica*, que são as únicas espécies do gênero *Atta* que apresentam sequenciamento do genoma. Com base nos alinhamentos e nas regiões conservadas *primers* específicos e/ou degenerados foram desenhados com base em sequências de enzimas (dados não mostrados).

Em cada Reação em cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizado um par de *primer* e como molde o cDNA. A reação foi submetida a ciclos de temperatura em um termociclador e os fragmentos de DNA amplificados foram verificados em gel de agarose. Os fragmentos de DNA amplificados com o tamanho esperado foram extraídos do gel, purificados e encaminhados para sequenciamento.

Tabela 1: Enzimas envolvidas na β -oxidação de ácido graxos.

Mitocôndrias	Peroxisomos e peroxidases
Acil-CoA desidrogenases (ACADs) - Cadeia longa (VLC-ACAD) - Cadeia média (MC-ACAD) - Cadeia curta (ShortC-ACAD) - Cadeia curta ramificada (ShortBC-ACAD) - Family member 9	Acil-CoA oxidases (ACOX) - ACOX1 - ACOX3 Peroxidases - Catalase 1 - Peroxiredoxina-6 - Peroxidase (Peroxidase-like)

3. Análise da expressão dos genes da β -oxidação em diferentes estruturas de operárias

A expressão gênica foi avaliada utilizando a técnica PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) (HIGUCHI et al., 1993). Com base nas sequências obtidas, novos *primers* (dados não mostrados) foram desenhados através do software Primer Express® Software Version 3.0 e selecionando o *amplicon* com tamanho entre 50 e 150 bp.

Para análise da expressão gênica em diferentes estruturas de operárias foi extraído RNA total das diferentes estruturas (cabeça, mesossomo e gáster) em diferentes situações de alimentação: Mantida com dieta pura líquida (controle) e após 4 e 24 h da suplementação de lipídica. O experimento foi realizado em triplicata biológica para cada uma das condições. A RT-qPCR foi realizada em triplicata acrescida de um controle negativo para cada gene e cada conversão de cDNA em um sistema Applied Biosystem StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) utilizando o *PowerUP™ SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). Os parâmetros para análise dos dados da RT-qPCR, como melhor concentração de *primer* e *cycle threshold* (Ct) foram determinados.

4. Silenciamento gênico

4.1 Obtenção do dsRNA

Para avaliar a função dos genes em estudo foram iniciados os experimentos de silenciamento gênico por RNA de interferência. A síntese do dsRNA foi realizada utilizando o Kit Megascript RNAi (Thermo Scientific) e como molde as sequências já obtidas das enzimas de interesse. Novos primers (dados não mostrados) foram desenhados para regiões específicas do gene que permite a amplificação de aproximadamente 500 bp e os passos foram realizados seguindo as especificações do fabricante. Como dsRNA controle para o experimento será o GFP (Green Fluorescence Protein).

A estabilidade do dsRNA na dieta líquida mantida à temperatura ambiente foi avaliada durante 7 dias. A integridade do dsRNA foi avaliada em gel desnaturante de agarose 1,2% (m/v).

4.2 Bioensaios de incorporação em dieta artificial de operárias de *A. sexdens*.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata: 3 placas de petri contendo 10 operárias médias de *A. sexdens* para cada tratamento, totalizando 30 formigas. Os tratamentos utilizados foram variados utilizando Dieta Pura (DP); Dieta Pura + Óleo de soja 0,5% (DP+O) e os tratamentos com dsRNA, dsRNA + Dieta Pura (DP) (dsRNA+DP) e dsRNA + Dieta Pura + Óleo de soja 0,5% (dsRNA+DP+O)

Para cada repetição foram oferecidas de DP ou DP+O com as respectivas concentrações de dsRNA ou tampão (tabela 2). O volume de dieta administrado foi de 500 μ L e foi realizada a substituída diária. O número de operárias mortas foi contabilizado para análises posteriores.

Os resultados obtidos para cada bioensaio são apresentados através das análises gráficas das curvas de sobrevivência e das tabelas que resumem as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediana (Md) e a interpretação do teste “*log rank*”.

Tabela 2: Condição dos experimentos preliminares de silenciamento gênico.

Amostra	Dieta	Concentração (ng/ formiga)	Tempo (Dias)
Bioensaio de toxicidade do tampão			
dsGFP	DP	300	12
Tampão de eluição	DP	Mesmo volume	12
Tampão TE	DP	Mesmo volume	12
Bioensaio de silenciamento gênico			
GFP (controle)	DP	1000 / 500	12 (8 dias dsRNA+DP e os outras 4 DP)
VLC	DP	1000 / 500	
MC	DP	1000 / 500	
Cat	DP	1000 / 500	
GFP	DP/ DP+O	100	16
VLC	DP/ DP+O	100	
MC	DP/ DP+O	100	

Legenda: Tampão de eluição do kit de purificação do dsRNA; TE = Tris-HCl 10 mM pH8 + EDTA 1 mM; Dieta Pura (DP); Dieta Pura + Óleo de soja 0,5% (DP+O) e os tratamentos com dsRNA, dsRNA + Dieta Pura (DP) (dsRNA+DP) e dsRNA + Dieta Pura + Óleo de soja 0,5% (dsRNA+DP+O). Acil-CoA desidrogenases de Cadeia longa (VLC), cadeia média (MC) e Cat, catalase.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Obtenção das sequências de DNA que codificam para as ACADs, ACOXs e peroxidases.

As enzimas da tabela 1 foram selecionadas levando em consideração que nas mitocôndrias, a primeira reação do processo de β -oxidação é catalisada por três isoenzimas de acil-CoA desidrogenase (ACAD), cada uma responsável por uma série de comprimentos de cadeia de acil graxo-CoA, que leva a formação de uma ligação dupla produzindo um trans- Δ^2 -enol-CoA. Estas enzimas são flavoproteínas com o FAD como grupo prostético, atuando comoceptor de elétrons na reação de desidrogenação, os quais são transportados para o O₂ na cadeia

respiratória, produzindo H_2O e ATP. Nos peroxissomos a mesma reação é catalisada pela acil-CoA oxidase (ACOX), a qual também possui três isoenzimas descritas como responsáveis pela especificidade ao substrato, sendo esta via é mais ativa com ácidos graxos de cadeia longa e de cadeia ramificada. Diferentemente da ACAD, esta flavoproteína transfere os elétrons da reação de desidrogenação diretamente para o O_2 produzindo H_2O_2 , que é imediatamente degradado a H_2O e O_2 pela ação da catalase, uma peroxidase (NELSON e COX, 2011). Esta via justifica o fato de a suplementação com lipídios promover a superexpressão de enzimas envolvidas na detoxificação celular, como glutathione S-transferase, peroxiredoxina-6 e peroxidasina, sendo que as duas últimas apresentam domínio com função peroxidase, atuando como protetivas em um ambiente submetido ao stress oxidativo (DÉCIO et al., 2016).

Das dez enzimas propostas, apenas duas, ACOX1 e ACOX3 não foram identificadas sob condições bióticas para operárias de *A. sexdens rubropilosa*. A não amplificação destes genes por PCR pode estar relacionado tanto com aos baixos níveis de expressão das enzimas nestas condições, como com a não especificidade dos *primers* desenhados para identificação destes genes.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados e submetidos ao sequenciamento. Foi verificado que as sequências obtidas apresentam mais de 80-90 % de identidade com outras enzimas da mesma classe de outras formigas e/ou insetos.

De posse das sequências que codifica para as proteínas de interesse, novos *primers* foram desenhados para avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) em diferentes estruturas de operárias (cabeça, mesossomo e gáster) em duas situações: sem suplementação de lipídica (controle) e após 4 e 24 h da suplementação de lipídica. Para cada gene analisado, a amostra CONTROLE CABEÇA para cada tempo de análise foi utilizada como amostra calibradora, por isso o valor dela está sempre com a expressão relativa em 1,0 e as demais amostras variam em relação a esta em cada tempo, tanto para as partes do controle como as partes da formiga após 4 e 24 h da suplementação com óleo.

Para as ACADs:

- VLC-ACAD, o tórax é a parte do corpo com maior expressão. Quando suplementada com lipídio após 4 h há um aumento no nível de expressão na cabeça e no tórax. Após 24 horas de suplementação os níveis de expressão retornam nos valores normais.

- MC-ACAD: Tórax e o gaster é a parte do corpo com maior expressão da MC-ACAD. Quando suplementada com lipídio após 4 h há um aumento no nível de expressão na cabeça (dobra). No tórax há um pequeno aumento. Após 24 horas de suplementação os níveis de expressão retornam nos valores normais.

- ShortC-ACAD: Permanece praticamente inalterado o nível de expressão, com e sem suplementação lipídica.

- ShortBC-ACAD: Redução no nível da expressão após 24 h de suplementação no tórax e no gaster.

- Family Member 9: apresenta maior expressão no tórax e tem seus níveis de expressão aumentados na cabeça após 4 horas de suplementação lipídica.

Com estes dados podemos concluir que após a ingestão de lipídeos na dieta das operárias de *A. sexdens rubropilosa* o metabolismo de β -oxidação inicia rapidamente na cabeça e no tórax.

Com relação às oxidases:

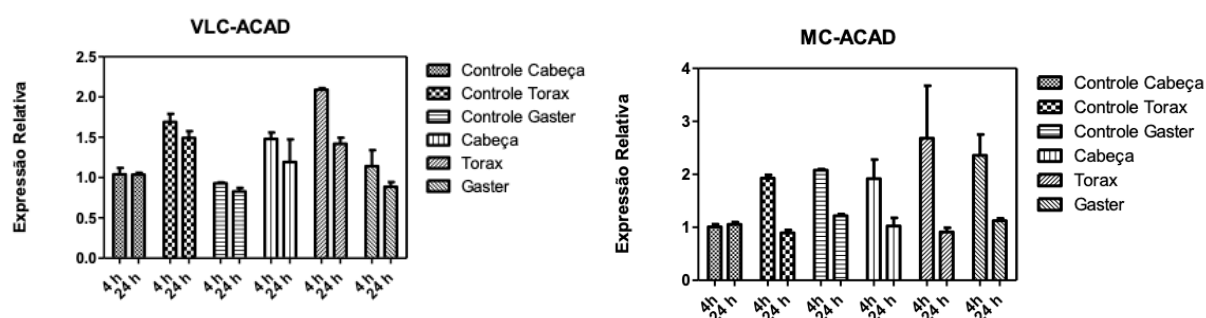
- Catalase 1: Verificamos um aumento da expressão gênica de catalase no gaster após 4 h de suplementação lipídica e retorna ao nível normal (mesmo do controle) após 24 h de suplementação. Na cabeça e no tórax não há variação da expressão da catalase após a suplementação lipídica.

- Peroxiredoxina-6: Há um aumento no nível de expressão da Peroxiredoxina-6 na cabeça após 4 h de suplementação lipídica e no gaster. O tórax permanece invariável. Após 24 h de suplementação cabeça e gaster apresentam níveis normais de expressão, enquanto no tórax há uma redução.

- Peroxidasina (Peroxidasin-like): apresenta maior expressão na cabeça e praticamente não é alterada após a suplementação lipídica.

Estes resultados nos mostram que as enzimas em potencial para serem avaliadas quanto a ao seu silenciamento gênico são duas acil-CoA desidrogenase VLC-ACAD e MC-ACAD e duas oxidases Catalase e Peroxiredoxina-6.

Ao identificar as enzimas mais expressas desta via metabólica de obtenção de energia, duas abordagens serão adotadas: o silenciamento gênico envolvendo tais enzimas, que permitirá identificar a importância do metabolismo de lipídio e da sobrevivência desses insetos quando essa via foi inibida. Este estudo, além de contribuir para ampliar o conhecimento da fisiologia dessa formiga, também pode vir a mostrar novos alvos específicos para seu controle.



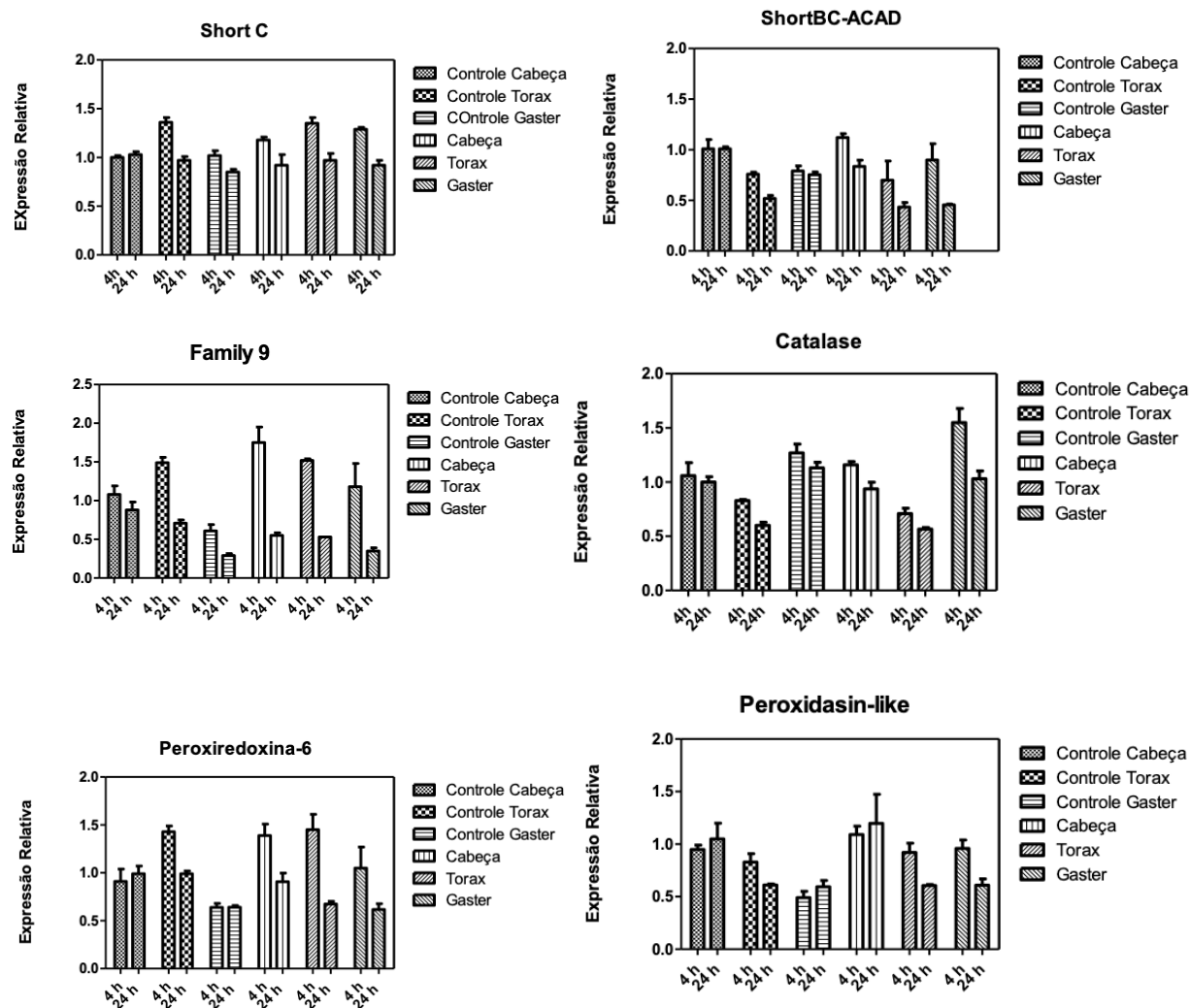


Figura 1: Análise da expressão Gênica para enzimas envolvidas no processo de β -oxidação de ácidos graxos e oxidases. Os dados foram analisados com base na amostra cabeça controle de operárias de *A. sexdens*.

Silenciamento gênico.

Cooper *et al.* (2019) cita 5 impedimentos para a eficiência do silenciamento gênico usando RNAi: 1) dsRNA instabilidade, 2) problemas com a internalização do dsRNA, 3) problemas como maquinário do RNAi, 4) Problemas com a dispersão do RNAi no corpo do inseto e 5) definição do gene algo específico para o silenciamento. Por este motivo, avaliamos a estabilidade do dsRNA nas condições experimentais, dieta líquida mantido à temperatura ambiente.

A estabilidade foi avaliada ao longo de 7 dias em duas amostras distintas, sem uma delas com mais de 6 meses após o preparo. Ambas mantiveram a integridade da amostra ao longo do experimento.

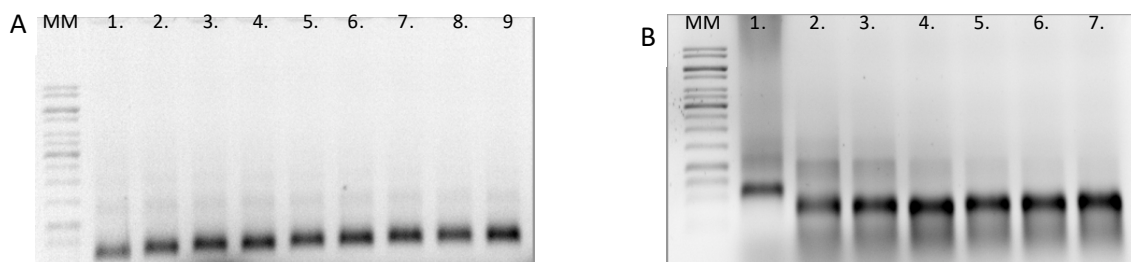


Figura 2: Análise da estabilidade de dsRNA em dieta pura mantido à temperatura ambiente. A) Amostra recém preparada analisada após 1) 0h, 2) 12h, 3) 1 dia, 4) 2 dias, 5) 3 dias, 6) 4 dias, 7) 5 dias, 8) 6 dias, 9) 7 dias. B) Amostra estocada a mais de 6 meses à -20 °C, descongelada e analisada após 1) 0h, 2) 4h, 3) 8h, 4) 1 dias, 5) 2 dias, 6) 5 dias, 7) 7 dias.

Os bioensaios de incorporação com diferentes tampões foram realizados para verificar a toxicidade nas operárias. Na figura 3 pode ser verificado que não houve mortalidade em nenhuma das amostras, controle GFP em tampão de eluição, tampão de eluição e nem com o TE após 12 dias de tratamento do DP suplementado com as amostras.

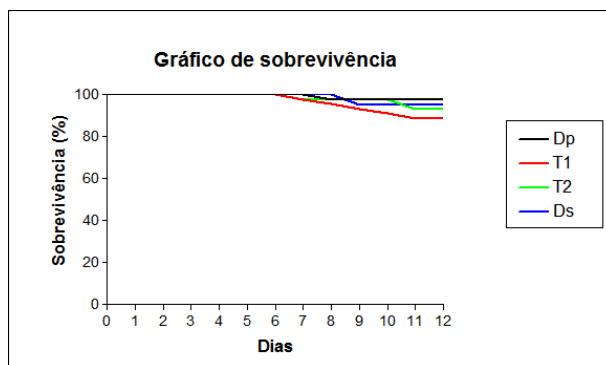


Figura 3: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial líquida de diferentes tampões. DP: Dieta Pura, T1: Tampão de eluição, T2: TE e Ds: dsGFP em tampão de eluição.

Os ensaios preliminares de silenciamento gênico foram feitos através as administrações diárias de RNAi diretamente na dieta pura ou suplementada com óleo. Esta estratégia foi adotada visando a aplicação de dsRNA no campo, que seria algo similar ao que poderíamos adotar. Por isso, foram testadas diferentes concentrações de dsRNA e avaliada a mortalidade das formigas (figura 4). Em nenhuma das condições testadas foi verificada mortalidade significativa em relação ao controle para todas as condições testadas.

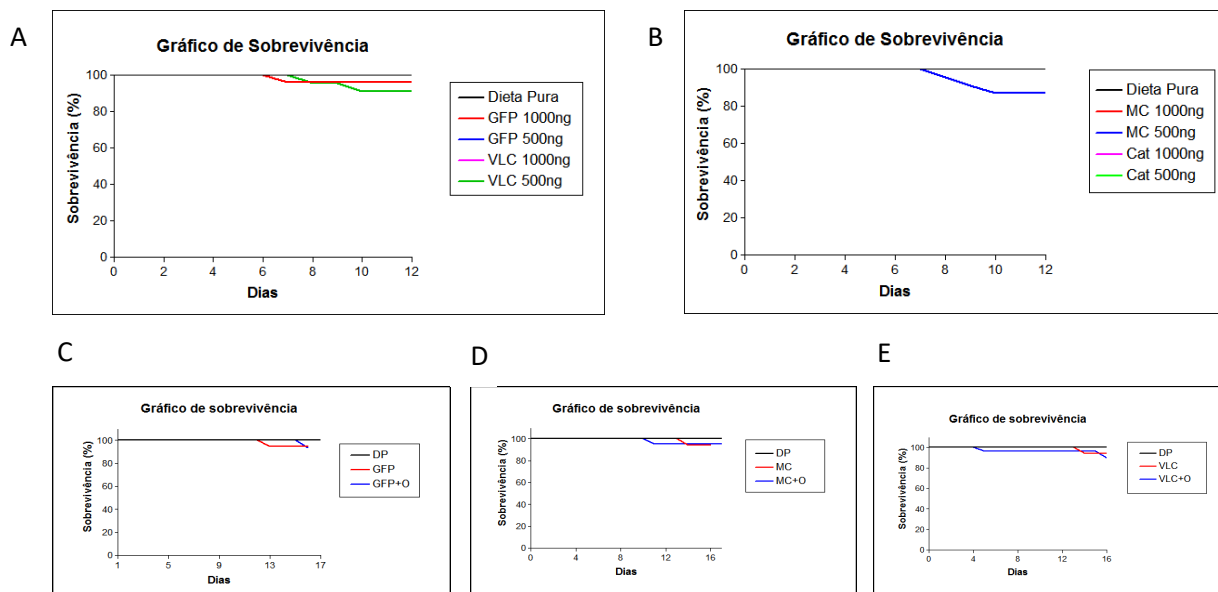


Figura 4: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio de silenciamento gênico. A - B) O oferecimento dos tampões misturados em dieta pura foi realizado por 8 dias, nos dias restantes, foi oferecida dieta pura. C-E) Oferecimento de dieta pura (controle) com as enzimas e enzimas suplementadas com óleo de soja oferecidas em dieta líquida durante 16 dias.

Neste ponto deparamos com alguns problemas experimentais que estão sendo avaliados. Como já citado a internalização do dsRNA pode ser um dos desafios para esta técnica. Alguns pontos podem ser citados para futura análise, além de testar variações na concentração do dsRNA:

- 1) Diariamente há sobra de dieta líquida na placa, que é retirada e trocada;
- 2) Não conseguimos certificar a quantidade exata de amostra ingerida por cada formiga;
- 3) Não conseguimos saber quanto a internalização dos dsRNA nas formigas.

Com base nisso, ainda não conseguimos concluir se os genes avaliados são um bom alvo devido à estas questões que devem ser melhor avaliadas. Estes ensaios preliminares foram importantes para avaliar as estratégias que iremos utilizar nos próximos experimentos. Para avaliar o alvo, iremos adotar a estratégia de suplementar diretamente na boca das formigas com dieta líquida + óleo + dsRNA. Neste caso já sabemos que as formigas incorporam em torno de 20% da substância oleosa, o que nos permitirá inferir quanto a internalização. Além da mortalidade também será avaliado a alteração da expressão gênica por RT-qPCR.

CONCLUSÃO

Genes das enzimas envolvida na primeira reação do processo de β -oxidação, tanto nas mitocôndrias (ACADs - três isoenzimas para cadeias médias, longas e curtas de acil graxo-CoA) como nos peroxissomos (ACOXs - ACOX-1 e ACOX-3). As peroxidases (catalase, peroxiredoxina-6 e peroxidase) foram identificados. Os níveis de transcrição delas foram

avaliados e se mostraram inicialmente mais ativos na cabeça após a alimentação contendo óleo, confirmando o metabolismo inicial na PG e posterior distribuição para o corpo. Os estudos para utilização de dsRNA em operárias foram iniciados. Os genes alvo ainda não foram validados como bons ou ruins por desafios encontrados na metodologia que ainda devem ser acompanhados, principalmente relacionados à internalização do dsRNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.P.; FORTI, L.C.; MOREIRA, A.A.; BOARETTO, M.A.C.; RAMOS, V.M.; MATOS, C.A.O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Sociobiology* 40, 293–306, 2002.
- AntWeb, Versão 7.3.1. 2017. <http://www.antweb.org> (accessed 18.10.2017).
- AYRE, G.L. Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 6, 165- 170, 1963.
- BAGNÈRES, A.G.; MORGAN, E.D. The postpharyngeal gland and the cuticle of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons. *Experientia* 47, 106–111, 1991.
- BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, 11(30), p. 31-46, Botucatu, 1997.
- BOREL, B. When the pesticides run out. *Nature*, 543 (304), 2017.
- BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A.E. et al. Use of Alternatives to PFOS, Its Salts and PFOSF for the Control of Leaf-Cutting Ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International Journal of Reserch in Environmental Studies* 3, 11–92, 2016.
- BROWN JR., W.L. Diversity of ants. In: AGOSTI, D. et al. (Eds.). *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Instituion, Washington, 45-79, 2000.
- BUENO, F.C.; FORTI, L.C.; BUENO, O.C. Toxicity of hydramethylnon to leaf-cutting na *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, Feira de Santana, in press, 2013.
- BUENO, O.C. Filtro infrabucal e glândulas pós-faríngeas da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). 107f. Tese (Livre Docente). Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2005.
- BUENO, O.C.; BUENO, F.C.; DINIZ, E.A.; SCHNEIDER, M.O. Utilização de alimento pelas formigas-cortadeiras. In: VILELA, F.C. et al. (eds). *Insetos Sociais: Da Biologia à Aplicação*. Viçosa: Editora UFV, 96-114, 2008.
- BUENO, O.C.; FRESNEAU, D.; SCHNEIDER, M.O.; SILVEIRA, C.; BUENO, F.C. Fluxo de corantes hidrossolúveis e lipossolúveis no trato digestivo de operárias de *Atta sexdens* L. 1758 (Hymenoptera: Formicidae). In: 15 Encontro de Mirmecologia. IAPAR, Londrina, PR, pp. 69, 2001

- CAETANO, F.H. Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae). 137 f. Tese (Livro – Docência) Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 1998.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. Formigas: Biologia e Anatomia. Topázio, Rio Claro, 2002.
- CAETANO, F.H.; CAMPOS, F.D.C.L.; FALCO, J.R.P.; LIMA, V.L. Presence of nematodes in the post-pharyngeal gland of ants *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: Formicidae). pH-11 Anais VIII. Jornada Paulista de Parasitologia-Campinas, 1990.
- CECCATO, M. Inibidores da respiração celular no controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae). 2010. 49f. Monografia (Especialização em Entomologia Urbana) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2010.
- DECIO P.; VIEIRA, A.S.; DIAS, N.B.; PALMA, M.S.; BUENO, O.C. The postpharyngeal gland: specialized organ for lipid nutrition in leaf-cutting ants. PLOS ONE 11(5): e0154891, 2016.
- DECIO, P.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO, F.C; BUENO O.C. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. Micron, 45, 22-31, 2013.
- DELAGE-DARCHEN, B. Les glandes post-pharyngeal des fourmis. Connaissances actuelles sur leur structure, leur fonctionnement, leur rôle. Ann Biol. 15, 63–76, 1976.
- DELLA-LUCIA, T. M. C. Formigas-cortadeiras: da Biologia ao Manejo, Editora UFV, Viçosa, 2011.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; FOWLER, H.G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). As formigas cortadeiras. Viçosa: Folha de Viçosa, Cap.1, 1-3, 1993.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; SOUZA, D.J. Importância e história de vida das formigas- cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa: UFV, 2011. p. 13-26.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). As formigas cortadeiras. Viçosa: Folha de Viçosa, Cap.12, 163-179, 1993.
- FEBVAY, G.; KERMARREC, A. Digestive Physiology of leaf-cutting ants. In: LOFGREN, C.S., VANDER MEER, R.K. (Eds.) Fire ants and leaf-cutting ants: Biology and management. Westview Press, Boulder, 274–285, 1986.
- FORBES, J.; MCFARLANE, A.M. The comparative anatomy of digestive glands in the female castes and the male of *Camponotus pennsylvanicus* Degeer (Formicidae, Hymenoptera). J. N.Y. Entomol. Soc. 69, 92–103, 1961.
- FORTI, L.C.; BOARETTO, M.A.C. Formigas Cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle. UNEPS, Botucatu, São Paulo, 1997.
- GAMA, V. O sistema salivar de *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera:Formicidae). Revista Brasileira de Biologia, 45 (3), 317-359, 1985.
- HERZNER, G.; GOETTLER, W.; KROISS, J.; WEEB, A.G.; JAKOB, P.M.; RÖSSLER, W.; STROHM, E. Males of a solitary was possess a post pharyngeal gland. Arth. Struct. & Dev. 36, 123-133, 2007.

- HERZNER, G.; RUTHER, J.; GOLLER, S.; SCHULTZ, S.; GOETTLER, W.; STROHM, E. Structure, chemical composition and putative function of the postpharyngeal gland of the emerald cockroach wasp, *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). *Zoology* 114, 36-45, 2011.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinectic PCR analysis: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030, 1993.
- HÖLLDOBLER, E.; WILSON, E. O. The ants, Harvard University Press, Cambridge, 1990.
- KASPARI, M.; MAJER, J. D. Using ants to monitor environmental change. In: AGOSTI, D., MAJER, J.D., ALONSO, L.E., SCHULTZ, R., *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 89 – 98, 2000.
- MARICONI, F.A. As Saúvas, Agronomica Ceres, Viçosa, 1970.
- MARINHO, C.G.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; PICANÇO, M.C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras – Bahia Agrícola, 7(2), 2006.
- MARTIN, M.M.; WEBER, N.A. The cellulose utilizing capability of the fungus cultured by Attini. *Annals of the Entomological Society of America*, 62(6), 1386-1387, 1969.
- MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A.G.; CALLE, Z. Leafcutting ants revisited: towards rational management and control. *Int. J. Pest. Manag.*, 53, 225– 247, 2012.
- MOREIRA, A.C; Santos, a.m.; Carneiro, R.L.; Bueno, O.C; Souza, D.H.F. Validation of reference genes in leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* in different developmental stages and tissues. *IJEAB*, 2 (2), 743-755, 2017.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- PEREGRINE, D.J.; MUDD, A.; CHERRET, J.M. Anatomy and preliminary chemical analysis of post-pharyngeal glands of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera, Formicidae). *Insects Soc.* 20, 355–363, 1973.
- PHILLIPS, S.A. Jr.; VINSON, S.B. Comparative morphology of glands associated with the head among castes of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. *Ga. Entomol. Soc.* 15, 215-226, 1980.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHNEIDER, M.O. Comportamento de cuidado da prole de saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). 86f. Dissertação. Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2003.
- SOROKER, V.; FRESNEAU, D.; HEFETZ, A. Formation of colony odor in ponerine ant *Pachychondyla apicalis*. *J. Chem. Ecol.* 24, 1077–1090, 1998.
- STOCKHOLM CONVENTION. The new POPs under the Stockholm Convention. [2009]. Disponível em: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>>. Acessado em 20/01/2017.

- VANDER MEER, R.K.; GLANCEY, B.M.; LOFGREN, C.S. Biochemical changes in the crop, oesophagus and post-pharyngeal gland of colony founding red imported fire ant queens (*Solenopsis invicta*). *Insect Biochem.* 12(1), 123- 127, 1982.
- VIEIRA, A.S.; BUENO, O.C. Mitochondrial and peroxisomal population in postpharyngeal glands of leaf-cutting ants after lipid supplementation. *Micron* 68, 8–16, 2015.
- VINSON, S.B.; PHILLIPS, S.A.; WILLIAMS, H. J. The function of the post-pharyngeal glands of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. *J Insect Physiol.* 20, 645–650, 1980.
- WILSON, E. O. The insect societies. Harvard University Press, Cambridge, 548p, 1971.
- ZYLBERBERG, L.; JEANTET A.Y.; DELAGE-DARCHEN, B. Particularités structurales del' intima cuticulaire des glandes post-pharyngiennes des fourmis. *J Microsc.* 21, 331–342, 1974.