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

**GLÂNDULAS MANDIBULARES DE OPERÁRIAS DE
FORMIGAS *Atta sexdens rubropilosa* (FOREL, 1908):
MORFOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE).**

LORENA FAVARO PAVON PORFIRIO

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

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho - 2006

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

**GLÂNDULAS MANDIBULARES DE OPERÁRIAS DE
FORMIGAS *Atta sexdens rubropilosa* (FOREL, 1908):
MORFOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE).**

LORENA FAVARO PAVON PORFIRIO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

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

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho – 2006

595.796 Porfirio, Lorena Favaro Pavon

P835g Glândulas mandibulares de operárias de formigas *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) : morfologia e expressão gênica (Hymenoptera : Formicidae) / Lorena Favaro Pavon Porfirio. – Rio Claro : [s.n.], 2006
129 f. : il., tabs., fots.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias
Co-orientador: Maurício Bacci Júnior

1. Formiga. 2. Glândulas mandibulares. 3. Morfologia.
4. Ultra-estrutura. 5. Biologia molecular. I. Título.

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

Dedico esta tese...

... À Deus, por ter me oferecido o dom da vida, por ter me guiado nos momentos de decisões e por ter sido o grande autor desta conquista.

“Na tua presença há plenitude de alegria, na tua destra, delícias perpetuamente” (Salmo 16:11).

Peço-te, Senhor, que continues

abrindo-me os olhos com a tua sabedoria!

“Por que o que me acha acha a vida e alcança favor do Senhor” (Prov.8:35).

Abre os meus olhos, Senhor!

“Quero ver-te, Senhor, do outro lado da lama, do outro lado dos montões de lixo, do outro lado da fome, do outro lado das guerras, do outro lado do sofrimento, do outro lado da doença, do outro lado da morte. Quero ver-te como tu és e não como os outros dizem que és. Quero ver-te na imensidão e na ordem do universo, na mais distante galáxia e na mais próxima estrela. Quero ver-te na cachoeira, na gruta, na floresta, no deserto, na praia, nas alturas dos montes e nas profundezas dos mares, na desembocadura dos rios, nas campinas e nos vales. Quero ver-te no amanhecer e no entardecer, ao meio-dia e à meia-noite, no vento, na chuva, nos relâmpagos, no trovão. Quero ver-te no botão de rosa, no ipê-amarelo, no girassol, no jardim, no pomar, na horta, nos bosques, na grama, nos pastos e no matagal. Quero ver-te no meu corpo, na parte de fora e na parte de dentro, no mais visível e no mais escondido, no mais simples e no mais complexo. Quero ver-te na biologia, no DNA, nas células-tronco, na substância ainda informe, no crescimento, na reprodução e no envelhecimento. Quero ver-te nos mistérios da vida, nos mistérios da mente, nos mistérios do amor, nos mistérios da alma, nos mistérios da criação. Quero ver-te na vaga lembrança, na saudade, na sede, na fome e no temor que eu tenho de ti, no desassossego de minha alma enquanto ela não repousa em ti. Senhor, abre os meus olhos, pois quero ver a lama, os montões de lixo, a fome, as guerras, o sofrimento, a doença e a morte sob outra perspectiva, sob a perspectiva cristã. Abre os meus olhos para eu ver o que está acima das nuvens mais baixas (At. 1:9). Abre os meus olhos para eu ver o Senhor assentado num trono alto e exaltado (Is. 6:1). Abre os meus olhos para eu ver os céus abertos e o Filho do Homem em pé, à direita de Deus (At. 7:56). Abre os meus olhos para eu ver o Cordeiro — que parecia ter estado morto — em pé, no centro do trono, pronto para abrir o livro fechado por dentro e por fora e dar prosseguimento à história (Ap. 5:6). Abre os meus olhos para eu ver a destruição, a morte e o enterro da morte (I Co. 15:26). Abre os meus olhos para eu ver a transformação dos vivos e a ressurreição dos mortos (I Co. 15:50-58). Abre os meus olhos para eu ver novos céus e nova terra, onde habita a tão procurada justiça (II Pe. 3:13; Ap. 21:1). Abre os meus olhos para eu ver a plenitude da salvação” AMÉM!

*... Aos meus pais, Antonio Carlos Pavon e
Elvira Izabel Favaro, 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, pudesse realizar os meus.*

Amo vocês!

*... Aos meus sogros, Lucila Maria
Rosella Porfirio e Lourival
Porfirio, pessoas especiais dadas
por Deus, as quais com exemplos
e orações abençoaram os meus
passos.*

... Ao meu amor: Alexandre Miguel Rosella Porfirio

*Quantas vezes nos despedimos para lutarmos por nossos ideais.
Quantas vezes, nesses momentos de ausência, foste força, paciência e acalento!
Admiro-te muito, pois me amou acima de todos os obstáculos que o caminho
que escolhi me impôs.
Agradeço suas palavras constantes de incentivo e força.
E que essa força que também sinto em seu olhar possa fazer com que jamais
desista de almejar o amor,
Pois é o seu amor que me dá VIDA.
Meu coração declara: Amo você!*

Agradeço de modo muito especial à Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias por:

*Sua dedicação ao ensino e a pesquisa,
Acreditar em meu trabalho,
Sua valorosa orientação,
Conduzir-me com diligência e sabedoria,
Tão valorosa amizade.*

*Obrigada, querida Bél, por ter sido
mais que uma grande orientadora!
Que Deus a abençoe!*

*“Alguns caminham à frente com o cajado na mão,
assumindo, raciocinando, escolhendo o melhor
caminho a ser seguido, levando consigo a
responsabilidade seguida pelos demais que crêem e
buscam seguir exemplos e aspirar a luz daquele que
conduz. Bendito o mestre que tem a posse desse
cajado e da luz maior para conduzir seus alunos ao
porvir, deixando a cada formatura um canudo
em suas mãos, que diante da sabedoria de
sua aplicação, pode transformar-se em
novo cajado que a outros guiarão”.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à  Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho (Processo nº. 03/00553-8).

Aos docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro pelo auxílio dispensado no decorrer deste estudo: Profa. Carmina de Cruz-Landim, Márcia B. Braga, Ana C. Leonardo, José Chaud Netto, Flávio Caetano, Maria Ap. Marim-Morales, Doralice Maria Cella e Carmem Silva Fontanetti Christofoletti.

Aos técnicos de laboratório pela cooperação e suporte técnico: Anderson, Rogilene Ap. Prado, Gerson de Mello Souza, Mônica Iamonte e Antônio T. Yabuki.

À secretária do departamento de Biologia, Lucila de Lourdes S. Franco e em especial, à Cristiane Milleo pela ajuda na confecção de imagens.

Aos meus amigos de pós-graduação pelos bons momentos compartilhados: Giselly, Marielle, Fábio Britto, Zé Augusto, Thays, Tati, Giovana, Fernanda, Douglas, Isabela, Zinho, Silvana, Dani, Márcia, Reinaldo, Bruno, Rodrigo e Márcio.

Àqueles amigos, irmãos de orientação, pela agradável convivência: Pablito, Jú Rollo, Amandita, Paty, Karim, Gislaine, Déby, Gaby's e Luciano. Em especial, à Sandra e Érika pela grande amizade e pelo amor que sempre dispensaram a mim. Já sinto falta de vocês!

À pensão do Sr. Sebastião, ambiente muito especial, onde fiz várias amizades: Aline, Giovana, Silma, Adriana... e à D. Maria (*in memoriam*), uma grande mulher que sempre me tratou com muito carinho.

Agradeço a todos que de alguma maneira participaram da minha história! Que Deus esteja abençoando-os!

ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 MATERIAL.....	18
3.2 MÉTODOS.....	18
3.2.1 MORFOLOGIA.....	18
3.2.2 HISTOLOGIA.....	19
3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	19
3.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	19
3.2.5 HISTOQUÍMICA.....	20
3.2.5.1 Detecção de DNA/RNA.....	20
3.2.5.2 Detecção de Polissacarídeos Ácidos e Neutros.....	21
3.2.5.3 Detecção de Proteínas Totais.....	21
3.2.5.4 Detecção de Lipídios Ácidos.....	22
3.2.6 DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL.....	22
3.2.6.1 Preparação do Extrato.....	22
3.2.6.2 Dosagem Protéica.....	22
3.2.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.....	23
3.2.7.1 Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida e eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	24
3.2.8 CITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL.....	25
3.2.8.1 Detecção de Proteínas Básicas.....	25
3.2.8.2 Detecção de Polissacarídeos.....	25
3.2.8.3 Detecção de Lipídios.....	26
3.2.9 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES EXPRESSOS (DDRT-PCR).....	27
3.2.9.1 Dosagem de RNA total.....	27
3.2.9.1.1 Coleta do material para extração de RNA total.....	27

3.2.9.1.2 Extração de RNA total com trizol.....	27
3.2.9.1.3 Dosagem de RNA total extraído das amostras.....	29
3.2.9.2 Eletroforese de RNA total.....	29
3.2.9.3 Transcrição Reversa (RT-PCR).....	30
3.2.9.4 <i>Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (DD-RTPCR).....	31
3.2.9.5 Preparo do Gel de Poliacrilamida.....	33
3.2.9.6 Preparo das amostras para o Gel de Poliacrilamida.....	34
3.2.9.7 Secagem e visualização do Gel de Poliacrilamida.....	34
3.2.9.8 Análise dos fragmentos gênicos amplificados.....	35
4. RESULTADOS.....	37
CAPÍTULO 1: A morpho-histological and ultrastructural study of the mandibular glands of <i>Atta sexdens</i> worker ants (Hymenoptera: Formicidae).....	40
CAPÍTULO 2: Histochemistry and protein profile of the mandibular glands of workers of the ant <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae).....	43
CAPÍTULO 3: Ultrastructural studies of the mandibular glands of the minima, media and soldier ants of <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae).....	47
CAPÍTULO 4: Study of the mandibular glands of ant workers <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae) focusing the ultrastructural cytochemistry.....	51
CAPÍTULO 5: Analysis of the Differential Gene Expression, by the DD-RTPCR technique, of workers <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mandibular glands (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae).	77
5. DISCUSSÃO FINAL.....	110
6. CONCLUSÕES.....	119
7. REFERÊNCIAS.....	122

Resumo

RESUMO

As glândulas mandibulares, dos insetos Hymenoptera, fazem parte do seu sistema salivar. São estruturas pares que se localizam uma em cada lado da cabeça, possuindo um ducto excretor abrindo na base da articulação da mandíbula, por onde eliminam a secreção produzida. São compostas por um reservatório associado às células secretoras, sendo que cada célula desemboca individualmente no reservatório através de canalículos. Embora as glândulas mandibulares estejam ligadas às peças bucais, utilizando seu produto glandular na ingestão e digestão de alimentos, essas glândulas evoluíram no sentido de se dissociarem da função digestiva para terem função comportamental. No presente estudo avaliou-se a morfo-histologia, citoquímica ultra-estrutural, dosagem e eletroforese de proteínas, além da expressão gênica das glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, com o objetivo de fornecer informações sobre a dinâmica da produção, bem como a composição e origem da secreção dessas glândulas nas três castas desses insetos. A análise morfológica e ultra-estrutural evidenciou uma organização glandular saculiforme, constituída por uma porção secretora e um reservatório com um ducto excretor a ele conectado. A porção secretora é formada por células arranjadas em ácinos e o reservatório é constituído por um epitélio simples pavimentoso revestido pela íntima cuticular. Essas duas porções encontram-se interligadas por canalículos intra e extracitoplasmáticos. Tanto a histoquímica, quanto a citoquímica ultra-estrutural detectou lipídios, proteínas e polissacarídeos nas diferentes regiões das glândulas mandibulares nas três castas estudadas, inclusive em suas secreções, demonstrando, com isso, a possível participação desses elementos na constituição das substâncias aí

produzidas. O estudo permitiu ainda verificar que os lipídios, presentes nas glândulas mandibulares, possuem duas fontes de origem: o retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias das células secretoras. A análise de DD-RTPCR evidenciou a ocorrência de expressão gênica diferencial entre as glândulas mandibulares das três castas sugerindo relações inter e intra castas em *A. s. rubropilosa*.

Palavras-chaves: glândulas mandibulares, *Atta sexdens rubropilosa*, formigas, morfologia, ultra-estrutura, biologia molecular.

Abstract

ABSTRACT

The mandibular glands, in the Hymenoptera insects, make up part of the salivary system. These glands are paired structures that are located one on each side of the head, containing an excretory duct, at the base of the mandible articulation, from which the secretion produced is eliminated. They contain a reservoir associated with the secretory cells, being that each cell opens individually in the reservoir through the canaliculi. Even though the mandibular glands are connected to the bucal parts, using its glandular product in the ingestion and digestion of food, these glands have evolved in the sense of being disassociated with the digestive function to having a behavioural function. In the present study the morpho-histology, ultrastructural cytochemistry, protein dosage and electrophoresis were evaluated, as well as the gene expression of the mandibular glands of the minima, media workers and soldiers of ants *Atta sexdens rubropilosa*, with the objective of providing information about the production dynamics, as well as the composition and origin of the secretion of these glands in the three castes of these insects. The morphological and ultrastructural analysis described a glandular organization consisting of sacs, formed by a secretory portion and a reservoir with a connected excretory duct. The secretory portion is formed by cells arranged in alveoli and the reservoir is constituted of a simple pavementous epithelium covered by the cuticular intima. These two portions are interconnected by intra- and extra-cytoplasmic canaliculi. The histochemistry, as well the ultrastructural cytochemistry, highlighted lipids, proteins and polysaccharides in different regions of the mandibular glands in the three castes studied demonstrating the possible role of these elements in the constitution of secretion formed there. This study also made possible the verification that the lipids,

present in the mandibular glands, have two sources of origin: the smooth endoplasmic reticulum and the mitochondria of the secretory cells. The DD-RTPCR analysis highlighted the occurrence of a differential gene expression between the mandibular glands of the three castes, suggesting inter- and intra-caste relations in *Atta sexdens rubropilosa*.

Key-words: mandibular glands, ants, *Atta sexdens rubropilosa*, morphology, ultrastructure, molecular biology.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As glândulas mandibulares dos Hymenoptera são estruturas ligadas às mandíbulas. Elas foram primeiramente descritas por Meinert (1860) em *Apis*, como estruturas pares localizadas uma em cada lado da cabeça e possuindo um canal excretor localizado na superfície interna da articulação da mandíbula com a própria cabeça. Depois, novamente por Schiemenz (1883) em *Apis*, e finalmente por Bordas (1895) que generalizou a sua ocorrência para todos os Hymenoptera.

As estruturas glandulares dos Hymenoptera evoluíram do mesmo folheto embrionário que as estruturas bucais, fazendo parte do chamado sistema glandular salivar. Nas formigas, quatro pares de glândulas formam esse sistema: labiais ou salivares torácicas, mandibulares, pós-faríngeas e maxilares ou hipofaríngeas (HOLLOBLER; WILSON, 1990).

Nos Hymenoptera, as glândulas mandibulares estão presentes em todas as espécies, e em geral, são classificadas em dois tipos: as ectomandibulares ou glândulas mandibulares I e as mesomandibulares, intramandibulares ou glândulas mandibulares II (SPRADBERY, 1991).

Nas abelhas e formigas elas apresentam-se como estruturas em forma de saco, localizadas na frente do cérebro, com tamanho e forma variados (CRUZ-LANDIM, 1967; GRAF, 1970). Situam-se uma de cada lado da cabeça e abrem-se na base das mandíbulas. Cada uma delas é composta por um reservatório em forma de saco com parede muito fina, associado às células secretoras, que alguns autores consideram como sendo a glândula mandibular propriamente dita (HERMAN et al., 1971).

O reservatório tem por função abrigar no seu interior misturas com composição variada e dependendo do inseto considerado essas misturas podem conter componentes como: álcoois, aldeídos e cetonas (HOLLDOLBLER; WILSON, 1990).

Noirot; Quennedey (1974, 1991), estudando a ultra-estrutura de glândulas exócrinas de alguns insetos, propuseram uma classificação para as células secretoras. A classificação proposta agrupou as células glandulares secretoras nos tipos I, II e III dependendo da sua morfogênese, de sua posição em relação à cutícula e do modo com que a glândula eliminava a secreção. As células secretoras do tipo III que fazem parte das glândulas mandibulares dos insetos são geralmente esféricas e providas de um canalículo por onde a secreção é descarregada. A sua membrana plasmática produz uma invaginação que cria um espaço, aparentemente intracelular, para onde a célula secreta a cutícula. Este espaço toma a forma de um canalículo que percorre o citoplasma da célula e tem sido denominado canalículo intracelular, embora topologicamente esteja fora da célula. A membrana plasmática que limita este espaço canalicular pode apresentar microvilosidades ou invaginações tubulares que formam um labirinto pericanalicular (CRUZ-LANDIM, 2002). Os canalículos das células secretoras caminham independentemente uns dos outros como ocorre nas glândulas hipofaríngeas de *Polister*

versicolor (BRITO et al., 2000), nas glândulas mandibulares de *Melipona bicolor* (GRACIOLI; MORAES, 2002), bem como nos insetos em geral.

Embora as glândulas mandibulares estejam ligadas às peças bucais, utilizando seu produto glandular na ingestão e digestão de alimentos, alguns autores relataram que essas glândulas evoluíram no sentido de se dissociarem da função digestiva para terem função comportamental (GAMA, 1985). De acordo com Brough (1978) e Delage-Darchen (1976) as glândulas mandibulares, bem como as pos-faríngeas dos insetos produzem feromônios que são amplamente utilizados no estabelecimento social da colônia.

Dentro dos Hymenoptera sociais, as glândulas mandibulares desempenham importante função na produção de feromônios e de secreções exclusivamente defensivas (WILSON; REGNIER, 1971; WILSON, 1971). Especialmente em abelhas e formigas essas glândulas têm sido bem estudadas e o seu papel na produção da secreção com função na comunicação entre os indivíduos da colônia tem sido confirmado. Estudos específicos realizados em rainhas de *Apis* revelaram que estas possuem as glândulas mandibulares maiores do que as encontradas nas operárias. Essas glândulas, nas rainhas funcionam como produtoras de feromônios que controlam as atividades da colônia, ao passo que nas operárias elas atuam na produção da saliva que servirá, por exemplo, para amolecer o casulo na emergência destas abelhas (CHAPMAN, 1998).

Nos Myrmicinae de maneira geral, alguns autores analisando a secreção da glândula mandibular sugeriram que a mesma funcionaria como feromônio de alarme (CREWE; BLUM, 1970). No entanto, outros postulam que a secreção desta glândula agiria como feromônio de alarme, bem como na defesa da colônia (GHENT, 1961).

Cammaerts-Tricot (1973) mostrou que a glândula mandibular de *Myrmica rubra* é essencialmente uma fonte de feromônio de atração, e que as secreções contêm substâncias químicas voláteis que atuam no comportamento das operárias que eventualmente estejam circulando na vizinhança.

Nos Hymenoptera, portanto, a secreção da glândula mandibular de forma geral está envolvida na defesa e comunicação da colônia (BUSCHINGER; MASCHWITZ, 1984; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; BILLEN; MORGAN, 1998), porém também pode atuar como inibidora do crescimento de fungos (MARSARO JUNIOR et al., 2001). Nos machos de algumas espécies, a glândula mandibular pode ainda servir como fonte de feromônio sexual (AYASSE et al., 2001).

Nos Formicidae especialmente, a glândula mandibular tem sido descrita como órgão responsável pela produção do feromônio de alarme, substância volátil e que se dispersa no ar, a uma distância significativamente grande alertando as operárias de algum perigo. O mesmo feromônio, em outras situações orienta as operárias para a fonte de emissão e, portanto, o sítio de onde a primeira operária detectou a informação. O feromônio de alarme da formiga *Oecophylla longinoda* tem pelo menos quatro componentes ativos, o hexanal, que alerta os outros indivíduos, o 1-hexanol, que auxilia a orientar a fonte de emissão do feromônio, a 3-undecanona e o 2-butil-2-octanal que induz as formigas a morderem (CAETANO et al., 2002b). Cada uma dessas substâncias difunde-se no ar em velocidades diferentes por meio de uma reação coordenada em cadeia (JAFFÉ, 1993). Wilson (1971) em estudos com formigas da subfamília Myrmicinae já havia relacionado 11 tipos de feromônios de alarme produzidos pelas glândulas mandibulares.

Considerando os insetos sociais, as colônias de formigas apresentam uma complexa divisão de tarefas ou funções. A população de um formigueiro é composta de indivíduos morfológicamente diferentes (polimorfismo) possibilitando o desenvolvimento de diferentes funções dentro da colônia (polietismo).

Segundo Wilson (1980), o termo “tarefa” significa desempenhar determinada seqüência de atos com propósitos específicos. Em *Atta sexdens rubropilosa* cada casta desempenha determinadas tarefas, a saber:

- a) Operárias mínimas (jardineiras ou babás) = cultivar o fungo e cuidar da cria no interior da colônia;
- b) Operárias médias (generalistas) = degradar a vegetação antes da incorporação da mesma ao jardim de fungo, assistir a prole durante a ecdise, cuidar da rainha, descartar o lixo e reconstruir as esponjas de fungo;
- c) Soldados (defensoras) = defender o ninho.

Dentre os insetos sociais, estudos relacionados à biologia molecular por meio de análises da expressão gênica, têm sido pouco realizados em formigas. No entanto, em abelhas alguns estudos moleculares visam à determinação de sexo e castas, vias metabólicas relacionadas à ontogênese ou até mesmo mecanismos de divisão de trabalho dentro da colméia (MACHADO; BONETTI, 2001).

Análises da expressão gênica, no desenvolvimento de rainhas e operárias de *Apis mellifera*, demonstraram a presença de numerosos genes se expressando diferencialmente nas duas castas (EVANS; WHEELER, 1999). Dois deles são particularmente promissores como potenciais reguladores da diferenciação de castas. Os resultados deixam claro que este processo envolve a ativação de genes específicos tanto em operárias quanto em rainhas.

O processo de determinação de casta em operárias e rainhas de *A. mellifera* também foi estudado por Corona et al. (1999) que identificaram dois genes codificantes de proteínas mitocondriais, subunidade I do citocromo oxidase e do citocromo c, e mostraram expressão diferencial desses dois genes nas rainhas e operárias. Em particular, o transcrito citocromo c é mais abundante em larvas de rainhas, indicando maior taxa respiratória nessa casta quando comparada com a operária.

Machado; Bonetti (2001) estudando a expressão gênica estágio-específica em *Melipona scutellaris* revelaram a expressão de dois produtos específicos para larva no estágio 1, um produto para larva no estágio 2 e dois produtos específicos para larvas nos estágios 3, pré-defecante e defecante. Esses resultados mostraram expressão gênica diferencial e específica para estes estágios de desenvolvimento nessas abelhas.

Oliveira Júnior (1999) analisou atuações genético-moleculares que influenciariam na divisão de trabalho em *A. mellifera* e detectou 6 genes que seriam candidatos a ter expressão diferencial, os quais atuariam no mecanismo de divisão de trabalho dentro da colméia.

Objetivos

2. OBJETIVOS

As formigas *Atta sexdens rubropilosa* são consideradas pragas na agricultura, causando grandes danos às diversas plantações de importância econômica. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos fornecer informações sobre a produção e a dinâmica da secreção das glândulas mandibulares das três castas desses insetos, por meio de:

1) Análise morfo-histológica e ultra-estrutural da porção secretora e do reservatório;

2) Aplicação de técnicas histoquímicas para verificação da presença de lipídios, proteínas e polissacarídeos tanto nas células da porção secretora, quanto no reservatório (incluindo a secreção);

3) Dosagem de proteínas totais e análise do perfil eletroforético protéico das glândulas;

4) Citoquímica ultra-estrutural das células secretoras e do reservatório para localização e detecção da origem dos diversos compostos químicos;

4) *Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (DD-RTPCR) para estabelecimento do padrão da expressão gênica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa* foram coletadas dos ninhos artificiais mantidos nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MORFOLOGIA

Os indivíduos foram anestesiados por choque térmico em freezer e dissecados em placas de Petri contendo solução fisiológica para insetos (NaCl, KH_2P_4 , NaHPO_4 , pH 7,2). Após a remoção das glândulas mandibulares, foram confeccionados esquemas das mesmas, com auxílio de câmara clara acoplada a estereomicroscópio.

3.2.2 HISTOLOGIA

As glândulas mandibulares, após terem sido extraídas em solução fisiológica para insetos, a temperatura ambiente, foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 2 horas. Em seguida, foram transferidas para tampão fosfato 10% (0,1M - pH 7,4) por 24 horas. Posteriormente, as mesmas foram desidratadas em solução crescente de etanol a 70, 80, 90 e 95%, durante 10 minutos cada banho, embebidas e incluídas em historesina JB4 (Polyscience). O material foi seccionado com auxílio de micrótomo Sorvall-4 Bio Rad. As secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. Em seguida, foram coradas com hematoxilina e eosina.

3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As glândulas mandibulares foram extraídas e fixadas em Karnovsky durante 24 horas, à temperatura ambiente, lavadas em tampão fosfato 4% e desidratadas em série crescente de soluções de etanol (70%, 80%, 90%, 95% - 5 minutos cada). A seguir, foram processadas pelo “Criptal Point Drying”, metalizadas com ouro em “Sputtering” e examinadas em Microscópio Eletrônico de Varredura – PHILLIPS 505 SEM.

3.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os indivíduos foram dissecados diretamente em fixador glutaraldeído a 0,5% onde tiveram as glândulas mandibulares removidas e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato (0,2M, pH 7,4) durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, foram realizadas 2 lavagens no mesmo tampão, com duração de 15 minutos cada, seguido de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora. O material foi contrastado em acetato de uranila 0,5%, durante 30 minutos, desidratado e posteriormente embebido em

resina Epon-Araldite diluída em acetona 1:1, onde permaneceu durante 24 horas a 4° C. O material foi então incluído em resina Epon-Araldite pura e levado para estufa por 72 horas a 60°C para polimerização. As secções semi e ultra-finas foram realizadas em ultra-micrótomo Porter Blum MT-2. As secções semi-finas foram coradas com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%) para seleção dos melhores blocos. As secções ultra-finas foram colocadas em telas de cobre e contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,4%. As telas foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS CM 100.

3.2.5 HISTOQUÍMICA

As glândulas mandibulares foram retiradas e processadas segundo a rotina utilizada para histologia e em seguida, foram submetidas aos testes histoquímicos para a detecção de DNA/RNA, polissacarídeos ácidos e neutros, proteínas totais e lipídios ácidos.

3.2.5.1 RNA/DNA:

Azul de Toluidina, segundo Mello; Vidal (1980).

O material foi fixado em paraformaldeído 4%. As lâminas contendo as secções foram hidratadas em água destilada, sendo a seguir coradas pelo Azul de Toluidina 0,5%, pH 3,5, por cerca de 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas suavemente em água destilada, secas em suporte, diafanizadas em xilol e montadas em Permount.

3.2.5.2 Polissacarídeos Ácidos e Neutros:

PAS/Alcian Blue, segundo Junqueira; Junqueira (1983).

O material foi fixado, em paraformaldeído 4%, seccionado e colocado em lâminas que foram coradas com solução de Alcian Blue por 30 minutos e depois, lavadas em água destilada. Em seguida, foram submetidas ao ácido periódico 1% por 5 minutos, lavadas rapidamente em água destilada e coradas com reagente de Schiff por 30 minutos. Foram contracoradas com hematoxilina por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas, passadas em xilol e montadas em Permount.

3.2.5.3 Proteínas Totais:

Xilydine Ponceau, segundo Mello; Vidal (1980).

O material foi fixado em paraformaldeído 4%. As lâminas contendo as secções foram coradas por 40 minutos pelo Xilydine Ponceau. Depois, permaneceram por 5 minutos em solução tampão acetato de sódio pH 2,5. As mesmas foram lavadas em água destilada, secas a temperatura ambiente e montadas em Permount.

3.2.5.4 Lipídios Ácidos:

Azul do Nilo, segundo Pearse (1985).

O material foi fixado em paraformaldeído 4%, seccionado e colocado em lâminas, que foram coradas, durante 5 minutos, com Azul do Nilo a 37°C e lavadas rapidamente em água corrente. Em seguida, foram passadas em ácido acético 1% por 1 minuto, colocadas em suporte para secagem e montadas em glicerina gelatinada.

3.2.6 DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

3.2.6.1 Preparação do extrato:

As operárias foram dissecadas em solução fisiológica para insetos sob estereomicroscópio com luz fria para retirada das glândulas mandibulares, e posterior transferência das mesmas para tubos *ependorff* contendo 100µL de solução fisiológica. Esses tubos, durante a dissecação, foram mantidos a 4°C, e em cada um foram colocadas 5 glândulas mandibulares.

As glândulas mandibulares nos *ependorfs* foram homogeneizadas com o auxílio de pistilo plástico e a seguir, centrifugadas a 16000xg durante 2 minutos. O sobrenadante obtido de cada tubo foi cuidadosamente retirado e transferido para outros tubos para a dosagem protéica.

3.2.6.2 Dosagem Protéica:

As proteínas totais obtidas dos extratos de cada amostra foram determinadas através do método de BRADFORD modificado (SEDMARK; GROSSBERG, 1977),

com leitura de absorvância a 595 nm, em espectrofotômetro Ultrospec 3000, cujo resultado de absorvância foi transferido para a fórmula abaixo:

$$C = \frac{\Delta \times \text{Fator de correção}}{\text{Volume da amostra}}$$

Onde:

C= Concentração

Δ = Absorvância (resultado da leitura)

F= Fator de correção

V= Volume da amostra (μ l)

3.2.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

Às alíquotas (70 μ g/casta) de proteínas totais das glândulas mandibulares das três castas de *A. s. rubropilosa* foram adicionados 10 μ L do tampão de amostra desnaturante (TRIS-HCl 0,05 M, pH 6,8 contendo 0,1% de SDS, 20% de glicerol, 1 mg/mL de azul de bromofenol β -mercaptoetanol) que foram fervidos por 5 minutos e, posteriormente, injetados nos canais do gel paralelamente a mistura padrão de proteínas de alto peso molecular (anidrase carbônica – 29 KDa; ovoalbumina – 45 KDa; albumina bovina – 66 KDa; fosforilase β – 97 KDa; β -galactosidase – 116 KDa; miosina – 205 KDa).

Para análise dos perfis protéicos, o gel de gradiente (5-20%) de poliacrilamida foi preparado sob condições desnaturantes (na presença de dodecil sulfato de sódio-SDS) utilizando o sistema de tampões alcalinos (Tris - Glicina / Tris - HCl), segundo Hames; Rickwood (1990), conforme mostra a tabela 1:

Tabela 1: Protocolo do preparo do gel de gradiente (5-20%) de poliacrilamida sob condições desnaturantes utilizando o sistema de tampões alcalinos.

	Gel de resolução (5%)	Gel de resolução (20%)	Gel de empilhamento (3,75%)
Acrilamida-Bisacrilamida	0,562 mL	2,250 mL	0,375 mL
Tampão de Resolução: Tris-HCl 3 M, pH 8,8	0,430 mL	0,430 mL	_____
Tampão de empilhamento: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	_____	_____	0,720 mL
SDS 20%	17µL	17 µL	30 µL
Glicerol	_____	0,286 mL	_____
Persulfato de Amônia 1,5%	0,080 mL	0,080 mL	0,230 mL
Água destilada e deionizada	2,411 mL	0,437 mL	1,65 mL
Temed	2 µL	2 µL	3 µL
Total	3,5 mL	3,5 mL	3 mL

3.2.7.1 Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida e eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE):

As amostras foram aplicadas nas raias de corrida e, em seguida, o gel foi submetido à eletroforese, sob voltagem constante de 87 volts por 2 horas, à temperatura ambiente.

Após a corrida, o gel foi transferido para bandeja com solução de *Coomassie Blue* G-250 a 1,0%, em solução de ácido acético, álcool metílico e água na proporção

1:3:6, durante 1 hora, a temperatura ambiente, e na seqüência procedeu-se a descoloração na mesma solução.

O gel foi fotografado e o RF (distância de migração da banda no gel / tamanho do gel) de cada banda protéica foi determinado. Os valores dos RFs do padrão e das amostras foram calculados e os respectivos pesos moleculares obtidos.

3.2.8 CITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL

3.2.8.1 Detecção de proteínas básicas utilizando-se o método da prata amoniacal (MACRAE; MEETZ, 1970):

As glândulas mandibulares foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, lavadas em água destilada, incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente em solução de prata amoniacal (solução de nitrato de prata a 10% adicionada a uma solução concentrada de hidróxido de amônia). A seguir procedeu-se uma lavagem em água destilada e incubação em solução de formaldeído a 3%, durante 5 minutos, onde o material adquiriu cor marrom. Logo após procedeu-se lavagens em água destilada, e pós fixação segundo procedimento de rotina.

3.2.8.2 Detecção de polissacarídeos pelo método de Thiery, 1967:

O material foi preparado seguindo-se a rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Após a ultramicrotomia, o material foi recolhido em grades de ouro, as quais flutuaram em ácido periódico a 1%, durante 15 a 20 minutos. Em seguida, foi feita a incubação em Tiosemicarbazida 1% e em ácido acético a 10%, durante 24 horas. Lavagens sucessivas em ácido acético 10%, 5% e 2% foram feitas, durante 10

minutos cada. Após 3 lavagens de 10 minutos cada, em água destilada, as grades contendo o material foram transferidas para uma solução de proteinato de prata 1% durante 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, o material foi lavado uma vez em água destilada.

3.2.8.3 Detecção de lipídios pelo Ósmio-Imidazol (ARGENMULLER; DE FAHIME, 1982):

As glândulas mandibulares foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 durante 2 horas. A seguir, foram lavadas, durante 10 minutos, no mesmo tampão cacodilato e posteriormente, lavadas em tampão imidazol 0,1M, pH 7,5. Foi efetuada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% em tampão imidazol 0,1M, pH 7,5 durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi lavado mais duas vezes no mesmo tampão, desidratado em acetona e incluído em resina Epon.

Todas as secções ultrafinas obtidas nas técnicas citoquímicas foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS CM 100 sem passarem pelo processo de contrastação.

3.2.9 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES EXPRESSOS POR DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (DD-RTPCR)

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Morfo-Fisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP – Pirassununga - SP, sob a supervisão do Dr. Flávio Vieira Meirelles.

3.2.9.1 Dosagem de RNA total

3.2.9.1.1 Coleta do material para extração de RNA total:

Cerca de 50 glândulas mandibulares de operárias mínimas, médias e soldados de formigas *A. s. rubropilosa* foram retiradas em solução fisiológica para insetos (NaCl, KH_2P_4 , NaHPO_4 , pH 7,2) contendo água-DEPC, tomando-se o cuidado de utilizar luvas e pinças tratadas com DEPC, para evitar o contato do material com RNAses. As glândulas foram colocadas em *eppendorfs* estéreis (RNAse free), contendo 500 µL de trizol (Trizol®, Life Technology, Gaithersburg, MD USA), mantido em gelo durante todo o processo. A seguir, essas glândulas mandibulares foram colocadas em *eppendorfs* que foram armazenados em freezer – 80 °C, até o momento da extração do RNA.

3.2.9.1.2 Extração de RNA total com trizol:

Os *eppendorfs*, contendo o material homogeneizado em trizol, foram colocados em gelo para descongelamento paulatino. Utilizando-se pistilos estéreis, tratados com

água DEPC, o material foi homogeneizado para a completa dissociação do tecido glandular.

Em seguida, 100 µL de água DEPC foram adicionados aos *eppendorfs*, e a solução foi rapidamente homogeneizada em vortex. Esses *eppendorfs* foram incubados à temperatura ambiente por 5 minutos, para a completa dissociação de nucleoproteínas do material. Adicionou-se 100 µL de clorofórmio e os *eppendorfs* foram agitados, manualmente, por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente, por 2 a 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4°C (12000xg), por 15 minutos, e o sobrenadante, onde se encontrava o RNA, foi transferida para um novo tubo. No sedimento ou fase orgânica, DNA e proteínas estavam presentes.

Após a separação de fases, a próxima etapa foi a precipitação do RNA, com 500 µL de álcool isopropílico adicionados à fase aquosa, incubados, por 10 minutos, à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados a 12000xg, por 10 minutos, a 4°C. O RNA precipitado, freqüentemente invisível antes da centrifugação, formou um *pellet* semelhante a um gel no fundo do tubo.

O sobrenadante de cada amostra foi cuidadosamente descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 500 µL de etanol 75%, com micropipeta, até descolar do tubo. A amostra foi submetida ao vortex e, em seguida, centrifugada a 7500xg, por 5 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente, por 5-10 minutos. Antes que o *pellet* secasse completamente, 20 µL de água 0,01% DEPC foram adicionados na amostra, a qual foi incubada por 15 minutos, à temperatura ambiente, para completa dissolução do *pellet*.

3.2.9.1.3 Dosagem de RNA total extraído das amostras:

A quantificação do RNA total das glândulas mandibulares das três castas de formigas *A. s. rubropilosa*, baseada nos métodos descritos por Sambrook et al. (1989), foi realizada em espectrofotômetro em cubeta de quartzo, utilizando um comprimento de onda de 260nm. Foram adicionados 10 µL da solução de RNA total em 990 µL de água DEPC (fator de diluição 100). O valor da absorbância foi utilizado para o seguinte cálculo:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/mL}] = \text{Absorbância (260nm)} \times 40 \times \text{Fator de Diluição}$$

3.2.9.2 Eletroforese de RNA total:

Para o preparo do gel desnaturante de agarose 1% (SAMBROOK et al., 1989), todo o material utilizado foi previamente esterilizado e tratado com água DEPC. Inicialmente, 0,6g de agarose foram dissolvidas em 22,8 mL de água 0,01% DEPC (em aparelho de microondas), acrescentando-se, a seguir, 12 mL de tampão TBE 5X e mais 10,8 mL de formaldeído 2,2 M. Esta solução foi colocada em cuba horizontal de eletroforese, previamente tratada com DEPC, e o gel polimerizado foi recoberto com tampão de corrida (TBE 1X - DEPC) e submetido a uma pré-corrida de 5 minutos, a 60 volts, antes da aplicação da amostra.

Enquanto isso, alíquotas das amostras das glândulas a serem aplicadas no gel foram preparadas da seguinte maneira: 9 µL da amostra + 3 µL do tampão da amostra (glicerol 50 %, 1 mM de EDTA, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol). Essas alíquotas foram aquecidas por 15 minutos, a 65° C, com a finalidade de

linearizar as fitas de RNA, e imediatamente colocadas em gelo, para manter as fitas linearizadas.

As alíquotas foram aplicadas nas raias de corrida do gel e a corrida foi realizada a 60 volts, durante 45 minutos. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio (12 µL a [10mg/ mL], diluído em TBE 1X (200 mL) e analisado em transluminador UV para visualização e registro das bandas de RNAr, por ser o tipo presente em maior quantidade (RNAr 28S e 18S), produz bandas visíveis.

3.2.9.3 RT-PCT (Reação em Cadeia da Polimerase pela Enzima Transcriptase Reversa):

Foi utilizado o *primer* ancora T7AP1, o qual contém um grupo de 12 dTs que possibilita o anelamento com a “cauda poli (A)” dos RNAm durante a geração da fita de cDNA. Com o intuito de subdividir a população de RNAm, que é reversa-transcrita na reação de cDNA, uma combinação de duas bases (GA) foi adicionada à porção 3' do *primer* âncora T7AP1 ('AATACGACTCACTATAGTTTTTTTTTTTTTTGA').

Com isso, alíquotas, contendo 9 µL de RNA total (obtido das glândulas mandibulares das operárias soldados, médias e mínimas) e 1 µL do *primer* âncora T7AP1 (5µM) foram preparadas e aquecidas a 70° C, por 5 minutos, no termociclador, em seguida, mantidas a 4° C por 5 minutos. Foi adicionada às alíquotas 20 µL do Mix (4 µL de tampão Buffer 5X, 2 µL de DTT 0,1%, 2 µL dNTP (205µM) e 1 µL de RNase out). Após 5 minutos, a 4°C relativos ao primeiro passo, acrescentou-se 1 µL da enzima Superscript III (transcriptase reversa) e, durante 5 minutos a 42°C, seguidos de 50 minutos a 50°C, e mais 15 minutos a 70° C, RNAm foram convertidos em cDNAs (fita simples).

3.2.9.4 Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain

Reaction (DD-RTPCR):

Foi utilizado o *primer* âncora T7AP1 TAMRA combinado com 3 *primers* aleatórios ARP2, ARP3, ARP5, totalizando três possíveis combinações (C1, C2, C3), conforme mostrado na tabela 2. O *primer* âncora foi marcado com corante fluorescente (fluoróforo TAMRA), o qual permitiu a visualização dos fragmentos amplificados sem a utilização de rádio-isótopos.

Os *primers* âncora e aleatórios foram cedidos pelos pesquisadores do Laboratório de Morfo-Fisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP – Pirassununga – SP, conforme segue:

T7AP1 TAMRA: AATACGACTCACTATAG

ARP2: GCTAGCATGG

ARP3: GACCATTGCA

ARP5: ATGGTAGTCT

Tabela 2: Combinações (C1, C2, C3) de *primer* âncora T7AP1 e *primers* aleatórios ARPs.

<i>Primers</i>	ARP2	ARP3	ARP5
T7AP1	C1	C2	C3

A técnica de DD-RTPCR foi realizada, conforme descrito na tabela 3, em reações de triplicata nas amostras de cDNAs das glândulas mandibulares de operárias mínimas, médias e soldados de formigas *A. s. rubropilosa*, sendo que todas as

amplificações obtidas foram verificadas em gel de agarose 1,5% antes de seguir o protocolo do gel de poliacrilamida denaturante 6% DDPCR.

Tabela 3: Protocolo da técnica DDPCR (HOME RUN).

Home Run 1		
1° MIX		10 ciclos
Água	2,71 µL	95°C 2 minutos
TP 10X	1,00 µL	
MgCl ₂ (1,0mM)	0,20 µL	92°C 15 segundos
dNTP (250µM)	2,00 µL	42°C 30 segundos
P. Aleatório (5µM)	1,33 µL	72°C 2 minutos
P. T7 marcado (5µM)	1,33 µL	
Taq	0,10 µL	72°C 10 minutos
cDNA	1,33 µL	4°C
Total	10 µL	
Home Run 2		
2° MIX		25 ciclos
Água	2,44 µL	95°C 2 minutos
TP 10X	1,00 µL	
MgCl ₂ (3,5mM)	1,80 µL	92°C 15 segundos
dNTP (250µM)	2,00 µL	42°C 30 segundos
P. Aleatório (5µM)	1,33 µL	72°C 2 minutos
P. T7 marcado (5µM)	1,33 µL	
Taq	0,10 µL	72°C 10 minutos
		4°C 24 horas
Total	10 µL	
VOLUME FINAL	20 µL	

3.2.9.5 Preparo do gel de poliacrilamida desnaturante 6% DDPCR:

Para a realização da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% as placas de vidro da cuba foram lavadas com sabão neutro, enxaguadas com água destilada e água mili Q e em seguida, secas em estufa.

A solução estoque de poliacrilamida (tabela 4) teve o persulfato de amônio e Temed acrescentados apenas no momento de utilização do gel. As placas da cuba foram preenchidas com esta solução com auxílio de seringa de 20 mL para não formar bolhas.

O gel de poliacrilamida foi polimerizado por aproximadamente 1 hora antes de ser utilizado sendo que, uma pré-corrida de 30 minutos a 1500 V foi realizada.

Tabela 4: Preparo da solução estoque de poliacrilamida.

	Volume final			
Reagentes	30 mL	40 mL	120 mL	240 mL
Poliacrilamida 40%	4,5 mL	6,0 mL	18,0 mL	36,0 mL
Água mili Q	13,1 mL	17,4 mL	52,2 mL	104,4 mL
Urea	12,6 g	16,8 g	50,4 g	100,8 g
TBE 10X	3,0 mL	4,0 mL	12,0 mL	24 mL
Persulfato de amônio	200 µL	266 µL	800 µL	1,6 mL
Temed	20 µL	26,0 µL	80 µL	160 µL

3.2.9.6 Preparo das amostras para o gel de poliacrilamida 6%

DDPCR:

Às amostras (produtos das reações de amplificação em triplicata das glândulas mandibulares das três castas de *A. s. rubropilosa*) foram acrescentados 1,5 µL de tampão de carregamento (conforme tabela 5) e 8 µL de PCR. Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos e em seguida, levadas no gelo para aplicação no gel de poliacrilamida.

Tabela 5: Preparo do tampão de carregamento.

Reagentes	Quantidades
Formamida	1 mL
EDTA 1M	21 µL
Água mili Q	32 µL
Xileno cianol	O suficiente para corar a solução

3.2.9.7 Secagem e visualização do gel de poliacrilamida 6% DDPCR:

Após o tempo de corrida, aproximadamente 3 horas, o gel foi levado para secagem em estufa a 60°C. Após uma hora foi lavado com água mili Q para a total retirada da urea. Depois de seco, foi visualizado com “scanner” de fluorescência FLA3000G (Fuji Film, Tokyo - Japão).

3.2.9.8 Análise dos fragmentos gênicos amplificados:

Fragmentos diferencialmente amplificados foram selecionados, isolados diretamente dos géis de DD-RTPCR e reamplificados com a utilização da combinação de *primers* específicos. Posteriormente, os fragmentos foram clonados utilizando-se Kit pGEM-T (Promega) e seqüenciados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Centro de Biologia Molecular Estrutural, Campinas - SP.

As seqüências obtidas foram comparadas a outras do *GenBank* utilizando o programa Blast (ATSCHUL et al., 1997).

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados sob a forma de capítulos, onde cada um contém um artigo submetido ou já publicado em periódico internacional e especializado na área. Cada artigo traz resultados específicos de cada aspecto abordado nas glândulas mandibulares das três castas de *Atta sexdens rubropilosa* estando, portanto composta pelos cinco capítulos abaixo relacionados:

Capítulo 1:

Título: A morpho-histological and ultrastructural study of the mandibular glands of *Atta sexdens* worker ants (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon e Maria Izabel Camargo Mathias

Periódico: Sociobiology - 38(3A): 449 – 464, 2001.

Capítulo 2:

Título: Histochemistry and protein profile of the mandibular glands of workers of the ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon e Maria Izabel Camargo Mathias

Periódico: Cytologia - 69(2): 225 - 234, 2004.

Capítulo 3:

Título: Ultrastructural studies of the mandibular glands of the minima, media and soldier ants of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon e Maria Izabel Camargo Mathias

Periódico: Micron - 36(5): 449 - 460, 2005.

Capítulo 4:

Título: Study of the mandibular glands of ant workers *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae) focusing the ultrastructural cytochemistry.

Autores: Lorena Favaro Pavon e Maria Izabel Camargo Mathias

Artigo submetido para publicação no periódico *Naturwissenschaften*.

Capítulo 5:

Título: Analysis of the Differential Gene Expression, by the DD-RTPCR technique, of workers *Atta sexdens rubropilosa* mandibular glands (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon, Maria Izabel Camargo Mathias, Flávio Meirelles e Maurício Bacci

Artigo submetido para publicação no periódico *Behavioral Ecology and Sociobiology*.

Capítulo 1

4.1 Capítulo 1:

Título do artigo: A morpho-histological and ultrastructural study of the mandibular glands of *Atta sexdens* worker ants (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon¹ e Maria Izabel Camargo Mathias²

1,2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências - Departamento de Biologia.

Periódico: Sociobiology - 38(3A): 449 – 464, 2001.

Resumo: As glândulas mandibulares dos Hymenoptera são estruturas associadas às mandíbulas, constituindo o sistema de glândulas salivares. O presente trabalho teve por objetivo estudar a ultra-morfologia e a histologia das glândulas mandibulares de operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa*. A glândula mandibular nesses insetos é constituída por uma porção secretora e um reservatório com um ducto excretor a ele conectado. A porção secretora é formada por células secretoras arranjadas em ácinos e com núcleos evidentes. Ambas as porções, reservatório e células secretoras, encontram-se conectadas uma as outras por canalículos que possuem porções intra e extracitoplasmáticas. Essas glândulas possuem a mesma morfologia nas três castas de formigas estudadas, diferindo apenas no tamanho, apresentando glândulas menores nas operárias mínimas e maiores nos soldados.

Palavras-Chave: Hymenoptera, Formicidae, formigas, glândula mandibular, morfologia, histologia, ultra-estrutura.

Capítulo 2

4.2 Capítulo 2:

Título do artigo: Histochemistry and protein profile of the mandibular glands of workers of the ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon¹ e Maria Izabel Camargo Mathias²

1,2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências - Departamento de Biologia.

Periódico: Cytologia – International Journal of Cytogenetics and Cell Biology - 69(2): 225 - 234, 2004.

Resumo: As glândulas mandibulares dos insetos estão sempre associadas às mandíbulas fazendo parte do sistema de glândulas conhecidas como salivares. São compostas por um reservatório associado às células secretoras, sendo que cada célula secretora desemboca individualmente no reservatório através de canalículos. Estas glândulas desempenham um papel importante na produção de feromônios, relacionados com a defesa, comunicação e reprodução da colônia. Glândulas mandibulares de operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa* foram processadas para diferentes testes histoquímicos, dosagem total de proteínas e perfil eletroforético protéico. A histoquímica detectou a presença de lipídios, DNA/RNA, polissacarídeos e proteínas nas diferentes regiões da glândula. O perfil protéico demonstrou que tanto as concentrações do teor protéico total quanto o número de polipeptídios de cada casta obedecem a uma ordem progressiva em relação ao tamanho dos indivíduos, e dessa

forma, a secreção produzida está diretamente ligada às tarefas que as diferentes castas desempenham na colônia.

Palavras-Chave: formigas, glândula mandibular, histoquímica, proteínas, feromônios.

Capítulo 3

4.3 Capítulo 3:

Título do artigo: Ultrastructural studies of the mandibular glands of the minima, media and soldier ants of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon¹ e Maria Izabel Camargo Mathias²

1,2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências Departamento de Biologia – Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Periódico: Micron - International Research and Review Journal for Microscopy - 36(5): 449 - 460, 2005.

Resumo: As glândulas mandibulares dos Hymenoptera são estruturas associadas às mandíbulas, constituindo o sistema de glândulas salivares. Estudos em operárias de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, revelaram que as glândulas mandibulares apresentam duas porções: uma secretora e uma armazenadora ou reservatório. O presente trabalho teve por objetivo estudar a ultra-estrutura das glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados de formigas *A. s. rubropilosa* através de técnicas de MET. As glândulas, nas três castas estudadas, possuem o reservatório, constituído por um epitélio simples pavimentoso revestido pela íntima cuticular, e pela porção secretora formada por células secretoras, as quais possuem forma arredondada. As células secretoras, das operárias mínimas e soldados principalmente, são ricas em retículo endoplasmático liso. As operárias médias e soldados apresentam grande número de mitocôndrias de variadas formas. Na casta dos soldados estão presentes complexos

de Golgi bem desenvolvidos. As células secretoras das glândulas das três castas são providas de canalículos coletores intracelulares que se ligam ao reservatório através da porção extracelular. A célula formadora dos canalículos foi evidenciada, sendo seu citoplasma pobre em organelas. As células secretoras, nas três castas estudadas, apresentam grânulos de secreção lipídica, sugerindo uma possível ação feromonal. As diferentes funções executadas pelas diferentes castas são diretamente dependentes dos produtos glandulares e, conseqüentemente das características celulares secretoras.

Palavras-Chave: glândula mandibular, *Atta sexdens rubropilosa*, ultra-estrutura, feromônios.

Capítulo 4

4.4 Capítulo 4: Trabalho submetido para publicação no periódico *Naturwissenschaften*.

Título do artigo: Study of the mandibular glands of ant workers *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae) focusing the ultrastructural cytochemistry.

Autores: Lorena Favaro Pavon¹ e Maria Izabel Camargo Mathias².

1, 2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências Departamento de Biologia – Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Resumo: As glândulas mandibulares, dos Hymenoptera em geral, estruturas pares localizadas uma em cada lado da cabeça, possuem um ducto excretor, na base da articulação da mandíbula, por onde eliminam a secreção produzida. As glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa* foram analisadas utilizando-se métodos citoquímicos ultra-estruturais para verificar a composição química das secreções produzidas e conseqüentemente, associá-las às diversas funções desempenhadas pelas diferentes castas. As análises de citoquímica ultra-estrutural evidenciaram a presença de proteínas, polissacarídeos e lipídios nas diferentes regiões das glândulas mandibulares, bem como nas secreções dos indivíduos das três castas. A técnica citoquímica para detecção de lipídios evidenciou duas fontes de origem para os mesmos: o retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias das células secretoras. O presente estudo mostrou que as glândulas mandibulares dos indivíduos das três castas de *A. s. rubropilosa*, os soldados e as operárias médias, que

executam tarefas fora do ninho e, com isso, estão mais expostos a predação e/ou infecção, e as mínimas, as quais cuidam da cultura de fungos, produzem compostos que poderiam atuar como feromônio de alarme e/ou de defesa da colônia.

Palavras-Chave: formigas, *Atta sexdens rubropilosa*, glândula mandibular, citoquímica ultra-estrutural, lipídios, feromônio de alarme.

Title: Study of the mandibular glands of ant workers *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae) focusing the ultrastructural cytochemistry.

Running head: Ultrastructural study of the mandibular glands of *Atta sexdens rubropilosa*.

Key words: ants, mandibular glands, cytochemistry, ultrastructure.

Authors: Lorena Favaro Pavon¹ and Maria Izabel Camargo Mathias².

1,2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro – SP - Brasil / Instituto de Biociências, Departamento de Biologia – Laboratório de Microscopia Eletrônica. E-mail: 2) micm@rc.unesp.br.

Corresponding author - E-mail address: micm@rc.unesp.br

Tel/Fax: 055-19-3534-0009

Abstract:

The mandibular glands of hymenopterans in general are paired structures located on each side of the head. These glands possess an excretory duct located at the internal surface of the mandible articulation, through which these glands release the secretion they produce. The mandibular glands of the minima, media and soldier worker of the ant *Atta sexdens rubropilosa* were analyzed by the methods of ultrastructural cytochemistry to verify the composition of the produced secretions and consequently, to associate them to the several functions carried out by the different castes. The results evidenced the presence of proteins, polysaccharides and lipids in the different portions of the mandibular glands as well as in the secretions stored in the reservoir. The cytochemistry also showed that the lipids present in the mandibular gland of the individuals of three worker castes of this species would have at least two different sources: the smooth endoplasmic reticulum as well as the mitochondria present in the secretory cells cytoplasm. The present study showed that the mandibular glands of the individuals of the three worker castes of *A. s. rubropilosa* mainly the soldiers and media workers, who are individuals that perform tasks outside the nests and are thus more exposed to predation and/or infection, and also the minima workers, who take care of the fungal culture, produce compounds that could play roles in alarm and/or defense.

1. Introduction

The mandibular glands of hymenopterans in general are paired structures located on each side of the head. These glands possess an excretory duct located at the internal surface of the mandible articulation, through which these glands release the secretion they produce.

The mandibular glands are part of the salivary system of insects, together with the salivary glands of the thorax, the post-pharyngeal glands, and the hypopharyngeal ones. The glands that compose the salivary system secrete important substances for the process of social regulation of the insects colony, particularly regarding the different roles performed by the castes. The study of the roles performed by the multiple exocrine glands in social insects is of the utmost importance, given that several biological process, such as feeding, female attraction, mating, communication, among others, depend directly on the products released by specific glands (Wilson, 1971). Among the glands of the salivary system, the mandibular glands are the ones that have strayed farther away from the role of feeding (Cruz-Landim, 1967).

Nedel (1960) performed histological studies in queens of *Apis mellifera* and observed that the glands of virgin queens presented a full reservoir while this reservoir was almost empty in mated queens, thus concluding that the secretion of the mandibular gland plays a role in sexual attraction during the mating flight.

Ultrastructural studies in ant workers of *Atta sexdens rubropilosa* performed by Pavon; Camargo-Mathias (2005) revealed the presence of three cellular types in the mandibular glands of these individuals: secretory cells, cells of the reservoir, and

extracellular canaliculi-forming cells. Among the cell types mentioned, the ones surrounding the reservoir and the ones forming the canaliculi appeared to be involved in the synthesis of the cuticle that coats the lumen of the canaliculi and the reservoir wall. The same study also revealed that two different cellular types produce the intra- and extra-cytoplasmic portions of the canaliculi. The secretory cell itself produces the intracellular portion while the extracellular portion is produced by special cells known as canaliculi-forming cells (Costa-Leonardo; Cruz-Landim, 1985).

Histochemical studies of the mandibular glands of worker ants of *A. s. rubropilosa* performed by Pavon; Camargo-Mathias (2004) evidenced the existence of acid lipids, acid and neutral polysaccharides, and proteins at the different parts of the gland. The authors concluded that the secretion produced by the mandibular glands of this species was lipoproteic in nature, thus strengthening the hypothesis that suggests a main role of alarm pheromone to the secretion it produces.

Therefore, the present study had the objectives of confirming through transmission electron microscopy what kind of element is produced by each mandibular gland cell or cell part of different castes of ants *A. s. rubropilosa*, as well as analysing the stored secretion in the reservoir. These analyses were carried out by employing the techniques of ultrastructural cytochemistry for the detection of proteins, lipids, and polysaccharides.

2. Materials and Methods

For the present study, minima, media and soldier worker of the ant *Atta sexdens rubropilosa* were collected from artificial nests kept in the laboratories of the *Centro de Estudos de Insetos Sociais* (CEIS) – at the UNESP, campus at Rio Claro, SP, Brazil.

2.1 Ultrastructural Cytochemistry

2.1.1 Detection of basic proteins:

The mandibular glands were fixed in 2.5% glutaraldehyde, 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; Meetz, 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 polysaccharides:

The material was prepared following the routine for transmission electron microscopy (TEM). Once sectioned using an ultramicrotome, the ultrathin sections of

the material were placed on gold meshes, letting the sections float on 1% periodic acid for 15 to 20 minutes. This treatment was followed by successive baths in acetic acid at the following concentrations: 10%, 5%, and 2%, for 10 minutes each. After three 10-minute washes in distilled water, the meshes with the material were transferred to a solution of 1% silver proteinate for 30 minutes in the dark at room temperature. Finally, the material was washed once in distilled water and observed through the transmission electron microscope, without contrasting the material, according to the method of Thiery (1967).

2.1.3 Detection of lipids:

The mandibular glands were fixed in 2,5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 hours. The material was then washed once in the same buffer and once in 0.1 M imidazole buffer, pH 7.5, for 10 minutes each. The material was post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M imidazole buffer, pH 7.5. Afterwards, the material underwent two more washes in buffer, followed by acetone dehydration, and then included in Epon resin, according to the method of Angermuller; De Fahimi (1982).

The ultrathin sections obtained were observed through the transmission electron microscope PHILIPS CM 100, without undergoing the contrast process.

3. Results

In order to obtain a better understanding and visualization, the results were arranged into Table 1 that shows the cytochemical site of the proteins, lipids and polysaccharides in the cells of all regions of the gland, including the secretions present in the lumen of the ducts, as well as inside the reservoir (Figs. 1, 2, 3; Table 1).

The proteins are found to be like granules strongly electrondense in all the regions of the cells and in all analysed castes (Fig. 1; Table 1), except inside the extracellular canaliculi of the media (Fig. 1L) and minima (Fig. 1M) workers and in the secretions that is in contact with the epithelium that overlays the reservoir of the minima workers (Fig. 1Q). However, high density is observed in the secretion that is in the region of the reservoir near to the secretory portion (Fig. 1P).

The lipids are present in all the analysed castes cells located in the cytoplasm of the secretory portion of the mandibular glands as electrondense droplets with an irregular border (Fig. 1; Table 1). It is interesting to highlight that the lipids from the secretory cells have a double origin, i.e., they are formed in the smooth endoplasmic reticulum (Figs. 2B, C, H, D, I) as well in the mitochondria, since the latter often show disorganized cristae and lipid droplets in its interior (Figs. 2A, E, F, G, L). Meanwhile, the presence of the lipids in the intra- and extracellular regions of the collector canaliculi and in the stored secretions inside the reservoir, was not detected (Figs. 2M, N, O, P, Q, R, S, T, U).

The polysaccharides as well the proteins and lipids are distributed all over the glands of three castes as dispersed granules (Table 1). The cells of the secretory portion

in all castes show high density in the test (Fig. 3), but on the collector canaliculi the polysaccharides are located only in the lumen of the intracellular canaliculi of the minima workers glands (Fig. 3M), and are absent in the same region of the other two castes (Figs. 3J, L). In the extracellular canaliculi of all castes, high density in the polysaccharides is detected (Figs. 3N, O, P). Inside the reservoir of the glands of the individuals of three castes, the secretion did not react to the test (Figs. 3R, S, T).

Table 1: Ultrastructural cytochemistry of proteins, lipids, and polysaccharides in the mandibular glands of the three worker castes of the ant *Atta sexdens rubropilosa*.

		Soldiers			Media workers			Minima workers		
		Proteins	Lipids	Polysaccharides	Proteins	Lipids	Polysaccharides	Proteins	Lipids	Polysaccharides
Secretory Cell	Peripheral Cytoplasm	- Positive reaction - Large amount of electrondense granulation of varying sizes (Fig. 1 E)	- Positive reaction - Presence of electrondense droplets of irregular borders originated in the mitochondria (Fig. 2 A) - Well developed smooth endoplasmic reticulum forming vesicles between elongated mitochondria (Figs. 2 B, H)	- Positive reaction - Presence of polysaccharides deposits in the shape of electrondense granules of varying sizes (Fig. 3 F)	- Positive reaction - Large amount of electrondense granules of varying sizes (Fig. 1 F)	- Positive reaction - Presence of a well-developed smooth endoplasmic reticulum (Fig. 2 C)	- Positive reaction - Presence of secretion granules formed by groups of numerous electrondense dots - Small dots dispersed throughout the cytoplasm (Figs. 3 G, H)	- Positive reaction - Large amount of electrondense granules of varying sizes (Fig. 1 G)	- Positive reaction - Presence of electrondense droplets originated in the mitochondria (Fig. 2 E)	- Positive reaction - Presence of polysaccharides deposits in the shape of electrondense dots of varying sizes (Fig. 3 I)
	Central Cytoplasm	- Positive reaction - Large amount of electrondense granulation of varying sizes (Figs. 1 A, B)	- Positive reaction - Presence of circular droplets of high electron density showing an homogeneous central matrix (Figs. 2 D, I) - Presence of a well-developed smooth endoplasmic reticulum forming vesicles (Figs. 2D, I) - Mitochondria distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2 D)	- Positive reaction - Large and numerous electrondense granules dispersed throughout the cytoplasm - Polysaccharides deposits in the cisterns of the endoplasmic reticulum (Figs. 3 A, B)	- Positive reaction - Large amount of electrondense granules of varying sizes (Fig. 1 C)	- Positive reaction - Presence of electrondense droplets of irregular borders originated in the mitochondria (Figs. 2 F, J)	- Positive reaction - Numerous electrondense granules of varying sizes dispersed throughout the cytoplasm (Fig. 3 C) and in the cisterns of endoplasmic reticulum (Fig. 3 E)	- Positive reaction - Large amount of electrondense granulation of varying sizes (Fig. 1 D)	- Positive reaction - Presence of electrondense droplets of irregular borders originated from the mitochondria, which are present in great numbers (Figs. 2 G, L)	- Positive reaction - Numerous electrondense granules of varying sizes dispersed throughout the cytoplasm (Fig. 3 D)
Extracellular Canaliculi	Intracellular Canaliculi	- Positive reaction - Electrondense granules surrounding the lumen of the canaliculi (Fig. 1 I)	- Negative (Fig. 2 N)	- Negative at the lumen of the canaliculi - Small electrondense dots over the microvilli (Fig. 3 J)	- Positive reaction - Electrondense granules surrounding the lumen of the canaliculi (Fig. 1 H)	- Negative (Fig. 2 O)	- Negative (Fig. 3 L)	- Positive reaction - Electrondense granules surrounding the lumen of the canaliculi (Fig. 1 J)	- Negative (Fig. 2 P)	- Positive reaction - Electrondense granules over the microvilli (Fig. 3 M)
	Secretion inside the lumen	- Positive reaction - Electrondense granules surrounding the lumen of the canaliculi (Fig. 1 N)	- Negative (Fig. 2M)	- Positive reaction - Homogeneous material found in the lumen of the canaliculi (Fig. 3 N)	- Negative (Fig. 1 L)	- Negative (Fig. 2 N)	- Positive reaction - Homogeneous material in the lumen of the canaliculi (Fig. 3 P) - Positive reaction at the excretory duct (Fig. 3 Q)	- Negative (Fig. 1 M)	- Negative (Fig. 2Q)	- Positive reaction - Homogeneous material in the lumen of the canaliculi (Fig. 3 O)
Reservoir	Secretion inside the lumen	- Positive reaction - Electrondense granules of varying sizes (Fig. 1 O)	- Negative (Fig. 2 S)	- Negative (Fig. 3 R)	- Positive reaction - Electrondense granules of varying sizes (Fig. 1 P)	- Negative (Fig. 2 T)	- Negative (Fig. 3 S)	- Negative reaction for the secretion found next to the epithelium of the reservoir (Fig. 1 Q) - Strong positive reaction for the secretion located next to the cells of the secretory portion (Fig. 1 G)	- Negative (Fig. 2 U)	- Negative (Fig. 3 T)

Figures

Figura 1

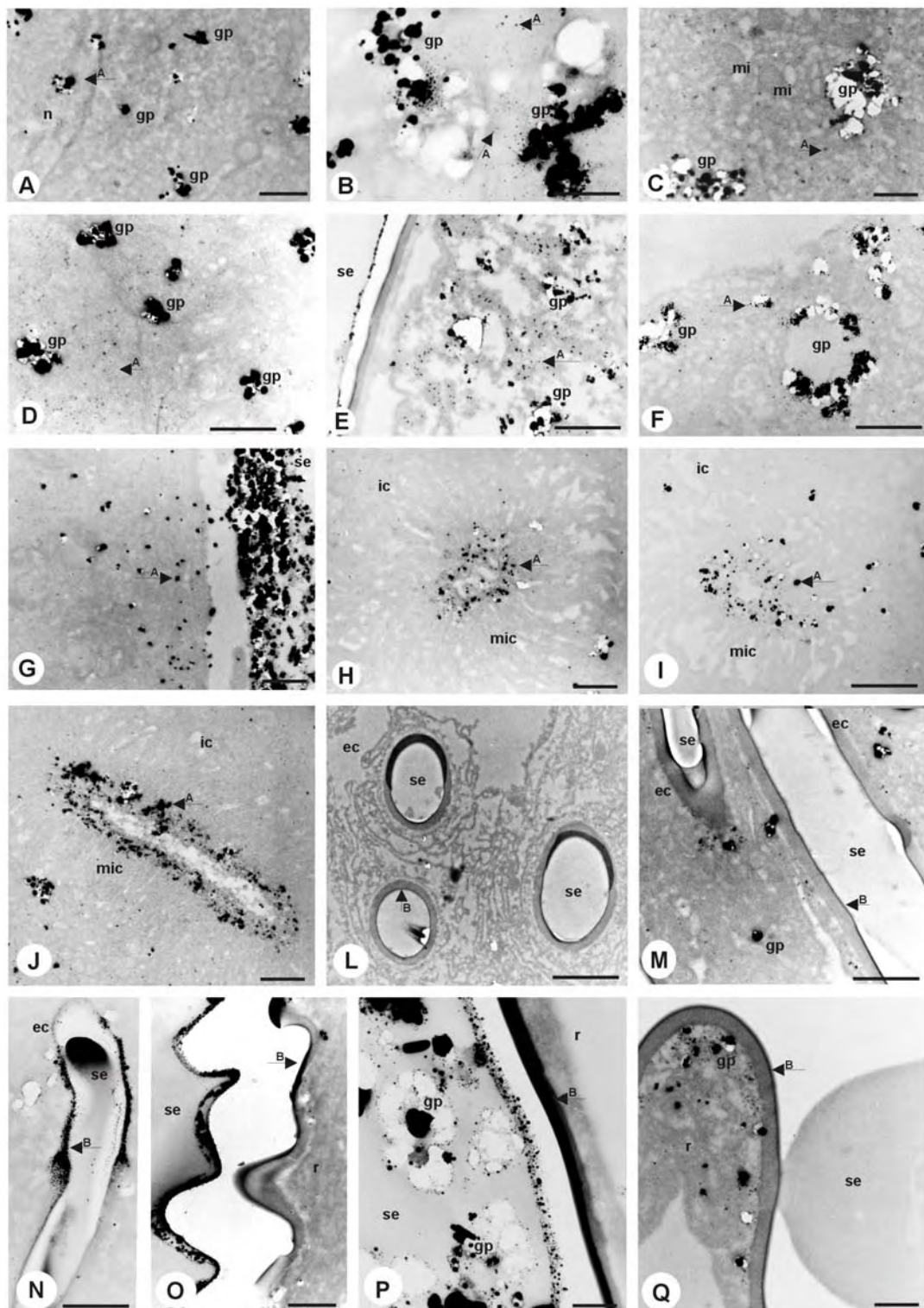


Figure 1: Detection of proteins in the mandibular glands of worker ants of *Atta sexens rubropilosa*. **A, B, C, D)** Secretory portion: central cytoplasm. **A)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **B)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **C)** Medium worker – Scale bar: 0,5 μm ; **D)** Minima worker – Scale bar: 0,5 μm ; **E, F, G)** Secretory portion: peripheral cytoplasm. **E)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **F)** Medium worker – Scale bar: 1 μm ; **G)** Minima worker – Scale bar: 0,5 μm ; **H, I, J)** Secretory portion: Intracytoplasmic canaliculi. **H)** Medium worker – Scale bar: 0,5 μm ; **I)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **J)** Minima worker – Scale bar: 0,5 μm ; **L, M, N)** Extracytoplasmic canaliculi. **L)** Medium worker – Scale bar: 2 μm ; **M)** Minima worker – Scale bar: 1 μm ; **N)** Soldier – Scale bar: 0,5 μm ; **O, P, Q)** Reservoir. **O)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **P)** Medium worker – Scale bar: 0,5 μm ; **Q)** Minima worker – Scale bar: 0,5 μm . n: nucleus; gp: protein granules; arrow A: protein granules; mi: mitochondria; se: secretion, ic: intracytoplasmic canaliculi; mic: microvilli; ec: extracytoplasmic canaliculi; arrow B: cuticle; r: reservoir.

Figura 2

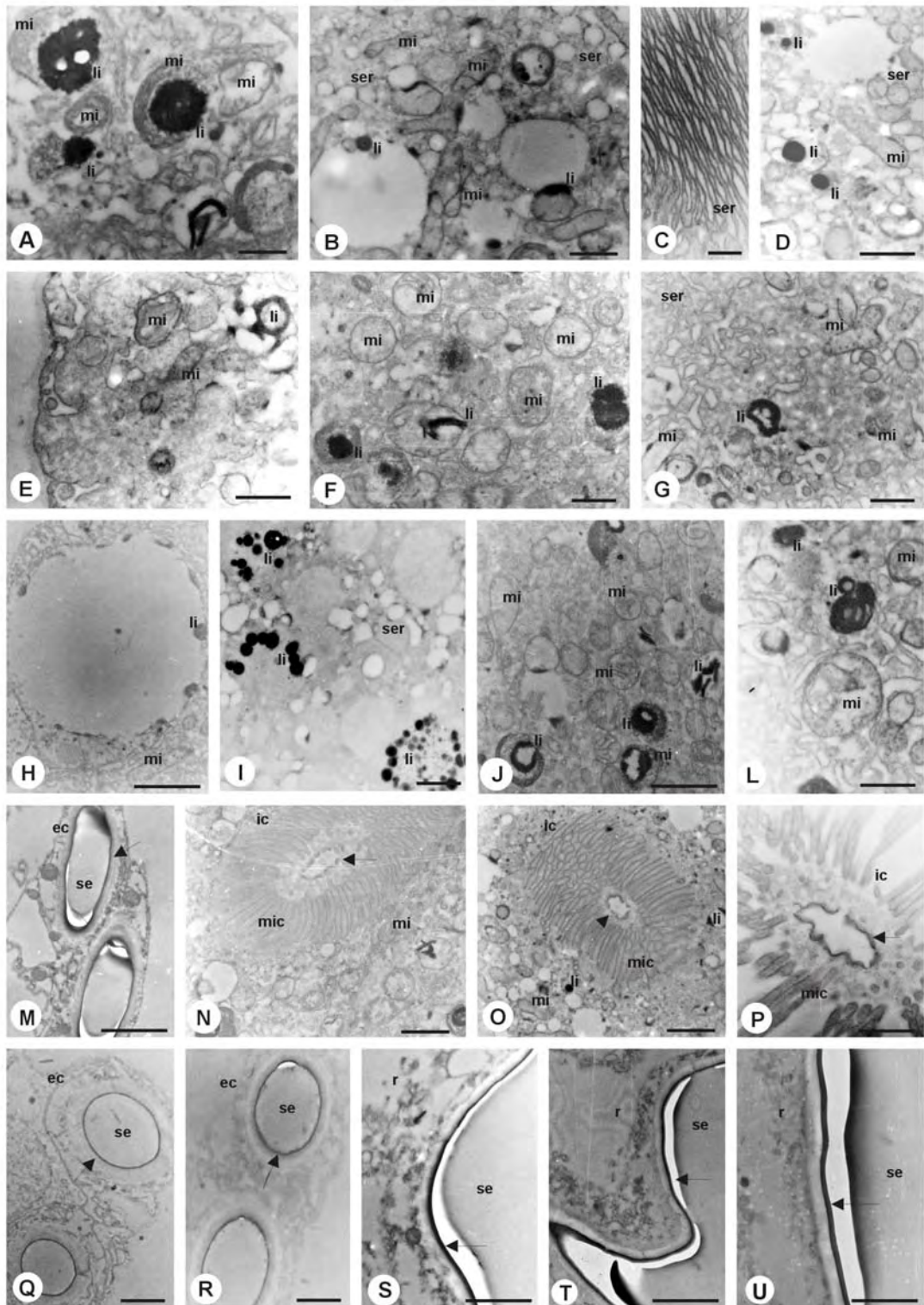


Figure 2: Detection of lipids in the mandibular glands of worker ants of *Atta sexdens rubropilosa*. **A, B, C, E)** Secretory portion: peripheral cytoplasm. **A, B)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **C)** Medium worker – Scale bar: 0,25 μm ; **E)** Minima worker – Scale bar: 1 μm ; **D, F, G)** Secretory portion: Central cytoplasm. **D)** Soldier: 1 μm . **F)** Medium worker – Scale bar: 0,5 μm ; **G)** Minima worker – Scale bar: 2 μm ; **H, I, J, L)** Lipid granules. **H)** Soldier – Scale bar: 0,5 μm ; **I)** Soldier – Scale bar: 0,5 μm ; **J)** Medium worker – Scale bar: 1 μm ; **L)** Minima worker – Scale bar: 1 μm ; **N, O, P)** Secretory portion: Intracytoplasmic canaliculi. **N)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **O)** Medium worker – Scale bar: 1 μm ; **P)** Minima worker – Scale bar: 1 μm ; **M, Q, R)** Extracytoplasmic canaliculi. **M)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **Q)** Minima worker – Scale bar: 0,5 μm ; **R)** Medium worker – Scale bar: 0,5 μm ; **S, T, U)** Reservoir. **S)** Soldier – Scale bar: 1 μm ; **T)** Medium worker – Scale bar: 1 μm ; **U)** Minima worker – Scale bar: 1 μm . li: lipids; mi: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticule; se: secretion; ec: extracytoplasmic canaliculi; arrow: cuticle; ic: Intracytoplasmic canaliculi; mic: microvilli; r: reservoir.

Figura 3

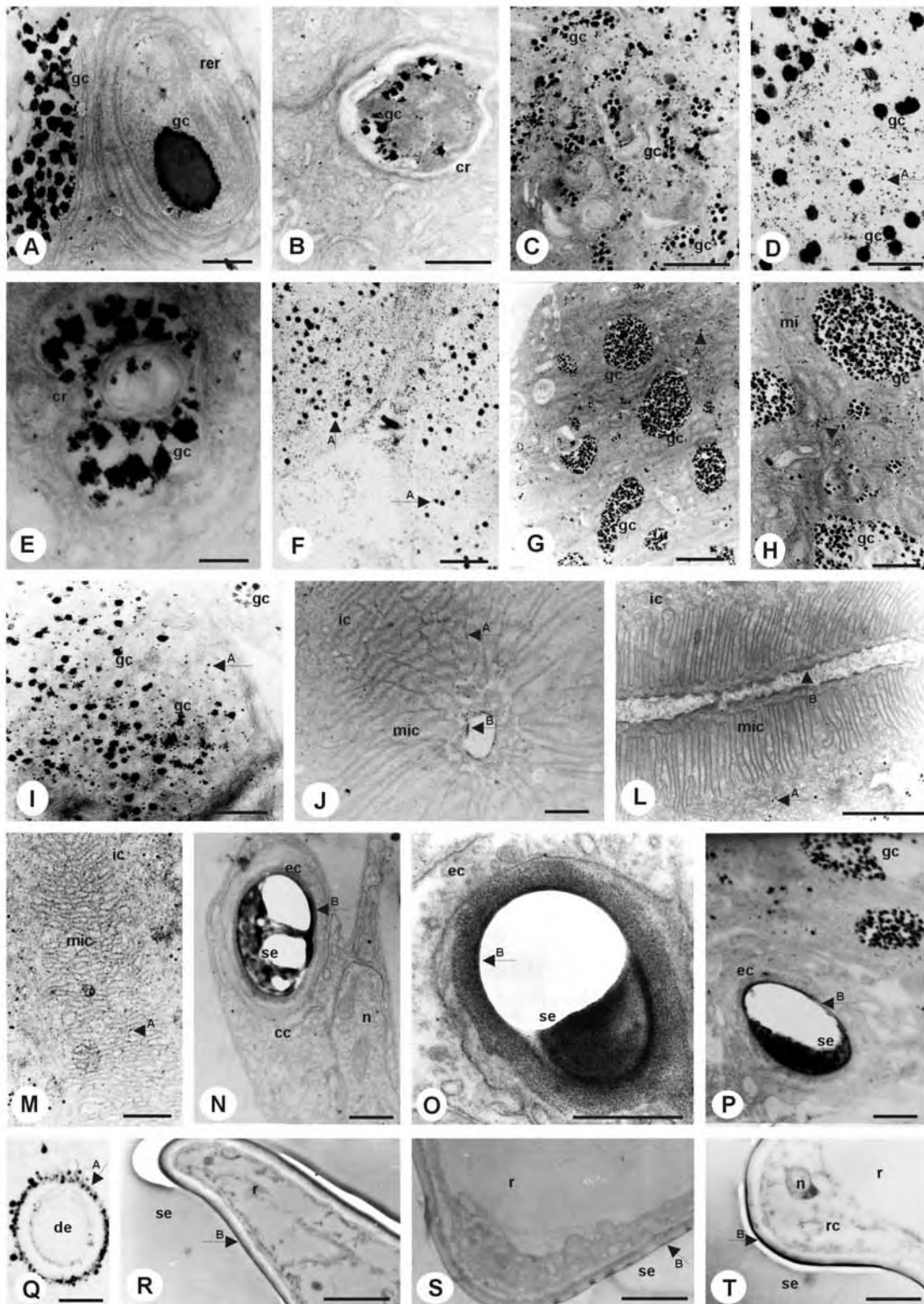


Figure 3: Detection of polysaccharides in the mandibular glands of worker ants of *Atta sexdens rubropilosa*. **A, B, C, D, E)** Secretory portion: Central cytoplasm. **A)** Soldiers – Scale bar: 2 μm ; **B)** Soldiers – Scale bar: 0,5 μm ; **C)** Medium workers – Scale bar: 0,5 μm ; **D)** Minima workers – Scale bar: 0,25 μm ; **E)** Medium workers – Scale bar: 2 μm ; **F, G, H, I)** Secretory portion: peripheral cytoplasm. **F)** Soldiers – Scale bar: 1 μm ; **G)** Medium workers – Scale bar: 1 μm ; **H)** Medium workers – Scale bar: 0,5 μm ; **I)** Minima workers – Scale bar: 1 μm ; **J, L, M)** Secretory portion: intracytoplasmic canaliculi. **J)** Soldiers – Scale bar: 0,5 μm ; **L)** Medium workers – Scale bar: 0,5 μm ; **M)** Minima workers – Scale bar: 1 μm ; **N, O, P)** Extracytoplasmic canaliculi. **N)** Soldiers – Scale bar: 0,5 μm ; **O)** Minima workers – Scale bar: 0,25 μm ; **P)** Medium workers – Scale bar: 0,5 μm ; **Q)** Medium workers – Scale bar: 0,5 μm ; **R, S, T)** Reservoir. **R)** Soldiers – Scale bar: 1 μm ; **S)** Medium workers – Scale bar: 1 μm ; **T)** Minima workers – Scale bar: 1 μm . gc: polysaccharides granules; rer: rough endoplasmic reticule; cr: reticule cistern; arrow A: polysaccharides granules; mi: mitochondria; ic: intracytoplasmic canaliculi; mic: microvilli; arrow B: cuticle; ec: extracytoplasmic canaliculi; se: secretion; cc: canaliculi cell, n: nucleus; de: excretory duct; r: reservoir; rc: reservoir cell.

4. Discussion

The relevance of the study of the mandibular glands of ants has been emphasized due to the fact that its products are of great importance to the processes of social regulation of the colonies, as well as interferes in the tasks performed by the individuals of the different castes.

Previous histochemical studies for the detection of lipids performed on the mandibular glands of the three worker castes of *Atta sexdens rubropilosa* (Pavon; Camargo-Mathias, 2004), showed the presence of lipids, mainly at the secretory portion of the glands. These results were confirmed by the ultrastructural cytochemical analysis obtained in this work, with lipids being found in the form of droplets in the cytoplasm of the secretory cells.

These lipid droplets showed different morphologies and locations, such as next to tubules of smooth endoplasmic reticulum and inside mitochondria, with these organelles being widely distributed throughout the cytoplasm of the secretory cells. The observation of lipids associated to the mitochondria of the mandibular gland had already been reported by Pavon; Camargo-Mathias (2005) when these glands were analyzed at the ultrastructural level in the individuals of this species of ants.

Caperucci; Camargo-Mathias (2006) studied the ovaries of workers and queens of the ant *Neoponera villosa* and reported that this type of association was frequent in these organs and suggested that in the ovaries of these individuals, the lipids found in the yolk would also originate in the mitochondria. Caetano, et al. (2002a) analyzed the post-pharyngeal glands of *Dinoponera australis* and reported some modifications of the

mitochondria, thus attributing to these organelles the function of lipid production and denominating them as derived mitochondria. Abdalla; Cruz-Landim (2005) also evidenced mitochondria storing lipid materials in their inside when analyzing the ultrastructure of the Dufour gland of *Scaptotrigona postica*.

Therefore, the data of the present study show that the lipids present in the mandibular gland of the three worker castes of the ant *A. s. rubropilosa* would have at least two different sources: the smooth endoplasmic reticulum and the mitochondria of the secretory cells.

With the exception of the secretory cells of the mandibular glands of the individuals of the three worker castes of *A. s. rubropilosa*, lipids were not found at any other region of the mandibular glands analyzed, at least not in amounts significant enough to be detected. The regions lacking lipids were the lumen of the intra and extra-cytoplasmic canaliculi, and the secretion stored inside the reservoir.

Previous histochemical studies performed on the mandibular glands of the species in question (Pavon; Camargo-Mathias, 2004) also revealed the presence of polysaccharides in these organs; these results were also confirmed through the ultrastructural cytochemical analysis presented here. Polysaccharides were detected in the shape of an electrondense granulation at the secretory portion of the mandibular glands in the three castes studied. However, we did not detect polysaccharides in the lumen of the intracellular canaliculi, of either soldiers or media workers, nor in the secretion stored in the reservoir of the three worker castes.

The fact of having observed the presence of polysaccharides deposits at the cisterns of endoplasmic reticulum of the secretory cells of the mandibular glands of

soldiers and media workers of *A. s. rubropilosa* could indicate that the addition of sugars to other type of macromolecules, such as proteins and/or lipids, could be occurring also in this organelle.

Pavon; Camargo-Mathias (2004) studied the histochemical properties of the mandibular glands of the individuals of the three worker castes of *A. s. rubropilosa* and also evidenced the presence of proteins in the cells of the secretory portion of the mandibular glands. This result was confirmed by the ultrastructural cytochemical analyses, which revealed the presence of proteins in the shape of an electrondense granulation of varying sizes depending on the region of the gland under consideration: secretory cells, intra- and extracellular canaliculi, or reservoir. Specifically in the minima and media workers, the extracytoplasmic canaliculi failed to react consistently to this test. Nevertheless, the secretion stored inside the reservoir always showed a positive reaction to the test for proteins.

In the same work, Pavon; Camargo-Mathias (2004) analyzed the protein profile of the mandibular glands of the individuals of the three worker castes of *A. s. rubropilosa* through the evaluation of total protein content and denaturing gel electrophoresis. These authors showed that the total protein content, as well as the number of polypeptides, present in the mandibular glands of the different castes obeys a progressive order relating the size of the individuals to the tasks they perform inside the colony. Therefore, the soldiers, who perform tasks outside the nest such as foraging and excavation, but also aid in the communication and defense of the colony, presented the highest amount of different proteic elements in the secretion found in the reservoir of the mandibular glands of this ant species. The media workers, which have been classified as generalist given

that they perform tasks inside the nest but also cut, transport, and maintain viable the fungal cultures, presented a slightly lower protein content but higher than that of the minima workers, the latter known as gardeners because they perform tasks related to the culture of the fungus inside the nest and also aid in brood care.

The results of the present study suggesting that the final product secreted by the mandibular glands of the individuals of the three worker castes of *A. s. rubropilosa* is composed by lipids, polysaccharides, and proteins, the latter probably in the form of enzymes that may be involved in bactericidal and/or fungicidal functions. These results thus corroborate previous studies of other ants glands like the metapleural ones of other ants of the Attini tribe showing the participation of proteins in the final secretion of this gland (Do Nascimento et al., 1996), which would be involved in the production of substances related to maintaining the antiseptic condition of the colony, as well as in the production of substances that would aid the fungal growth (Caetano et al., 2002b).

The present study has shown that the mandibular glands of the individuals of the three worker castes of *A. s. rubropilosa* mainly the soldiers and media workers, who are individuals that perform tasks outside the nests and are thus more exposed to predation and/or infection, and also the minima workers, who take care of the fungal culture, produce compounds that could play roles in alarm and/or defense. Moreover, it is possible that the mixture of these compounds would be important in order to perform the different tasks efficiently, thus rendering the information more precise by means of coordinated chain reactions.

5. References

- Abdalla, F.C.; Cruz-Landim, C. (2005). Ocorrência, morfologia e ultra-estrutura da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Meliponini). Neotrop. Entomol. 34(1): 47-57.
- Angermüller, S.; Fahimi, D.H. (1982). Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. Histochem. J. 14: 823-825.
- Caetano, F.H.; Zara, F.J.; Gregório, E.A. (2002a). The origin of lipid droplets in the post-pharyngeal gland of *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae). Cytologia. 67: 301-308.
- Caetano, F.H.; Jaffé K.; Zara, F.J. (2002b). Formigas: Biologia e Anatomia. Ed. Topázio. Araras, S.P. 131p.
- Caperucci, D.; Camargo-Mathias, M.I. (2006). Lipids in oocytes of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). Sociobiology. 47(2): 531-542.
- Costa-Leonardo, A.M.; Cruz-Landim, C. (1985). Aspectos ultra-estruturais das glândulas mandibulares de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Rev. Brasil. Biol. 45(1/2), 21-31.
- Cruz-Landim, C. (1967). Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. Arq. Zool. 15: 177-290.
- Do Nascimento, R.R.; Schoeters, E.; Morgan, E.D.; Billen, J.; Stradling, D.J. (1996). Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). J. Chem. Ecol. 22(5): 987-1000.

Macrae, E.K.; Meetz, G.D. (1970). Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. *J. Cell Biol. New York*, 45(3): 235-245.

Nedel, J.O. (1960). Morphologie und Physiologie der Mandibeldrüse einiger Bienen-Arten (Apidae). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, (49): 139-183.

Pavon, L.F.; Camargo-Mathias, M.I. (2004). Histochemistry and protein profile of the mandibular glands of workers of the ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Cytologia*. 69(2): 225-234.

Pavon, L.F.; Camargo-Mathias, M.I. (2005). Ultrastructural studies of the mandibular glands of the minima, media and soldier ants of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae). *Micron*. 36(5): 449-460.

Thiery, J.P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopic*. (6): 987-1018.

Wilson, E.O. (1971). *The insect societies*. The Belknap Press. Harvard Univ. 548p.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian research agency FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), Grant N°. 03/00553-8. We are grateful to Antonio T. Yabuki, Monika Iamonte and Cristiane Márcia Mileo for the technical support.

Capítulo 5

4.5 Capítulo 5: Trabalho submetido para publicação no periódico *Behavioral Ecology and Sociobiology*.

Title: Analysis of the Differential Gene Expression, by the DD-RTPCR technique, of workers *Atta sexdens rubropilosa* mandibular glands (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae).

Autores: Lorena Favaro Pavon¹, Maria Izabel Camargo Mathias², Flávio Vieira Meirelles³ e Maurício Bacci Júnior⁴.

1,2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências, Departamento de Biologia – Laboratório de Biologia Molecular – Toxinas de Insetos, Bioluminescência e Biofotônica.

3 – Universidade de São Paulo – USP – Pirassununga – SP / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciências Básicas - Laboratório de Morfo-Fisiologia Molecular e Desenvolvimento.

4 - Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS).

Resumo: A técnica *Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (DD-RTPCR) vem tornando-se cada vez mais eficaz para isolar e caracterizar genes diferencialmente expressos em diferentes partes de um mesmo indivíduo, sendo aqui utilizada, pela primeira vez, no estudo das glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa*. No presente estudo,

o perfil de expressão de bandas (transcritos), permitiu agrupar em *A. s. rubropilosa*, os produtos da amplificação em três classes distintas. Os fragmentos gênicos da classe I corresponderam, provavelmente, aos chamados genes constitutivos, os quais estariam associados aos processos metabólicos das glândulas mandibulares. Os fragmentos gênicos da classe II, seriam aqueles que provavelmente, codificariam produtos que seriam mais importantes em determinados estágios do que em outros, o que poderia estar relacionado com as tarefas que os indivíduos das diferentes castas desempenhariam na colônia. Os fragmentos gênicos da classe III, provavelmente, são casta-específicos e foram denominados de transcritos 1, 2 e 3 encontrados respectivamente nas glândulas mandibulares dos soldados (T1), operárias médias (T2) e mínimas (T3). O T1 apresentou similaridade com a proteína precursora da hialuronidase em vespas *Polistes anullaris*, o T2 com a proteína carreadora de fosfato encontrado em *Apis mellifera* e o T3 com a proteína ribossomal mitocondrial também de *A. mellifera*. Assim, o presente estudo, além de evidenciar a ocorrência de expressão gênica diferencial entre as glândulas mandibulares das três castas de *A. s. rubropilosa*, demonstrou que a técnica DD-RTPCR pode ser mais uma ferramenta a ser utilizada nas análises da expressão gênica, podendo inclusive estabelecer, nos insetos, relações intra e inter castas.

Palavras-Chave: formigas, glândula mandibular, expressão gênica, transcritos, DD-RTPCR.

Title: Analysis of the Differential Gene Expression, by the DD-RTPCR technique, of workers *Atta sexdens rubropilosa* mandibular glands (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae).

Running head: Study of the gene expression of the mandibular glands of *Atta sexdens rubropilosa*.

Key words: *Atta sexdens rubropilosa*, mandibular glands, gene expression, transcripts, DD-RTPCR.

Authors: Lorena Favaro Pavon¹, Maria Izabel Camargo Mathias², Flávio Vieira Meirelles³ e Maurício Bacci Júnior⁴.

1,2 – Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências, Departamento de Biologia – Laboratório de Biologia Molecular – Toxinas de Insetos, Bioluminescência e Biofotônica.

3 – Universidade de São Paulo – USP – Pirassununga – SP / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciências Básicas - Laboratório de Morfo-Fisiologia Molecular e Desenvolvimento.

4 - Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro - SP / Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS).

Corresponding author - E-mail address: micm@rc.unesp.br

Tel/Fax: 055-19-3524-0009

Abstract: The DD-RTPCR technique is becoming more efficient nowadays to isolate and characterize genes differentially expressed among cells, tissues or individuals, being used here, for the first time in the study of mandibular glands of minima and media workers and soldiers of the ant species *Atta sexdens rubropilosa*. The expression profile of bands (transcripts), obtained in the present study, permitted the grouping of gene fragments into three distinctive classes. Class I fragments corresponded with those called constitutive genes, which could be associated with the metabolic processes of the mandibular glands. Class II could be the ones that would be codifying more important products in more specific stages than in others, related to the tasks performed in the colony by individuals of different castes. Class III gene fragments (transcripts 1, 2 and 3) must be caste-specific and they were found in the mandibular glands of soldiers (T1), media workers (T2) and minima workers (T3), respectively. Therefore the present study, besides having highlighted the differential gene expression in the mandibular glands of individuals of three castes of *A. s. rubropilosa*, demonstrated that the DD-RTPCR technique can be one more tool to be used in gene expression analysis, including establishing intra and inter-caste relations in insects.

1. Introduction

1.1 Technical fundamentals of *Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DD-RT-PCR)* in the study of gene expression:

The superior organisms contain around 100.000 different genes from which only 10.000-15.000 are expressed in the cell. The choice of the genes that will be expressed is what determines the biological processes such as: development, homeostasis, stimuli response, cell regulation, etc. (MANNIATIS et al., 1987). This way, comparisons of the gene expression in the different cell or tissue types, provide useful information in the understanding of such biological processes.

Due to the differentiated activity of gene expression, in several cells or tissues, the identification and isolation of the gene has been difficult, considering that their activities are reflected in the types and quantities of their mRNA species and proteins (LIANG et al., 1995).

Many methods used to distinguish the mRNA are associated with subtractive hybridization techniques (LIANG; PARDEE, 1992). However, these techniques are not very sensitive and are difficult to perform, in addition to recovering genes in incomplete form and not identifying rare mRNA.

The DDRT-PCR technique has been widely used in studies that involve comparison between gene expression patterns. It is a powerful tool to detect genes that express differentiation between the cells, tissues, individuals or different development

stages, or even genes expressed differentially in embryogenesis, cancer, diabetes, cerebral development and others (WARTHOE et al., 1995).

The DDRT-PCR methodology was described by Liang et al. (1992) to identify genes differentially expressed among the 15.000 mRNA species, in two populations of breast cells. Later, the technique was named DDRT-PCR in accordance with the terminology of polymerase chain reaction – PCR (BAUER et al., 1993).

DD-RTPCR is a method based in PCR that allows systematic comparisons of expressed mRNA in the cells. This method consists of reverse transcription (RT-PCR) of a mRNA population of samples studied using anchored primers that surround the mRNA poly-A tail and, in the subsequent PCR amplification of cDNA, with an anchored primer and an arbitrary one. After amplification, the fragments are usually separated by electrophoresis, then the bands that will be differentially expressed are taken from the gel, reamplified, cloned, sequenced and analysed with the help of *GenBank*. The general scheme of the process is represented in Figure 1.

The DD-RTPCR technique compared to subtractive hybridization is fast and more sensitive (ALVES et al., 1998).

DD-RTPCR

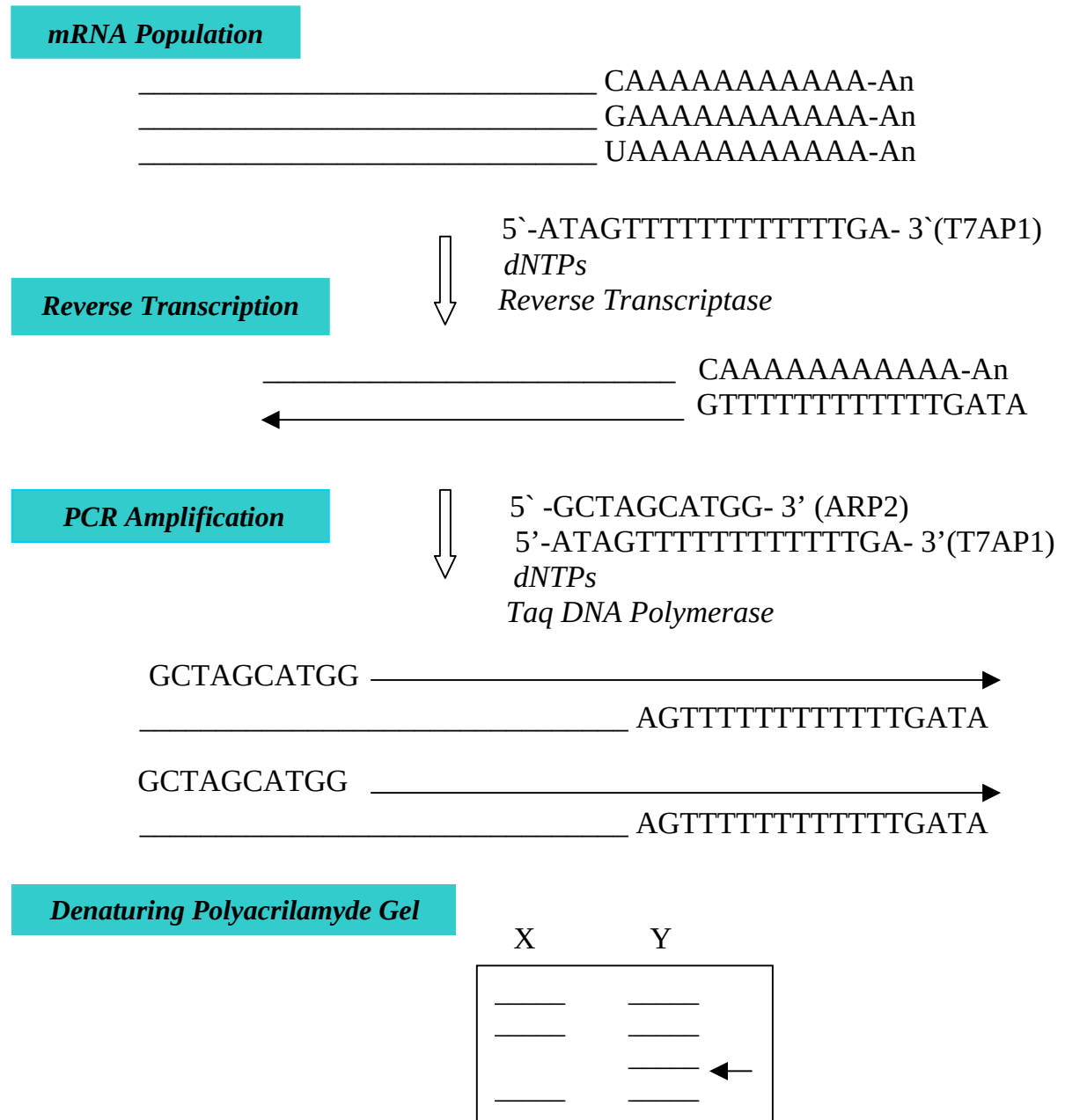


Figure 1: Schematic diagram of the DDRT-PCR technique. The first step of the process is the total RNA extraction followed by the mRNA reverse transcription to cDNA. The mRNAs are converted into cDNA by the reverse transcriptase enzyme and by an oligo-dT primer. The next step is the amplification of a subgroup of cDNAs inside the pool with the same oligo-dT primers used for the reverse transcription and a 10-base arbitrary primer as a secondary primer. The products are separated by size, in denaturing polyacrilamde gel. The band pattern is analyzed and the candidate bands to be differentially expressed are excised from the gel, purified, cloned and sequenced. T7AP1: anchored primer, ARP2: arbitrary primer, gel arrow: candidate gene to be differentially expressed.

1.2 Study of gene regulation by the DD-RTPCR technique in social insects:

Among the social insects, the study of gene expression has been performed with bees, aiming at gender and caste determination, metabolic ways related to the ontogenesis or even mechanisms of the division of labour.

Studies of caste determination, in *Apis mellifera* larvae, were conducted by Evans; Wheeler (1999). The initial results showed 8 gene sequences differentially expressed in the queens and workers of the fourth larval instar. Two genes appeared in larger quantities in the workers, showing great similarity to the crystalline-lambda protein and one group of proteins present in the fat body of other holometabolous insects. Only three genes that were present in the queens were similar to the oxiaacyl-reductase enzyme and with proteic factors of transcription.

In the development of queens and workers of *A. mellifera*, analysis demonstrated the presence of numerous genes being differentially expressed in both castes (EVANS; WHEELER, 1999). Two of them are potentially promising in the regulation of caste differentiation. The result clearly denoted that the process of caste determination in *Apis* involves the activation of specific genes in accordance with each caste.

Analysis of the caste-specific gene expression were also performed in termites by Miura et al. (1999), using the mandibular glands of soldiers of *Hodotermopsis japonica*. The results showed the presence of one gene functioning especially in the mandibular glands of soldiers, and the expressed protein could function in the regulation of the differentiation of caste or even as an alarm pheromone.

1.2.1 The division of labour between the castes of *A. s. rubropilosa* and the role of the mandibular glands in the workers:

The ants divide their tasks inside the colony. The ant nest population is composed of individuals that are morphologically different (polymorphism), in accordance to the labour or role that they perform in the colony (polyethism).

In the literature 29 tasks are described (task = determined sequence of acts with a specific purpose) that are performed by the castes of this species (WILSON, 1980), and they are classified as follows:

- a) Gardeners or “sitters”, smaller individuals, with a head measuring between 0,8 to 1,0 mm. They take care of the offspring inside the nest, besides “piggy-backing” with the larger foraging workers over the vegetal material that is being transported.
- b) Generalists, workers of intermediary size, with a head measuring around 1,4 mm. They work inside the nest degrading the vegetation before its incorporation in the fungus garden. They transport other workers, help the offspring during ecdysis or moulting, take care of the queen, discard the waste and also rebuild the fungus sponge.
- c) Foragers and excavators, bigger than the generalists, with a head measuring between 2,0 to 2,2 mm. They collect and cut the new vegetation, besides excavating the nest.
- d) Soldiers or defenders, bigger individuals, with a head measuring around 3,0 mm. They act in defending the nest.

The adult workers change their activities as they age, from being sitters to foraging, and many of these changes are followed by alterations to their exocrine glands (DELLA LUCIA, 1993).

The present study analysed the differential gene expression of mandibular glands of minima and media workers, and soldiers of *A. s. rubropilosa*, by the DD-RTPCR technique already performed in other Hymenoptera, in trying to detect possible differences in the gene expression of the mandibular glands of the three castes and also trying to establish relationships with the different tasks that these individuals perform in the colony.

2. Material and Methods

The present study was conducted in the Molecular Morpho-Physiology and Development Laboratory of Zootechnia and Food Engineering Faculty of USP (São Paulo University) – Pirassununga – SP, Brazil, under the supervision of Dr. Flávio Vieira Meirelles.

2.1 Total RNA Dosage

2.1.1 Material collection for extraction of total RNA:

The mandibular glands of minima and media workers, and soldiers of ants *A. s. rubropilosa* were removed and placed in a physiological solution for insects (NaCl, KH_2P_4 , NaHPO_4 , pH 7.2) containing DEPC-treated water, making sure that the gloves and the tools were also DEPC-treated to avoid any contamination with RNAses in the environment. The glands were placed in sterile eppendorfs (RNase free), containing 500µL of Trizol (Trizol®, Life Technology, Gaithersburg, MD USA) and kept in ice during the whole process. After that, around 50 mandibular glands of each caste were placed in eppendorfs that were stored in a freezer at – 80 °C, until the RNA extraction.

2.1.2 Extraction of total RNA with trizol:

The eppendorfs containing the homogenized material in trizol were placed in ice for a slow thaw. Using sterile tools, DEPC-treated water, the material was homogenized and the glandular tissue was dissolved.

After that, 100µL of DEPC-treated water were added to the eppendorfs, and the solution was quickly homogenized in the vortex. These eppendorfs were then incubated for 5 minutes at room temperature, for a complete dissolution of the nucleoproteins of the material and 100µL of chloroform were added and the eppendorfs were shaken for 15 seconds and then incubated for 2-3 min at room temperature. The samples were centrifuged at 4°C (1200xg) for 15 minutes. The supernatant (aqueous), where the RNA was found, was transferred to a new tube. The lower portion or organic phase contained the RNA and proteins.

After the phase separation, the next step was the RNA precipitation, with 500µL of isopropilic alcohol added to the aqueous phase. They were incubated for 10 minutes at room temperature, and then centrifuged at 1200xg for 10 minutes at 4°C. The precipitated RNA, frequently invisible before, formed a pellet similar to a gel at the bottom of the tube.

The supernatant of each sample was carefully discarded and the RNA pellet was washed with 500µL of 75% ethanol using a micropipette, until it detached from the tube. The sample was treated in the vortex at 7500xg for 5 minutes (4°C). The supernatant was then discarded and the pellet dried at room temperature for 5-10 minutes. Before the complete drying of the pellet, 20µL of 0.01% of DEPC-treated water were added to the sample which was incubated for 15 minutes in room temperature, for a complete dissolution of the pellet.

2.1.3 Total RNA dosage extracted from the samples:

The quantification of the total RNA of the three castes of ants *A. s. rubropilosa*, was performed in a spectrophotometer using a quartz cuvette, with a wavelength of 260nm. Ten μL of the total RNA solution were added in 990 μL DEPC-treated water (dilution factor 100). The following formula was utilized to determine the quantification of the total RNA:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/mL}] = \text{Absorbancy (260nm)} \times 40 \times \text{Dilution Factor}$$

2.2 Total RNA Electrophoresis:

For the preparation of the 1% agarose denaturing gel with formaldehyde, all the material was previously sterilized and DEPC-treated. Initially, 0,6g of agarose was dissolved in 22,8mL of 0.01% DEPC-treated water (in a microwave oven), adding, 12mL of 5X TBE buffer plus 10,8mL of 2,2M formaldehyde afterwards. This solution was placed in an electrophoresis horizontal tank, previously DEPC-treated, and the polymerized gel was covered with a running buffer and subjected to a 5 minutes pre-run at 60V before the sample was applied.

Meanwhile, samples of the glands to be applied in the gel were prepared as follows: 9 μL of the sample + 3 μL of the sample buffer (50% glycerol, EDTA 1 mM, 0.25% bromophenol-blue and 0.25% xylene-cyanol). These samples were heated for 15 minutes at 65°C, with the purpose of linearizing the RNA ribbons, and immediately placed in ice to keep the ribbons linearized.

The samples were then placed in the wells and the running took place at 60V, for 45 minutes. Later, the gel was stained in a tray containing ethide bromate (12µL at [10mg/mL], diluted in 1X TBE (200mL) and analyzed using an UV transilluminator for visualization and registry of rRNA bands. These bands were present in larger quantities and displayed low diversity (rRNA 28S and 18S), producing visible bands.

2.3 RT-PCT (Reverse transcriptase polymerase chain reaction):

For this reaction, the anchored primer T7AP1 which contains a group of 12dT's that allow the curling of the poly tail (A) of the mRNA during the cDNA ribbon generation was used. A combination of two bases (GA) was added to the 3' portion of the anchor primer T7AP1 ('AATACGACTCACTATAGTTTTTTTTTTTTTGA'), to subdivide the mRNA which is transcript-reverse in the cDNA reaction.

After that, samples containing 9µL total RNA (mandibular gland of soldiers, media and minima workers) and 1µL of anchor primer T7AP1 (5µM) were prepared and heated at 70° C, for 5 minutes, in a thermocycler and then stored at 4°C for 5 minutes, 20µL of the Mix (4µL 5X Buffer, 2µL of 0.1% DTT, 2µL dNTP (205µM) and 1µL of RNase out) were added to the samples. After 5 minutes at 4°C, 1µL of the Superscript III enzyme (reverse transcriptase) was added and left for 5 minutes at 42°C, followed by 50 minutes at 50°C, and then after 15 minutes at 70°C, the mRNA were converted into cDNAs (simple ribbons).

2.4 Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DD-RTPCR):

The anchor primer T7AP1 TAMRA was used combined with 3 arbitrary primers ARP2, ARP3, ARP5, totalling 3 possible combinations (C1, C2, C3), as shown in Table 1. The anchor primer was marked with fluorescent pigment (TAMRA fluorophore), which allowed the visualization of the amplified fragments without the use of radio-isotopes.

The anchor and arbitrary primers were drawn and given by the researchers of the Molecular Morpho-Physiology and Development Laboratory of the Zootechnia and Food Engineering Faculty of USP (São Paulo University) – Pirassununga – SP, as follows:

T7AP1 TAMRA: AATACGACTCACTATAG

ARP2: GCTAGCATGG

ARP3: GACCATTGCA

ARP5: ATGGTAGTCT

Table 1: Anchor primer T7AP1 and arbitrary primer ARPs combinations (C1, C2, C3).

<i>Primers</i>	ARP2	ARP3	ARP5
T7AP1	C1	C2	C3

The DD-RTPCR technique was performed, as described in Table 2, in triplicate reactions in the cDNAs samples of mandibular glands of workers minima, media and soldiers of ants *A. s. rubropilosa*. All the obtained amplifications were verified in 1.5% agarose gel before following the 6% DDPCR denaturing polyacrilamyde gel protocol.

Table 2: DDPCR technique protocol (Home Run).

Home Run 1		
1° MIX		10 cycles
Water	2,71 µL	95°C 2 minutes
TP 10X	1,00 µL	
MgCl ₂ (1,0mM)	0,20 µL	92°C 15 seconds
dNTP (250µM)	2,00 µL	42°C 30 seconds
Arbitrary primer (5µM)	1,33 µL	72°C 2 minutes
T7 marked primer (5µM)	1,33 µL	
Taq	0,10 µL	72°C 10 minutes
cDNA	1,33 µL	4°C
Total	10 µL	
Home Run 2		
2° MIX		25 cycles
Water	2,44 µL	95°C 2 minutes
TP 10X	1,00 µL	
MgCl ₂ (3,5mM)	1,80 µL	92°C 15 seconds
dNTP (250µM)	2,00 µL	42°C 30 seconds
Arbitrary primer (5µM)	1,33 µL	72°C 2 minutes
T7 marked primer (5µM)	1,33 µL	
Taq	0,10 µL	72°C 10 minutes
Total	10 µL	4°C 24 hours
FINAL VOLUME	20 µL	

2.4.1 Denaturing Polyacrilamde Gel preparation:

To perform the vertical electrophoresis in 6% polyacrilamde gel, the glass walls of the tank were washed with neutral soap, dried with dH₂O and mili-Q water, and dried in a stove.

To the polyacrilamde stock solution (T3) were added the ammonium persulfate and TEMED exactly when the gel was used. The wells were filled up with this solution with the help of a 20mL syringe to avoid bubbles.

The polyacrilamde gel was polymerized approximately 1h before being used, when a pre-run of 30 minutes at 1500V took place.

Table 3: Polyacrilamde Stock Solution Preparation.

	Final Volume			
Reagents	30 mL	40 mL	120 mL	240 mL
40% Polyacrilamde	4,5 mL	6 mL	18 mL	36 mL
Mili Q Water	13,1 mL	17,4 mL	52,2 mL	104,4 mL
Urea	12,6 g	16,8 g	50,4 g	100,8 g
10 X TBE	3 mL	4 mL	12 mL	24 mL
Ammonium Persulfate	200 µL	266 µL	800 µL	1,6 mL
TEMED	20 µL	26 µL	80 µL	160 µL

2.4.2 Polyacrilamyde Gel Sample Preparation:

The volume 1,5 µL of loading buffer (according to Table 4) and 8 µL of PCR were added to the samples, which are the products' reaction of the triplicated amplification of the mandibular glands of the three castes of *A. s. rubropilosa*. Later, the samples were denatured at 95°C for 2 minutes and placed in ice for application in the polyacrilamyde gel.

Table 4: Loading Buffer Preparation.

Reagents	Quantities
Formamide	1 mL
1M EDTA	21 µL
Mili Q Water	32 µL
Xylene cyanol	Enough to stain the solution

2.4.3 Drying and Visualization of the 6% DDPCR Polyacrilamyde

Gel:

After running for approximately 3h and 30 minutes, the gel was dried in a stove at 60°C. After 1 hour it was washed with Mili-Q Water for a complete urea removal. After it was dried, the gel was visualized with fluorescence scanner FLA3000G (Fuji Film, Tokyo - Japão).

2.4.4 Amplified Gene Fragments Analysis:

Differentially amplified fragments were selected, isolated from the DD-RTPCR gels and reamplified with the use of a combination of specific primers. Later, the fragments were cloned using pGEM-T Kit (Promega) and sequenced in the Synchrotron Light National Laboratory – Structural Molecular Biology Center, Campinas – SP, Brazil.

The obtained sequences were compared to other in the GenBank using BLAST software (ATSCHUL et al., 1997).

3. Results

The quantitative evaluation of the total RNA, of mandibular glands of individuals of the three castes of *Atta sexdens rubropilosa*, showed variations among the castes since the soldiers presented 400µg/mL, the media workers 348µg/mL and the minima workers 380µg/mL. As well, it was verified that in gel the RNA was kept intact in the glands of the individuals of the three castes, where the two bands of the rRNA were highlighted (28S e 18S) (Fig. 2).

To obtain a subdivision of the mRNA population, a combination of 2 nitrogenated bases (GA) were added to the 3' portion of the anchor primer T7AP1 in the reverse transcription reaction which produces the cDNAs of the mandibular glands of the 3 castes of *A. s. rubropilosa* (Figure 3).

The DDPCR gel band profiles showed the three combinations (C1, C2 e C3) proposed herein through the presence of gene fragments (Fig. 4).

For comparison purposes the gene fragments obtained were classified according to the intensity of the gel markings and then divided into three classes: class I, transcripts that express themselves with the same intensity pattern in all combinations; class II or transcripts that express themselves with different intensities and class III or transcripts that are caste-specific (Fig. 4).

Some class III transcripts presented a peculiar expression pattern and among these, were highlight T1, T2 and T3 present in the glands of soldiers, media and minima workers *A. s. rubropilosa*, respectively. These gene fragments were also analyzed by

cloning and sequencing, and their descriptions and similarities were verified with the help of the *GenBank* as shown on Table 5.

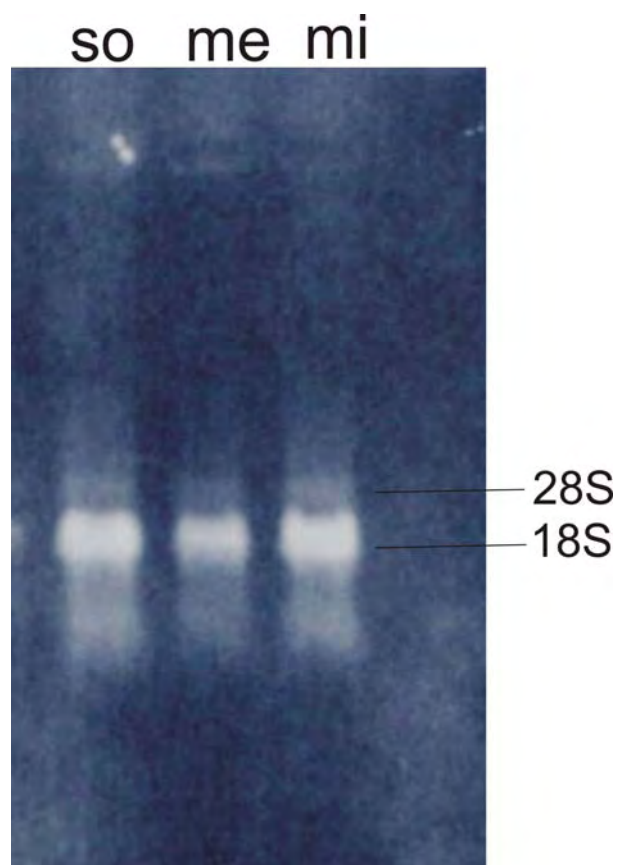


Figure 2: Result of total RNA extraction of mandibular glands of soldiers (so), media (me) and minima workers (mi) of *A. s. rubropilosa* in 1% agarose denaturant gel.

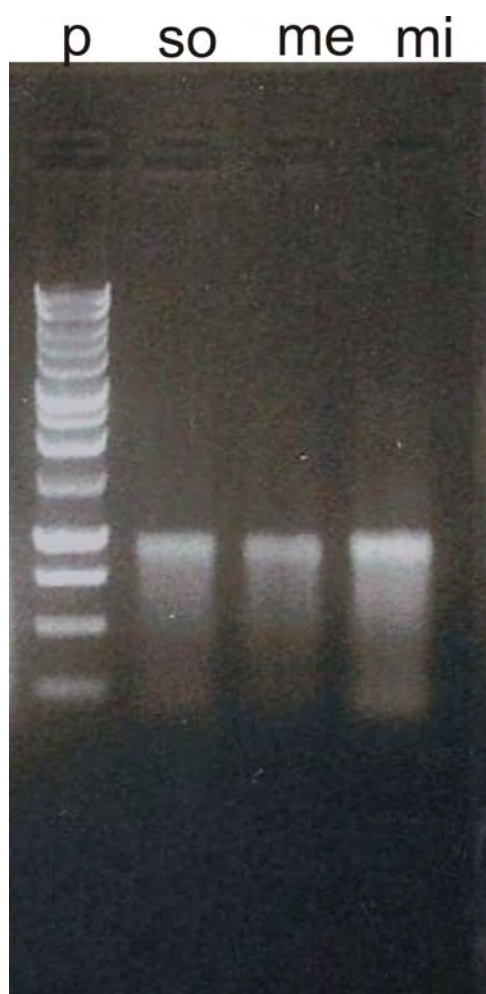


Figure 3: Result of the RT-PCR reaction of mandibular glands of soldiers (so), media (me) and minima workers (mi) of *A. s. rubropilosa*, where p = DNA pattern (250 pb – 10.000 pb), in 1% agarose gel.

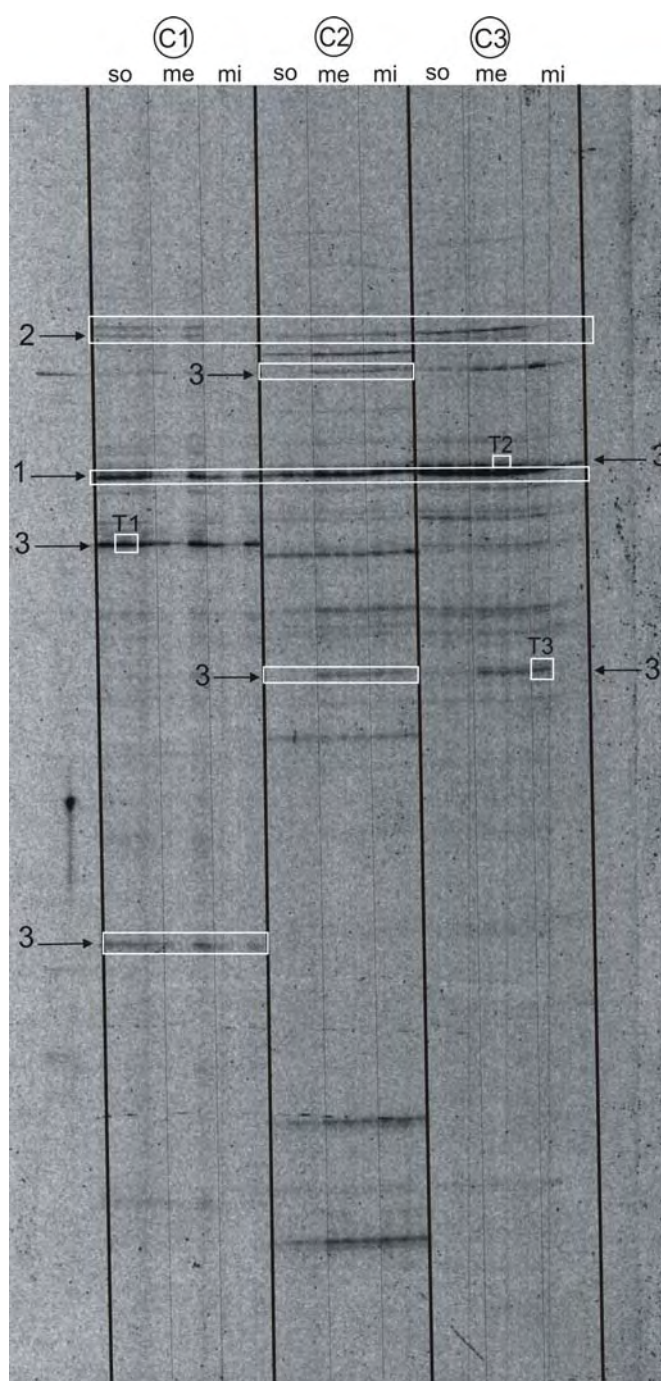


Figure 4: DD-RT-PCR result applied to the mandibular glands of the soldiers (so), media (me) and minima workers (mi) of *A. s. rubropilosa*, using 6% polyacrilamye gel, where C1 = combination 1; C2 = combination 2; C3 = combination 3; arrow 1 = class I gene fragments; arrow 2 = class II gene fragments; arrow 3 = class III gene fragments (T1 = transcript 1; T2 = transcript 2; T3 = transcript 3).

Table 5: Results of similarities of the transcripts T1, T2 e T3, found in the mandibular glands of soldiers, media and minima workers of *A. s. rubropilosa*, respectively, obtained according to the information from the *GenBank*.

T1	Hialuronidase Precursor Protein of <i>Polistes annularis</i> (gi/5815251/gb/AAD52616.1/)
T2	Phosphate Transporter Protein of <i>Apis mellifera</i> (gi/48099304/ref/XP_392582.1/)
T3	Mitochondrial Ribosomic Protein of <i>Apis mellifera</i> (gi/66546420/ref/XP_396501.2/)

4. Discussion

During the development of an organism, genetics programs are executed followed by changes in the pattern of genes that will be expressed in the proteins of the cells, tissues and organs determining all the vital processes (LIANG; PARDEE, 1992).

Changes in the gene expression can be monitored using the Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction technique (DD-RTPCR), which was used for the first time in the mandibular glands of minima, media and soldiers of ants *Atta sexdens rubropilosa*. This technique is being used more each day to isolate and characterize differentially expressed genes in different parts of the same individual, mainly due to the high sensitivity and the requirement for a small RNA quantity for the analysis.

The original DDRT-PCR protocol developed by Liang; Pardee (1992) was modified, including alterations in the primers (BAUER et al., 1993; LIANG; PARDEE, 1993), in the radioactive nucleotides (LIANG; PARDEE, 1995; TRENTMANN et al., 1995), in the protocol of the electrophoresis gel processing (BAUER et al., 1993; LOHMANN et al., 1995) and in the purification and cloning of the amplified products (transcripts) (WANG; FEUERSTEIN, 1995).

These modifications were adopted for the present study and produced useful results in the analysis of the differential gene expression of the mandibular glands of the three castes of the species studied.

The use of the oligo-dT T7AP1 primer anchored to the “GA” bases permitted the subdivision of the mRNA population found in the mandibular glands of *A. s. rubropilosa* and reduced the number of necessary combinations for each sample.

The three arbitrary primers (ARP2, ARP3, ARP5) used in the study detected the gene expression and demonstrated the presence of different band patterns (transcripts) in the mandibular glands of *A. s. rubropilosa*. This finding, corroborated by Guimarães et al. (1995) also demonstrated that the DD-RTPCR technique can be performed using a small number of primer combinations. However, a larger number of primers can be used to augment the message pool to be evaluated in the gene expression.

In this study with *A. s. rubropilosa*, the band expression profile presented in the DDPCR gel permitted the grouping of products of amplification into three distinctive classes, where the class I gene fragments corresponded to transcripts that were uniformly expressed in all of the combinations proposed here. These genes could probably be the constitutive genes, which are associated with the metabolic processes of the mandibular glands of the species studied. They are also called “house-keeping” and they would codify necessary proteins to the cells which function as RNA polymerase, DNA polymerase, transport proteins and serve the ribosomes’ requirements necessary to protein synthesis, as well as the RNAs and proteins involved in the splicing process.

In the mandibular glands of *A. s. rubropilosa* the class II gene fragments would be those one that probably would codify products more important in determining life stages of the individual, which could be related to the tasks performed by them in the colony, in the different castes (soldiers: colony defense; media workers: cutting and transporting of vegetation; minima workers: taking care of the offspring and fungus

garden). In *Melipona scutellaris* bees the genes belonging to the class II were related to the vitelogenin synthesis, precursor protein in the reproduction processes, and with the sterases enzymes responsible for the juvenile hormone hydrolysis, which production would occur in different levels according to the different development stages of the insect (MACHADO; BONETTI, 2001).

The gene fragments obtained from the glands of *A. s. rubropilosa* are considered as being class III, probably caste-specific. In this study they were denominated transcripts 1, 2 and 3 found respectively in the mandibular glands of soldiers (T1), media workers (T2) and minima workers (T3).

According to the *GenBank* database, the T1 presented similarity to the hialuronidase precursor protein in *P. anullaris* wasps. The hialuronidase is an enzyme that degrades hyaluronana, a glycosaminoglycane formed by regular repetitive sequences of disaccharides. Since the soldiers of *A. s. rubropilosa* perform vegetation cutting and transport sporadically, the T1, present in the mandibular glands of the individuals of this caste, would play a similar role to the hialuronidase enzyme, participating in the processes of cellulose degradation (polysaccharides) present in the vegetation.

The T2, with better markings in the mandibular glands of media workers, presented similarity with the phosphate carrier protein found in *A. mellifera*. This protein catalyses the phosphorylation and dephosphorylation reactions, making it possible for the cells to have control over the activation and de-activation of some enzymes/proteins, by the addition or not of the phosphate group. The T3, present in the minima workers, presented similarity to the mitochondrial ribosomal protein also found

in *A. mellifera*, which is synthesized from the nuclear genes in free polysomes, later imported by the mitochondria to compose the rRNA, an essential element in the protein synthesis mechanism, being produced mainly by proteins belonging to the respiratory chain. With that, the T2 as well as the T3 would be considered constitutive genes, or they would be associated with metabolic processes of the mandibular glands of the species studied.

The present study highlighted the occurrence of the differential gene expression between the mandibular glands of three castes of *A. s. rubropilosa*, demonstrating a glandular gene pattern specific to each caste, as well as confirming that the DD-RTPCR technique can be one more tool to be used in gene expression analysis, permitting the establishment of inter- and intra-caste relations in the insects.

5. References

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.

Alves, J.D.; Vantoai, T.T.; Kaya, N. 1998. Differential display: a novel PCR-based method for gene isolation and cloning. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 10(2):161-164.

Bauer, D.; Muller, J.; Reich, J.; Riedel, H.; Ahrenkiel, V.; Warthoe, P.; Strauss, M. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research*. 21:4272-4280.

Della Lucia, T.M.C. 1993. *As formigas cortadeiras*. Editora Folha de Viçosa. Viçosa, 262p.

Evan, D.J.; Wheeler, D.E. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:5575-5580.

Guimarães, M.J.; Lee, F.; Zlotnik, A.; Mcclanahan. 1995. Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Research*, 23(10): 1832-183.

Liang, P.; Averboukh, L.; Keyomarsi, K.; Sager, R.; Pardee, A. 1992. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Research*. 52: 6966-6968.

Liang, P.; Bauer, D.; Averboukh, L. Warthoe, P.; Rohrwild, M.; Muller, H.; Strauss, M.; Pardee, A.B. 1995. Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods in Enzymology*. 254: 305-321.

Liang, P.; Pardee, A.B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 257: 967-971.

Liang, P.; Pardee, A.B. 1993. Distribution and cloning of mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research*. 21: 3269-3275.

Liang, P.; Pardee, A.B. 1995. Response. *Science*. 257: 1186-1187.

Lohmann, J.; Schickle, H.; Bosch, T.C.G. 1995. REN display: a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Bio Techniques*. 18: 200-202.

Machado, M.A.M.S.; Bonetti, A.M. 2001. Expressão gênica diferencial em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 50p.

Manniatis, T.; Goodbourn, S.; Fischer, J.A. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*. 236: 1237-1245.

Miura, T.; Kamikouchi, A.; Sawata, M.; Takeuchi, H.; Natori, S.; Kubo, T. Matsumoto, T. 1999. Soldier caste-specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). *Evolution*. 96(24): 13874-13879.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Trentmann, S.M; Knapp, E.V.D.; Kende, H. 1995. Alternatives to ³⁵S as a label for the differential display of eucariotic messenger RNA. *Science*. 267: 1186.

Wang, X.; Feuerstein, G.S. 1995. Direct sequencing of DNA isolated from mRNA differential display. *BioTechniques*. 18: 448-453.

Warthoe, P.; Bauer, D.; Rohde, M.; Strauss, M. 1995. Detection and identification of expressed genes by differential display in PCR Primer: A laboratorial manual. Dieffenback, C.W.; Dveskler, G.S. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA.

Wilson, E.O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 7:143-156.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian research agency FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), Grant N°. 03/00553-8. We are grateful to Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles e Dra. Paula Ripamonte for the technical support.

Discussão Final

5. DISCUSSÃO FINAL

As glândulas mandibulares dos Hymenoptera fazem parte do chamado sistema salivar, o qual é constituído por pelo menos três pares de glândulas: salivares, hipofaríngeas e mandibulares que são responsáveis pela produção e secreção de substâncias importantes dentro do processo da regulação social do grupo, bem como pelas variadas funções desempenhadas pelos indivíduos das diferentes castas.

O estudo morfo-histológico das glândulas mandibulares de operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa* (PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2001) demonstrou que estas estruturas, nesses indivíduos, apresentam a mesma morfologia encontrada para os Hymenoptera em geral, ou seja, são pares, localizadas uma de cada lado da cabeça e estão associadas às mandíbulas. Sua organização é saculiforme onde se observa um reservatório com paredes finas e com células secretoras a ele associadas. As duas porções, secretora e reservatório, encontram-se conectadas por canalículos que possuem porções intra e

extracitoplasmáticas, onde a primeira tem origem no interior da célula secretora e a segunda é uma continuação desta e é produzida pela célula formadora do canalículo (PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2001), esta última já descrita em glândulas de insetos (COSTA-LEONARDO; CRUZ-LANDIM, 1985). Estas estruturas são responsáveis pelo transporte das substâncias produzidas no interior das células secretoras até o interior do reservatório, via porção extracitoplasmática.

Os estudos ultra-estruturais, das glândulas mandibulares de *A. s. rubropilosa*, realizados por Pavon; Camargo-Mathias (2005) confirmaram os dados morfo-histológicos e revelaram ainda que as células da porção secretora nos indivíduos das três castas mantem-se unidas através de tecido conectivo formando estruturas que lembram a morfologia de um ácino, disposição essa também observada nas glândulas mandibulares de abelhas *Trigona (Oxytrigona) tataria* por Cruz-Landim (1967). Foi também observado que as mesmas possuem variações morfológicas nos indivíduos das castas das operárias médias e dos soldados que apresentaram dois tipos de células secretoras. Essa variação encontrada poderia, no entanto, estar indicando que essas células seriam, na realidade, de um único tipo, o qual estaria em estágios diferentes do ciclo secretor, sugerindo a ocorrência de um assincronismo celular na produção da secreção (PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2005).

Segundo os resultados ultra-estruturais obtidos por Pavon; Camargo-Mathias (2005) o mecanismo de produção e liberação da secreção, das glândulas mandibulares de *A. s. rubropilosa*, ocorreria em etapas, onde: 1) a secreção seria sintetizada pelas células secretoras com participação intensa do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias; 2) a secreção seria armazenada em vesículas citoplasmáticas, que

a seguir seriam coletadas pela porção intracelular do canalículo coletor; 3) a porção extracelular do canalículo conduziria a secreção até a luz do reservatório onde a mesma seria armazenada e 4) posteriormente a secreção seria liberada para o exterior via ducto excretor.

As células da porção secretora dessas glândulas apresentaram em microscopia de luz granulação citoplasmática que representariam a presença de DNA, RNA, bem como organelas tais como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, dados estes confirmados pela ultra-estrutura (PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2004; PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2005), visto que os produtos aí sintetizados possuem também na sua composição proteínas, que requerem um eficiente aparato de síntese. Nas células secretoras das glândulas mandibulares de *A. s. rubropilosa* nas três castas foi encontrado cerca de dois nucléolos por núcleo confirmando a alta atividade de síntese nesses órgãos.

O reservatório das glândulas mandibulares dos indivíduos das três castas de *A.s. rubropilosa* possui um ducto excretor localizado na base da articulação da mandíbula com a cabeça e tem a função de conduzir o produto sintetizado pelas células secretoras até o exterior (PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2001). Este ducto excretor foi previamente descrito em abelhas por Cruz-Landim (1967). No entanto, estudos comparativos anteriormente realizados por Gama; Cruz-Landim (1982) em glândulas do sistema salivar de outras espécies de formigas sugeriram que dentre a subfamília Myrmicinae apenas a espécie *A. capiguara* possuiria este ducto excretor ligado à mandíbula. Entretanto, nossos resultados (PAVON; CAMARGO-MATHIAS, 2001)

vêm demonstrar que esta estrutura também é encontrada nos indivíduos da espécie *A. s. rubropilosa*.

Estudos histoquímicos conduzidos por Pavon; Camargo-Mathias (2004) mostraram a presença de polissacarídeos nessas glândulas. Esses resultados foram também confirmados pelas análises citoquímicas ultra-estruturais onde se evidenciou esse elemento sob a forma de grânulos eletrondensos distribuídos no citoplasma das células secretoras dos indivíduos das três castas (informação pessoal).

Os carboidratos, de uma forma geral, desempenham importante papel nos sistemas biológicos associando-se entre si, formando oligo e polissacarídeos; associando-se a proteínas formando glicoproteínas e a lipídios, formando glicolipídios. Os polissacarídeos, presentes nas células secretoras das glândulas mandibulares nas três castas de *A. s. rubropilosa*, sob a forma livre ou conjugada, poderiam representar reservas energéticas, além de estarem presentes na secreção final eliminada por essas glândulas.

Pavon; Camargo-Mathias (2004) mostraram também a presença de proteínas nas células secretoras de *A. s. rubropilosa* que ultraestruturalmente estariam sob a forma de granulação eletrondensa nas diferentes regiões da glândula (informação pessoal).

Pavon; Camargo-Mathias (2004) analisando ainda o perfil protéico das glândulas mandibulares dos indivíduos das três castas de *A. s. rubropilosa*, por meio de dosagem total e eletroforese confirmaram estes resultados e mostraram que tanto as concentrações do teor protéico total quanto o número de polipeptídios encontrados nas glândulas mandibulares das diferentes castas seriam proporcionais ao tamanho dos indivíduos relacionando-os com a tarefa que os mesmos desempenhariam na colônia.

Dessa forma, em *A. s. rubropilosa*, os soldados, os quais executariam tarefas fora do ninho, tais como forragear e escavar, além de auxiliarem na comunicação e defesa (WILSON, 1980) seriam os indivíduos que possuiriam maior quantidade de elementos de natureza protéica na secreção armazenada no reservatório de suas glândulas mandibulares. As operárias médias ou generalistas, que além de executarem tarefas dentro do ninho, também o fazem fora dele, cortando, transportando e mantendo os fungos viáveis, possuiriam teor protéico maior do que as operárias mínimas ou jardineiras as quais teriam a função de cuidar da cria e da cultura de fungos no interior da colônia.

Assim poder-se-ia inferir que as proteínas, presentes na glândula mandibular dos indivíduos das três castas de *A. s. rubropilosa*, além de comporem a secreção final, poderiam também participar como agentes bactericidas e/ou fungicidas corroborando dados obtidos em glândulas metapleurais de outras espécies de formigas da tribo Attini (NASCIMENTO et al., 1996) atuando na assepsia da colônia e auxiliando no crescimento do jardim de fungo (CAETANO et al., 2002b).

Pavon; Camargo-Mathias (2004) também analisaram a presença de lipídios nessas glândulas e demonstraram sua presença principalmente nas células da porção secretora nas três castas de *A. s. rubropilosa*. Esses resultados foram confirmados pela análise citoquímica ultra-estrutural que demonstrou sua presença na forma de gotas com diferentes localizações no citoplasma das células secretoras, como por exemplo: próximas às cisternas do retículo endoplasmático liso e no interior das mitocôndrias (informação pessoal).

Caperucci; Camargo-Mathias (2006) estudando os ovários de operárias e rainhas de formigas *Neoponera villosa*, também relataram que esse tipo de associação era freqüente nesses órgãos e sugeriram que nos ovócitos desses indivíduos, o lipídio estaria se originando também das mitocôndrias. Caetano et al. (2002a) estudando glândulas pós-faríngeas de formigas *Dinoponera australis* registraram alterações nas mitocôndrias atribuindo a elas também a função de produção de lipídios, e as denominaram de mitocôndrias derivadas. Abdalla; Cruz-Landim (2005) em estudos ultra-estruturais da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* também observaram mitocôndrias contendo material lipídico no seu interior.

Dessa forma, os dados deste estudo mostraram que os lipídios presentes na glândula mandibular das três castas de formigas *A. s. rubropilosa* teriam, pelo menos, duas fontes de origem: o retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias das células da porção secretora.

Tanto os lipídios, quanto as proteínas e os polissacarídeos presentes nas secreções das glândulas mandibulares de formigas *A. s. rubropilosa* (informação pessoal) poderiam estar fazendo parte dos multicomponentes que constituem os feromônios de alarme e/ou defesa, constituídos principalmente por uma mistura de álcool, aldeídos e cetona, de baixo peso molecular e alta volatilidade (BLUM, 1968). Este feromônio de alarme, identificado nas glândulas mandibulares de *A. s. rubropilosa* por uma mistura de 4-metil-3-heptanona, neral e geranial atuaria tanto na indução de alarme, quanto no reconhecimento das companheiras de ninho (BUTENANDT et al., 1959).

Assim, a glândula mandibular de operárias de *A. s. rubropilosa* através de suas secreções estaria envolvida no controle e monitoramento comportamental das diferentes castas, pois se sabe que o feromônio tem papel importante na organização da sociedade de formigas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A técnica *Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (DD-RTPCR) vem tornando-se cada vez mais eficaz para isolar e caracterizar genes diferencialmente expressos entre células, tecidos ou indivíduos (WARTHOFER et al., 1995) e foi aqui utilizada, pela primeira vez, no estudo das glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados.

O perfil de expressão de bandas detectadas pela DD-RTPCR permitiu agrupar em *A. s. rubropilosa*, os produtos da amplificação em três classes distintas: I, II e III. Os fragmentos gênicos da classe I corresponderiam a transcritos que se expressariam uniformemente em todas as combinações propostas e, provavelmente seriam os chamados genes constitutivos, os quais estariam associados aos processos metabólicos das glândulas mandibulares da espécie em questão. Os da classe II, seriam aqueles que provavelmente, codificariam produtos que seriam mais importantes em determinados estágios do que em outros, o que poderia estar relacionado com as tarefas que os indivíduos das diferentes castas desempenhariam na colônia (soldados: defesa da colônia; operária média: cortar e transportar a vegetação; operária mínima: cuidar da prole e do jardim de fungos). Os da classe III, subclassificados ainda em transcritos 1, 2 e 3, provavelmente, seriam casta-específicos, sendo encontrados nas glândulas mandibulares dos soldados (T1), operárias médias (T2) e operárias mínimas (T3) respectivamente.

Assim, T1 apresentou similaridade com a proteína precursora da hialuronidase em vespas *Polistes anullaris*. Como os soldados de *A. s. rubropilosa* exercem, esporadicamente, atividades de corte e de transporte da vegetação no campo, provavelmente o T1, presente na glândula mandibular desta casta, desempenharia um papel similar à hialuronidase, enzima que degrada hialuronana (glicosaminoglicana), participando dos processos de degradação da celulose (polissacarídeos) presente na vegetação (DIEHL-FLEIG, 1995).

O T2 com maior marcação nas glândulas mandibulares de operárias médias, apresentou similaridade com a proteína carreadora de fosfato encontrada em *A. mellifera*. Esta proteína catalisaria a reação de fosforilação e desfosforilação, possibilitando que as células tivessem o controle de ativação e desativação de certas enzimas/proteínas, pela adição ou não do grupo fosfato.

O T3, presente nas operárias mínimas, apresentou similaridade com a proteína ribossomal mitocondrial também de *A. mellifera*, a qual seria sintetizada a partir de genes nucleares em polissomos livres sendo, posteriormente, importada pelas mitocôndrias, para compor o RNA ribossômico, elemento essencial na maquinaria de síntese, principalmente de proteínas que atuam na cadeia respiratória.

Assim, o presente estudo, além de evidenciar a ocorrência de expressão gênica diferencial entre as glândulas mandibulares das três castas de *A. s. rubropilosa*, demonstrou que a técnica DD-RTPCR poderia ser mais uma ferramenta a ser utilizada nas análises da expressão gênica, podendo inclusive estabelecer, nos insetos, relações intra e inter castas.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Por meio das aplicações de técnicas morfo-histológicas, histoquímicas, ultra-estruturais e análises do perfil protéico e da expressão gênica das glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, o presente estudo demonstrou que:

- As glândulas mandibulares possuem a mesma morfologia nas três castas de formigas estudadas, sendo constituídas por uma porção secretora e um reservatório com um ducto excretor a ele conectado;
- A porção secretora está conectada ao reservatório através de canalículos que possuem porções intra e extracitoplasmáticas;
- As células secretoras são de um único tipo, onde se encontram arranjas em forma de ácinos com núcleos evidentes acompanhando a morfologia da célula;

- Lipídios; proteínas e polissacarídeos foram encontrados em diferentes locais da glândula incluindo a secreção armazenada no reservatório;
- Os lipídios presentes nas glândulas mandibulares de *A. s. rubropilosa* têm duas fontes de origem: o retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias das células secretoras;
- As concentrações de teor protéico total (0,274; 0,377; 0,959 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das glândulas mandibulares das operárias mínimas, médias e soldados, respectivamente, são proporcionais ao tamanho dos indivíduos, sugerindo uma correlação com a tarefa que os mesmos desempenham na colônia;
- A expressão gênica foi diferencial entre as glândulas mandibulares das três castas e os fragmentos gênicos (transcritos) foram classificados como I, II e III de acordo com sua expressão.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ABDALLA, F.C.; CRUZ-LANDIM, C. Ocorrência, morfologia e ultra-estrutura da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Meliponini). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 47-57, 2005.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

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

AYASSE, M.; PAXTON, R.J.; TENGÖ, J. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 46, p. 31-78, 2001.

BILLEN, J.; MORGAN, E.D. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In: VANDER-MEER, R.K. et al (Ed.). Pheromone Communication in social insects. Boulder: Westview, 1998. pp. 3-33.

- BLUM, M. S. Alarm pheromones. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.14, p.57-80, 1968.
- BORDAS, M.L. Appareil glandulaire des Hymenoptères. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie**, Paris, v.19, p.1-132, 1895.
- BRITO, F.F.; MORAES, R.L.M.S. de; CAETANO, F.H. Ultramorphology of the hypopharyngeal glands of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY. n. 1, 2000, Foz do Iguaçu. Anais...Foz do Iguaçu: Publicação, 2000. p.789.
- BROUGH, E.J. The multifunctional role of the mandibular gland secretion of the Australian desert ant, *Calomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Zeitschrift fur Tierpsychologie**, Berlin, v. 46, p. 279-297, 1978.
- BUSCHINGER, A.; MACHWITZ, U. Defensive behavior and defensive mechanisms in ants. In: HERMANN, H.R. (Ed.). Defensive Mechanisms in Social Insects. New York: Praeger, 1984. p. 95-150. v.1.
- BUTENADT, A.; LINZEN, B.; LINDAUER, M. Über einen Dufour aus der Mandibeldrüse der Blattschneiderameisen *Atta sexdens rubropilosa*. Forel. **Archives D' Anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale**, Paris, v. 48, p. 13-19, 1959.
- CAETANO, F.H.; ZARA, F.J.; GREGÓRIO, E.A. The origin of lipid droplets in the post-pharyngeal gland of *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae). **Cytologia**, Tokyo, v. 67, p. 301-308, 2002a.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ K.; ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. Araras: Topázio, 2002b. 131p.

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Lipids in oocytes of *Neoponera villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). **Sociobiology**, Chico, v. 47(2), p. 531-542, 2006.

CAMMAERTS- TRICOT, M.C. Pheromones agremeant les ouvrières de *Myrmica rubra*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 19, p.1299-1315, 1973.

CHAPMAN, R.F. **The Insects Structure and Function**. New York: American Elsevier, 1998. 819p.

CORONA, M.; ESTRADA, E.; ZURITA, M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 202, p. 929-938, 1999.

COSTA-LEONARDO, A.M.; CRUZ-LANDIM, C. Aspectos ultra-estruturais das glândulas mandibulares de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1/2, p. 21-31, 1985.

CREWE, R.M.; BLUM, M.S. Alarm pheromones in the genus *Myrmica* (Himenoptera: Formicidae). **Zeitschiff fur Veigleichende Physiologie**, Berlin, v.1, p. 363-373, 1970.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 15, p. 177-290, 1967.

CRUZ-LANDIM, C. Tipos de células secretoras presentes nas glândulas exócrinas das abelhas. In: Glândulas exócrinas das abelhas. CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C. (Ed.) Glândulas exócrinas das abelhas. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. p.1-20.

DELAGE-DARCHEN, B. Les glandes post-pharyngiennes des fourmis connaissances actuelles sur leur structure, leur fonctionnement, leur role. **Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 15, p. 63-76, 1976.

DIEHL-FLEIG, E. **Formigas**: Organização social e ecologia comportamental. São Leopoldo: Unisinos, 1995.168p.

EVANS, D.J.; WHEELER, D.E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 96, p. 5575-5580, 1999.

GAMA, V.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera: Formicidae). **Naturalia**, São Paulo, v. 7, p. 145-165, 1982.

GAMA, V. O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 317-359, 1985.

GHENT, R. Adaptative refinements in the chemical defense mechanisms of certain formicinae. Unpublished thesis, Cornell University, 1961.

GRACIOLI, L.F.; MORAES, R.L.M.S. de. Histological and morphometric comparisons of worker and queen mandibular glands of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). **Sociobiology**, Chico, v. 40, n.2, p. 440-456, 2002.

GRAF, V. Nota sobre a ocorrência das glândulas salivares da cabeça em *Melissoptila* (Anthophoridae: Apoidea). **Bol.Univ. Fed.**, Paraná, v. 13, p. 281-288, 1970.

HERMANN, H.R.; HUNT, A.N.; BUREN, W.F. Mandibular gland groove in *Polistes annularis* (L.) and *Vespula maculate* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). **International Journal Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 1, p. 43-49, 1971.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **The ants**. Cambridge: Belknap, 1990. 732p.

JAFFÉ, K. **El mundo de las hormigas**. Editora, Equinoccio. Universidad Simon Bolivar, 1993. 185p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Ed. Santos, 1983. 123p.

MACHADO, M.A.M.S.; BONETTI, A.M. **Expressão gênica diferencial em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae)**. 2001. 50f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

MACRAE, E.K.; MEETZ, 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.

MARSARO JUNIOR, A.L. et al. Inhibition of the germination of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Conidia by extracts of the mandibular glands of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 403-406, 2001.

MEINERT, C.D. Bidtag til danske Myrers Natur historie, K. Danskevid. Selsk skr. 5(I), 1860. 7p.

MELLO, L. M. S.; VIDAL, B. **Práticas de Biologia Celular**. Campinas: Edgard Blucher; FUNCAMP, 1980. 71p.

NASCIMENTO, R.R. do. et al. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 5, p. 987-1000, 1996.

NOIROT C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.19, p. 61-80, 1974.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, gland cell, glandular units: some comments on terminology and classification. **Annales De La Societe Entomologique**, França, v. 27, p. 123-128, 1991.

OLIVEIRA JÚNIOR, W.P. **Análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) por DDRT-PCR.** 1999. 57f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.

PAVON, L.F.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. A Morpho-histological and ultrastructural study of the mandibular glands of *Atta sexdens* worker ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3A, p. 449-464, 2001.

PAVON, L.F.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Histochemistry and protein profile of the mandibular glands of workers of the ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Cytologia**, Tokyo, v. 69, n. 2, p. 225-234, 2004.

PAVON, L.F.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Ultrastructural studies of the mandibular glands of the minima, media and soldier ants of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae). **Micron**, New York, v. 36, n. 5, p. 449-460, 2005.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: theoretical and applied. London: J. & A. Churchill, 1985. 998p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHIEMENZ, P. Über das Herkommen des Futtersaftes und Speicheldrüsen der Biene nebst einem Anhang über das Riechorgan. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, Leipzig, v. 38, p. 71-135, 1883.

SEDMARK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G 250. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 79, p. 544-552, 1977.

SPRADBERY, J.P. Wasps: An account of the biology and natural history of solitary and social wasps. In: KENNETH, G.R.; MATTHEWS, R.W. The social biology of wasps. London: Comstock, 1991. 678p.

THIERY, J.P. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 6, p. 987-1018, 1967.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Harvard: Belknap, 1971. 548p.

WILSON, E.O.; REGNIER, F.E. The evolution of the defense system in the Formicinae ants. **American Naturalist**, Chicago, v.105, p. 279-289, 1971.

WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). The overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 7, p.143-156, 1980.

WARTHOE, P. et al. **Detection and identification of expressed genes by differential display in PCR Primer**: A laboratorial manual. Dieffenback, C.W.; Dveskler, G.S. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA. 1995.

Rio Claro, 20 de Junho de 2006.

Orientada:

Lorena Favaro Pavon Porfirio

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias