
Programa de Mestrado em Ciências Biológicas

Área: Biologia Celular e Biologia Molecular

SUZANA FORTOLAN BAPTISTA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA DE VIAS
METABÓLICAS NA FORMIGA ATTINI *Atta sexdens
rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**



Rio Claro/SP
2015

SUZANA FORTOLAN BAPTISTA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO TRANSCRIPTÔMICA DE VIAS
METABÓLICAS NA FORMIGA ATTINI *Atta sexdens
rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Área:
Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

Rio Claro/SP
Março/2015

*A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.*

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me trazido por caminhos mais altos que aqueles que aqueles que passavam por meu coração. Agradeço por algumas vezes ter me conduzido ao deserto para falar mais de perto comigo. Agradeço por ter me ensinado a amá-lo sobre todas as coisas. Agradeço principalmente por ter sempre um Amigo bem presente.

Ao meu querido esposo Gustavo, agradeço pela sua paciência nos momentos difíceis, pela sua constante alegria e por sempre me fazer rir. Agradeço por ter me ensinado a amar de uma forma que nunca havia experimentado antes, por ter me mostrado que o amor cura todas as feridas e por ser meu grande companheiro. Agradeço principalmente por ter acreditado em mim.

Aos meus pais pelo constante apoio, pelo incentivo, pelo real amor incondicional e por fazerem todos os dias além do seu alcance para realizar todos os meus sonhos. São meus exemplos de vencedores e batalhadores. Agradeço por terem me ensinado que a vida não é ingrata com quem vive em retidão. Ao meu irmão, Eliézer, agradeço pelo carinho e por não ter medo de recomeçar. Nós estamos com você!

Agradeço aos meus sogros Paulo e Cristiane que me acolheram como filha e me apoiaram nos momentos mais delicados de conclusão deste trabalho.

Aos meus grandes parceiros de laboratório Milene, Miagui e Dayane. Agradeço por serem os melhores parceiros do mundo para trabalhar em equipe. Agradeço por terem me

ensinado como funciona e que funciona um verdadeiro grupo. Milene, agradeço muito pela paciência de ter me explicado tím-tím por tím-tím das partes de bioinfo deste trabalho. Miagui, agradeço muito pela sua serenidade e por sua insistência naquilo que parece impossível. Daya, agradeço pelas conversas, risadas e pelas receitas fitness.

Ao meu mestre Prof. Maurício Bacci, agradeço pela confiança. Por me mostrar que todos os resultados são surpreendentes, por me ensinar a trabalhar digna e honestamente na ciência. Agradeço por me permitir participar da rotina laboratorial, dos contatos de trabalho e das oportunidades. Agradeço por ser meu espelho de profissional.

Agradeço a todos que passaram por minha vida e que direta ou indiretamente foram fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço finalmente à Unesp pela infraestrutura e à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro que tornaram este trabalho possível.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	16
As Formigas Attini.....	16
A Simbiose Fungo-Formiga e Seu Caráter Nutricional.....	18
Transcriptômica.....	19
OBJETIVOS.....	22
Geral.....	22
Específicos.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Coleta de formigas.....	23
Extração de RNA.....	23
Quantificação e verificação da pureza do RNA.....	23
Construção e sequenciamento de biblioteca transcriptômica.....	24
Construção da Biblioteca.....	24
Análises de Bioinformática.....	25
Análise da qualidade dos <i>reads</i>	25
Montagem <i>de novo</i>	25
Retirada de Isoformas.....	26
Anotação.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
Extração de RNA.....	27
Quantificação e verificação da pureza.....	28
Construção da Biblioteca Transcriptômica.....	28
Análise da qualidade dos <i>reads</i>	30
Filtro de tamanho e redundâncias.....	31

Sequências resultantes para análise.....	31
Análise comparativa dos genes de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	32
Análise comparativa das vias metabólicas de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	39
Vias Metabólicas.....	39
Metabolismo de purinas.....	39
Metabolismo de amido e sacarose.....	42
Metabolismo de Glicina, Serina e Treonina.....	46
Metabolismo de Arginina e Prolina.....	49
Metabolismo da Tirosina.....	51
Metabolismo de Glutamina.....	54
Vias de Biossíntese e a interpretação do KEGG.....	57
Transcritos com alta expressão gênica em <i>A. sexdens rubropilosa</i>	59
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quantificação e pureza das amostras resultantes da extração de RNA...28

Tabela 2. Dados da biblioteca de *A. sexdens rubropilosa*, obtidos após sequenciamento, montagem e anotação de sequências.....32

Tabela 3. Contigs mais expressos em *A. sexdens rubropilosa*.....60

Lista de Figuras

- Figura 1.** Formigas Attini. Esquerda – *Atta laevigata*. Direita – *Acromyrmex coronatus*. Foto: <http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/> - Acesso em 5 de março de 2015.....17
- Figura 2.** Formigas Attini *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Foto: <http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/Atta> - Acesso em 5 de março de 2015.....17
- Figura 3.** Jardim de fungo. 1 – Rainha e operárias *Atta texana* no jardim de fungo. 2 – Operárias *Atta cephalotes*. 3 – Câmara demonstrando o jardim de fungo. Foto: <http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/Atta> - Acesso em 5 de março de 2015.....18
- Figura 4.** Basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*. A – Aspecto geral das colônias em cultivo. Seta evidencia estáfilos (e). Barra representa 1cm. B – Gongilídios (g). Barra representa 15µM. C – Estáfilos e gongilídios. Barra representa 40µM. Foto: LUGO et al., 2013.....19
- Figura 5.** Sequenciamento em Illumina HiSeq 2000. 1 – preparação de uma amostra genômica com fragmentação do DNA e ligação de adaptadores; 2 – ligação do DNA à superfície da placa; 3 e 4 – amplificação em “ponte”; 5 – desnaturação com liberação das extremidades da dupla fita; 6 – *clusters* completos. Fonte: <http://tucf-genomics.tufts.edu/home/faq>.....21
- Figura 6.** Gel de Agarose 1%, corado com GelRed, mostrando resultado da extração de RNA total. As bandas de RNAr (28S, 18S e 5S) estão destacadas pelas setas..28
- Figura 7.** Eletroferograma obtido pelo software *RNA Integrity Number* (RIN) para a amostra recebida pela MacroGen.....29
- Figura 8.** Perfil *Bioanalyzer* para verificação dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca R5. Pela posição dos picos pode-se inferir o tamanho de 440 pb.....30

- Figura 9.** Gráficos de análise de qualidade das sequências gerados pelo FASTQC. À esquerda, análise de qualidade de cada base. À direita, análise mostrando a ausência de bases não identificadas (N).....31
- Figura 10.** Distribuição da dados resultantes após consulta de sequências contra o GenBank, onde 12.493 sequências não obtiveram semelhantes.....33
- Figura 11.** Distribuição da abundância de *top-hits* encontrados em diferentes espécies biológicas.....33
- Figura 12.** Distribuição dos termos de GO no nível 2 para cada categoria, que inclui: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). Retângulo vermelho evidencia seleção de processo metabólico, selecionado para análise de vias.....35
- Figura 13.** Distribuição da abundância de classes enzimáticas de acordo com banco de dados disponível em KEGG.....36
- Figura 14.** Detalhe da distribuição funcional das enzimas incluídas no grupo das transferases.....37
- Figura 15.** Detalhe da distribuição funcional das enzimas incluídas no grupo das hidrolases.....38
- Figura 16.** Detalhe da distribuição funcional das enzimas incluídas no grupo das oxirredutases.....39
- Figura 17.** Via metabólica da purina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem integridade da via a que pertencem.....40

Figura 18. Via metabólica da purina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos, cores diferentes indicam enzimas diferentes.....41

Figura 19. Sobreposição das vias metabólicas de purina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculos vermelhos destacam as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.....42

Figura 20. Via metabólica do amido e da sacarose em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.....43

Figura 21. Via metabólica da purina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.....44

Figura 22. Sobreposição das vias metabólicas de amido e sacarose de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculos vermelhos destacam as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*. Círculo azul destaca presença da enzima endopoligalacturonase na via..45

Figura 23. Via metabólica de glicina, serina e treonina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde com borda preta indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.....47

Figura 24. Via metabólica da glicina, serina e treonina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.....47

Figura 25. Sobreposição das vias metabólicas de glicina, serina e treonina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculo vermelho destaca as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.....48

Figura 26. Via metabólica de arginina e prolina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde com borda preta indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.....49

Figura 27. Via metabólica da arginina e prolina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.....50

Figura 28. Sobreposição das vias metabólicas de arginina e prolina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculo vermelho destaca as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.....51

Figura 29. Via metabólica de tirosina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde com borda preta indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.....52

Figura 30. Via metabólica da tirosina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida à partir dos transcritos.....53

Figura 31. Sobreposição das vias metabólicas de tirosina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculos vermelhos destacam as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.....54

Figura 32. Via metabólica da glutathiona em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde com borda preta indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.....55

Figura 33. Via metabólica da glutathiona em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.....56

Figura 34. Sobreposição das vias metabólicas de glutathione de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculo vermelho destaca as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.....57

Figura 35. Via de biossíntese de antibiótico, presente no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, onde círculo vermelho demonstra expressão da enzima Acetil CoA em uma via exclusiva de micro-organismos.....58

Figura 36. Vias de biossíntese de N-glicano em diferentes organismos presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*. Retângulos coloridos indicam sequências codificadoras presentes no transcriptoma.....59

Resumo

As associações de mutualismo afetam a vida de todos os organismos vivos. Um modelo biológico muito útil para estudos sobre o mutualismo são as formigas da tribo Attini, cuja nutrição depende da associação com fungos basidiomicetos. Estes fungos produzem despolimerases que degradam a matéria vegetal, gerando açúcares simples que são essenciais para a sobrevivência das formigas. Estudos bioquímicos sugerem que pode haver vias metabólicas mutualistas, iniciando com passos catalisados por enzimas fúngicas e terminando com passos catalisados por enzimas das formigas. Estudos genômicos indicam que as formigas podem não ser capazes de sintetizar alguns aminoácidos, que seriam supridos pelos fungos. Estudos em microbiologia sugerem que as formigas utilizam antibióticos microbianos para proteção contra eventuais entomopatógenos. Desta forma, caracteriza-se uma dependência nutricional e de metabólitos microbianos pelas formigas. Para avaliar a extensão desta dependência, na presente dissertação de mestrado nós anotamos o transcriptoma da formiga Attini *Atta sexdens rubropilosa* em busca das vias metabólicas com elementos mais expressos. Foram avaliadas a presença e expressão de genes a partir de dados de transcriptômica de nova geração.

Abstract

Mutualistic associations affect all living organisms. A useful biological model for studies of mutualism are Attini ants, whose nutrition depends on the association with basidiomycete fungi. These fungi produce depolymerases that act on degrading plant material, producing simple sugars that are essential for the survival of ants. Biochemical studies suggest that may be metabolic pathways, starting with steps catalyzed by fungal enzymes and ending with steps catalyzed by enzymes of the ants. Genomic studies indicate that the ants may not be able to synthesize some amino acids that would be supplied by the fungi, thus characterizing nutritional mutualistic dependence. To assess the extent of this metabolic dependence, in this thesis we aimed to annotate the transcriptome of Attine ant *Atta sexdens rubropilosa* in search of metabolic pathways. The presence and expression of genes from transcriptomics data of next generation sequencing were evaluated.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Formigas Attini

Formigas pertencentes à tribo Attini (subfamília Myrmicinae, família Formicidae, ordem Hymenoptera) formam um grupo monofilético com 15 gêneros e mais de 230 espécies já descritas. Todas as espécies da tribo Attini cultivam fungos basidiomicetos, que são fundamentais para sua alimentação (WEBER, 1972). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Figura 1) são amplamente estudados, uma vez que são os mais derivados dentre as Attini, incluindo os herbívoros dominantes do Novo Mundo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1991). Nestes gêneros encontram-se algumas espécies consideradas pragas de grande importância para as culturas comerciais da América Latina, uma vez que utilizam folhas, caules e flores frescas, tanto de plantas nativas como de culturas comerciais, para a manutenção de seu fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, considerado o alimento de larvas e rainhas (MARICONI, 1970; AMANTE, 1972). Grande quantidade de matéria vegetal é empregada para a manutenção deste fungo e para suprir as necessidades alimentares das formigas. Assim, a necessidade nutricional é elevada, uma vez que espécies de *Atta* mantêm ninhos com milhões de operárias e centenas de câmaras que podem estar distribuídas por até 100 m² (JACOBY, 1950; FORTI et al., 1987).

Figura 1. Formigas Attini. Esquerda – *Atta laevigata*. Direita – *Acromyrmex coronatus*. Foto: <http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/> - Acesso em 5 de março de 2015.



Entretanto, as formigas cortadeiras também trazem benefícios em determinadas situações ou ambientes. Estudos indicam que estes insetos atuam nos ecossistemas primários e secundários e servem como fonte de alimento para uma grande diversidade de espécies animais, as quais incluem outros insetos, répteis, aves, mamíferos e até alguns grupos humanos. Além disso, são descritas como agentes de aeração do solo e drenagem (MILTON e MARIÂNGELA, 1997), renovação e transformação da biomassa vegetal, além de serem consideradas agentes de polinização (RICO-GRAY, 1980; UKAN, 2011).

A espécie de formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) (Figura 2), objeto do nosso estudo, é conhecida popularmente como “saúva-limão” por seu odor característico quando esmagada (FORTI et al., 1987).

Figura 2. Formigas Attini *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Foto: <http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/Atta> - Acesso em 5 de março de 2015.



1.2. A Simbiose Fungo-Formiga e Seu Caráter Nutricional

Relações de simbiose com micro-organismos são descritas como uma forma de inovação evolutiva que permite a alguns animais a ocupação de nichos ecológicos até então indisponíveis (ZILBER-ROSENBERG e ROSENBERG, 2008; DOUGLAS, 2010). A habilidade dos animais para ganhar acesso aos nutrientes da biomassa vegetal (fonte de energia abundante em ecossistemas terrestres) é facilitada pela simbiose com os micro-organismos (DOUGLAS, 2009).

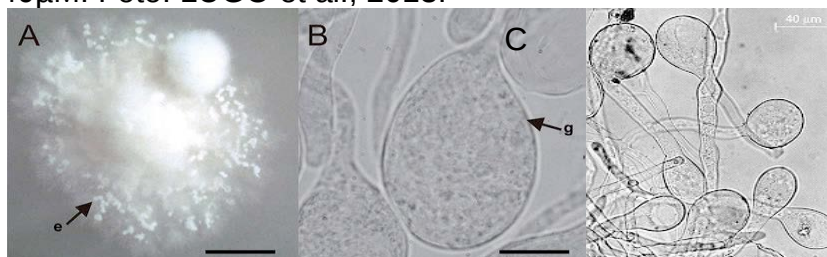
O simbionte que desperta maior interesse na relação fungo-formiga é, sem dúvida, o basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus* (Figura 3), cultivado pelas Attini derivadas (FREDGARDSON, 2008).

Figura 3. Jardim de fungo. 1 – Rainha e operárias *Atta texana* no jardim de fungo. 2 – Operárias *Atta cephalotes*. 3 – Câmara demonstrando o jardim de fungo. Foto: <http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/Atta> - Acesso em 5 de março de 2015.



No interior dos ninhos, as culturas de fungo mutualista produzem intumescências apicais ricas em lipídios e carboidratos, chamadas gongilídios, as quais, em geral, formam aglomerados conhecidos como estáfilos (Figura 4) (HÖLLDOBLER; WILSON, 1991; MUELLER et al., 2001).

Figura 4. Basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*. A – Aspecto geral das colônias em cultivo. Seta evidencia estáfilos (e). Barra representa 1cm. B – Gongilídios (g). Barra representa 15 μ M. C – Estáfios e gongilídios. Barra representa 40 μ M. Foto: LUGO et al., 2013.



Estudos indicam que as formigas se alimentam dos líquidos obtidos da seiva das folhas durante a coleta (MARTIN *et al.*, 1975; QUINLAN e CHERRETT, 1978) e dos solutos gerados nos jardins de fungos, que proporcionam às operárias acesso a nutrientes, enzimas, aminoácidos e açúcares simples (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006), resultando em uma relação de mutualismo de caráter nutricional. Além disso, a formiga seleciona positivamente as enzimas produzidas pelo fungo simbionte (BACCI JR *et al.*, 2013), atuante na degradação produtos foliares, gerando açúcares solúveis que são ingeridos pelas formigas (SILVA *et al.*, 2003). Muitos estudos abordam a degradação da matéria vegetal pelo fungo simbionte, porém pouco se sabe sobre a contribuição das enzimas das formigas neste processo.

1.3. Transcriptômica

Os estudos dos transcriptomas visam analisar o conjunto de mRNA, ou transcritos, cuja expressão se dá por um único organismo ou por um grupo de células em determinado momento, refletindo genes ativamente expressos. A expressão gênica de um organismo pode variar com as condições ambientais,

estado de desenvolvimento e tecido de origem (STRANCHAN e READ, 1999). A avaliação da abundância dos diferentes transcritos pode estimar a expressão gênica de determinada célula ou tecido (BOUCK; VISION, 2007).

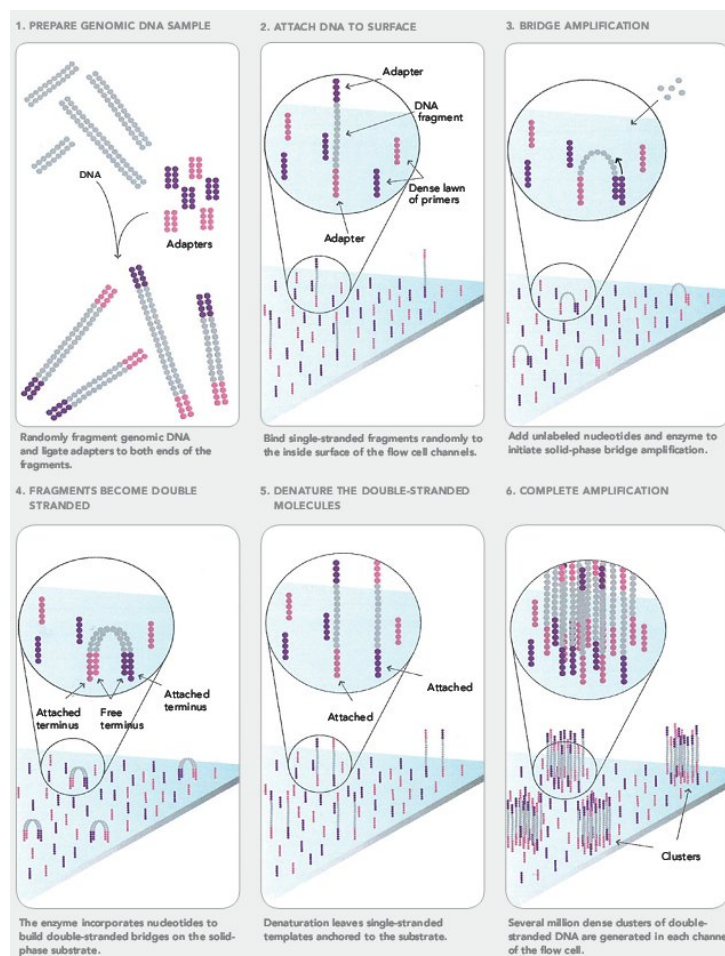
Entre as tecnologias utilizadas para caracterizar transcritos, a *Next Generation Sequencing* (NGS) (ILLUMINA, 2012) tem sido muito empregada, pois permite flexibilidade e acurácia em estudos de genomas e transcriptomas (BOMAR et al., 2011).

Na tecnologia Illumina, adaptadores são ligados nas extremidades dos cDNAs obtidos a partir dos transcritos resultantes do processo de extração de mRNA. Posteriormente, estas sequências são ligadas à placa de sequenciamento por meio dos adaptadores. Estas sequências sofrem, então, amplificação em ponte, sendo formados complexos (*clusters*) de amplificação, os quais são lidos por um sistema de emissão laser e captação por câmera CCD, permitindo a identificação das bases incorporadas.

As etapas do sequenciamento (Figura 5) na plataforma Illumina são detalhadas a seguir: (1) DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado aos adaptadores A e B em ambas as extremidades. (2) As moléculas de DNA em fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B. Durante a etapa de recozimento (3), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Com os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como *primer* (3 e 4). Na etapa de desnaturação (5), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de

recozimento (4), formando novas pontes e iniciando um novo ciclo de amplificação. (6) Após vários ciclos, são obtidos *clusters*. Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser, é gerado um sinal, que é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da molécula de DNA. O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência. A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada cluster.

Figura 5. Sequenciamento em Illumina HiSeq 2000. 1 – preparação de uma amostra genômica com fragmentação do DNA e ligação de adaptadores; 2 – ligação do DNA à superfície da placa; 3 e 4 – amplificação em “ponte”; 5 – desnaturação com liberação das extremidades da dupla fita; 6 – *clusters* completos. Fonte: <http://tucf-genomics.tufts.edu/home/faq>.



Segundo Damon e colaboradores (2012), os estudos de genômica ambiental possibilitados pelas novas plataformas de sequenciamento, oferecem oportunidades para entender, em nível molecular, processos complexos tais como a assimilação da matéria orgânica, já que permitem o acesso aos genes expressos em um sistema decompositor. Dessa forma, é possível fazer uma ponte entre dados globais obtidos no campo e os alvos de abordagens genômicas.

No presente trabalho, detalhamos a construção, sequenciamento na plataforma Illumina e análise do transcriptoma da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa*. A partir dos dados gerados, este transcriptoma foi anotado completamente para seleção de genes relacionados à nutrição das formigas que foram identificados e analisados quanto ao seu perfil de expressão.

Algumas vias metabólicas relacionadas à nutrição e a outros processos vitais nas formigas também foram abordadas. Entender o funcionamento de vias metabólicas é fundamental para elucidar a relação simbiótica entre a formiga, o fungo e os demais componentes bióticos existentes nos ninhos e para o reconhecimento de alvos moleculares de interferência que, interrompendo tais vias, possam ser úteis no controle de formigas pragas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar e analisar os transcritos envolvidos no metabolismo de *A. sexdens rubropilosa* e de micro-organismos associados a esta formiga, bem como na

produção de antibióticos microbianos a partir do transcriptoma anotado e da seleção das vias mais diversas.

2.2. Específicos

Analisar as vias metabólicas e os perfis de expressão dos genes de interesse selecionados e verificar a viabilidade na utilização da transcriptômica para identificar diferenças entre organismos comparando com dados de genômica já disponíveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de formigas

Os soldados de *A. sexdens rubropilosa* foram coletados em trilhas de um mesmo ninho monogínico na região de Rio Claro (W 22°23.706' e S 47°32.545'), sob licença IBAMA – SISBIO 33487-2.

3.2. Extração de RNA

Utilizou-se 0,67 g de soldados macerados em nitrogênio líquido para a extração de RNA utilizando o método Trizol (Invitrogen®) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os soldados foram divididos em oito tubos para facilitar o processamento e viabilizar o trabalho utilizando o método mencionado.

3.3. Quantificação e verificação da pureza do RNA

A quantificação e verificação da pureza do RNA foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.4. Construção e sequenciamento de biblioteca transcriptômica

A construção e sequenciamento da biblioteca transcriptômica foram realizadas pela empresa Macrogen Inc. (Seul, KR), como serviço terceirizado, utilizando a plataforma HiSeq 2000 da Illumina.

3.4.1. Construção da Biblioteca

Para construção das bibliotecas e sequenciamento dos transcriptomas de *A. sexdens rubropilosa*, a empresa contratada necessitou de 10 µg de RNA total diluídos em volume máximo de 50 µL. A amostra ASR5 satisfazendo a estas condições foi selecionada e enviada para sequenciamento.

A empresa contratada também realizou testes para verificação de qualidade e quantidade de RNA por amostra.

Após a construção da biblioteca, realizou-se o controle de qualidade para então prosseguir com o sequenciamento em instrumento *HiSeq 2000*.

Nesta etapa realiza-se a verificação do tamanho dos fragmentos das bibliotecas com o mesmo 2100 Bioanalyzer (Agilent). Para se conseguir a densidade ótima de *clusters* em cada canaleta da célula de fluxo, as bibliotecas foram quantificadas de acordo com o Protocolo de Quantificação qPCR da Illumina. Além

disso, para cálculo da concentração das amostras foi utilizada uma solução padrão da Roche.

3.5. Análises de Bioinformática

3.5.1. Análise da qualidade dos *reads*

As análises foram conduzidas em um servidor de alto desempenho (98 GB de memória e 8 TB de HD), sistema operacional Linux/Debian 6.0.6, com auxílio da bolsista de Treinamento Técnico Nível 5 (TT5), especialista em Bioinformática, Milene Ferro (Processo FAPESP 2013/02098-8).

Análises estatísticas iniciais nos *reads* foram feitas usando o programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para verificar a qualidade dos *reads* gerados pela plataforma Illumina (paired end 2x100pb). Os *reads* foram nomeados 1 ou 2 para paired-end Illumina, onde 1 indica *reads* reversos e 2 indica *reads* diretos (*reverse* e *foward*, respectivamente).

3.5.2. Montagem *de novo*

Em organismos sem um genoma de referência, um sequenciamento massivo de Illumina combinado a uma montagem eficiente de transcritoma, tem mostrado resultados comparáveis àqueles analisados com o auxílio de um genoma de referência, incluindo cobertura suficiente para análise da expressão diferencial (WANG et al., 2009; SURGET-GROBA and MONTOYA-BURGOS, 2010; SCHLIESKY et al., 2012). Partindo deste princípio, a montagem foi realizada

utilizando o *software* Trinity, desenvolvido para construção de transcriptoma *de novo* a partir de dados de RNA-seq (GRABHERR et al, 2011). No parâmetro --JM deve-se considerar 1 GB para cada 1 milhão de pares de *reads* Illumina. Assim, foi usado: R5 = 80 GB. A utilização deste parâmetro simula o que ocorre em Velvet (Khmer=43). Assim, foram obtidos 108.092 *contigs*.

Os *contigs* foram filtrados por tamanho e os menores que 300 pb foram descartados.

3.5.3. Retirada de Isoformas

O programa Trinity de montagem de transcritos gera várias isoformas para um mesmo gene (locus). Contudo, para a anotação usa-se apenas uma isoforma.

Oono e colaboradores (2014) descreveram que foi feita a filtragem de tamanhos utilizando o maior *contig* obtido após a montagem, gerando um conjunto de sequências sem redundâncias. Essa mesma abordagem foi utilizada para *A. sexdens rubropilosa*.

3.5.4. Anotação

A identificação das sequências foi feita utilizando o banco de dados NR do NCBI, sendo que essa base foi formatada e utilizada para executar o programa blastx do pacote BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Como, mesmo após a retirada de isoformas, a quantidade de transcritos e o banco de dados era muito grande, o programa foi executado via linha de comando em nosso servidor. Após a identificação, os transcritos tiveram anotação completa utilizando a versão Pro do

programa Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005). O Blast2GO é uma ferramenta *web* para análise funcional de sequências.

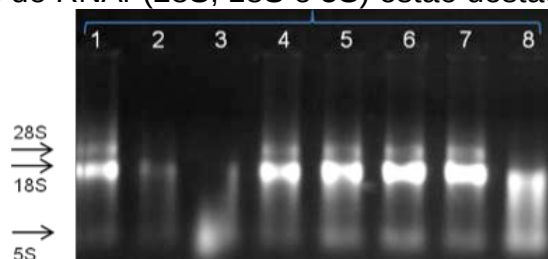
O sistema de ontologias utilizado pelo Blast2GO é o Gene Ontology (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2000), como uma tentativa de padronizar a representação dos genes e seus produtos para todos os sistemas biológicos, subdividindo-os em três categorias: processo biológico, função molecular e componente celular. A versão utilizada permitiu fazer buscas *online* por sequências similares – BLAST (ALTSCHUL, 1990), por assinaturas proteicas similares - InterPro (ZDOBNOV; APWEILER, 2001), por código da enzima – EC (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) e visualização dos mapas metabólicos onde os genes e/ou seus produtos atuam – KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000). Desta forma, foi possível inferir prováveis funções e ontologias para as sequências e completar a anotação com GO, EC, InterPro e KEGG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de RNA

O sucesso da extração de RNA pode ser avaliado na Figura 6. Nota-se que em algumas amostras a banda 28S apresenta-se fraca ou ausente. Não apenas em insetos, como em outros organismos, este fenômeno ocorre graças ao processamento sofrido pelo RNAr, de forma que o domínio 28S (± 4 Kb) sofre uma quebra central, na região *hidden break*, resultando em dois fragmentos iguais que correm juntos com o domínio 18S (± 2 Kb). Este evento é denominado *gap processing* (BASILE-BORGLA *et al.*, 2005; GILLESPIE *et al.*, 2006).

Figura 6. Gel de Agarose 1%, corado com GelRed, mostrando resultado da extração de RNA total. As bandas de RNAr (28S, 18S e 5S) estão destacadas pelas setas.



4.2. Quantificação e verificação da pureza

Os resultados obtidos após a quantificação podem ser avaliados na Tabela 1. Foram obtidas grandes quantidades de RNA de alta qualidade (relação 260/280 $\geq$ 1,9).

Tabela 1. Quantificação e pureza das amostras resultantes da extração de RNA.

Amostra	[] ng/ μ l	A260	A280	260/280*
ASR1	340,1	8,502	4,210	2,02
ASR2	41,5	1,038	0,600	1,73
ASR3	68,9	1,723	0,946	1,82
ASR4	248,3	6,208	3,094	2,01
ASR5	914,8	22,870	10,859	2,11
ASR6	1031,3	25,782	12,349	2,09
ASR7	942,7	23,568	11,401	2,07
ASR8	745,9	18,646	8,807	2,12

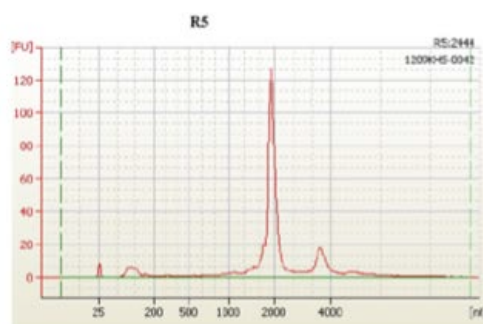
*Pureza da amostra. Relaciona quantidade de RNA com proteína.

4.3. Construção da Biblioteca Transcriptômica

A amostra selecionada para sequenciamento foi a R5, com concentração de 914ng/ μ L, pureza de 2,11 e concentração total de 18.280ng em 20 μ L. O resultado

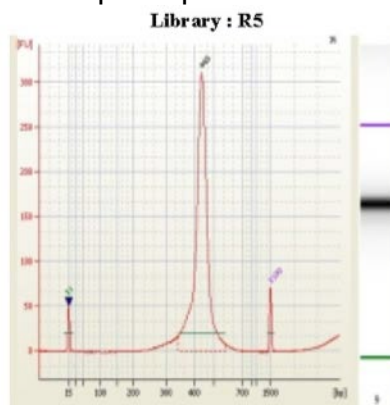
do controle de qualidade realizado utilizando o equipamento 2100 BioAnalyzer (Agilent) demonstrou uma concentração de 420,92ng/μL, totalizando 13,89μg de RNA em 33μL. Além disso, o valor de integridade (RIN) foi de 9,4. Concentrações acima de 8, são viáveis para sequenciamento. O valor de razão entre as bandas 28S e 18S foi de 0,14. Embora os valores ideais são acima de 1,5, devido ao fenômeno *gap processing* este valor esteve abaixo do ideal. O gráfico de *Bionalyzer RNA nanochip* com Número de Integridade do RNA (RIN) pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7. Eletroferograma obtido pelo software *RNA Integrity Number* (RIN) para a amostra recebida pela MacroGen.



Os resultados de controle de qualidade da biblioteca construída pela MacroGen demonstram que a concentração da biblioteca R5 foi de 97,71ng/μL, 341,63nM e tamanho aproximado de 440pb. Os critérios para controle de qualidade são: maior que 1,5; 5 e entre 300 a 500pb, respectivamente. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 8.

Figura 8. Perfil *Bioanalyzer* para verificação dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca R5. Pela posição dos picos pode-se inferir o tamanho de 440 pb.

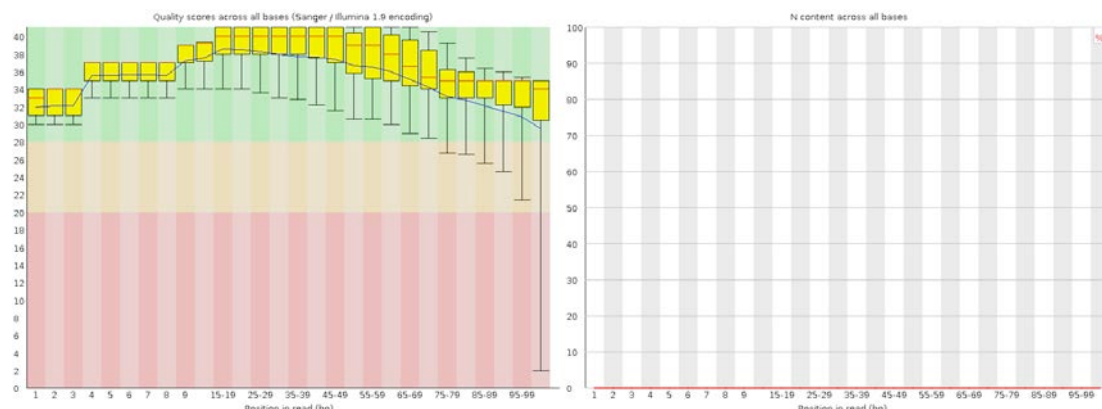


A biblioteca apresentou boa qualidade e os tamanhos dos fragmentos estavam de acordo com o esperado. Desta forma, a biblioteca foi sequenciada em ambos os sentidos (2x100 pb), em uma mesma canaleta da célula de fluxo em equipamento *HiSeq 2000*.

4.4. Análise da qualidade dos *reads*

Os dados de sequenciamento da biblioteca de *A. sexdens rubropilosa*, obtido pelo *pipeline* CASAVA v1.8.2, para dados Illumina demonstrou que a amostra R5 gerou 15.661.794.068 bases com 150.067.268 *reads*, onde o valor de bases não identificadas (N) foi 0,005%, conteúdo de bases C e G (GC) 40,06% e qualidades FASTQ baseada nos valores Phred de Q20 95,94% e Q30 90,69%. Desta forma, estes resultados, que também podem ser visualizados na Figura 9 mostram que os *reads* apresentaram qualidade acima de Phred 28 e que não havia bases anotadas como N presentes nos *reads*. Além disso, não havia *reads* super-representados. Portanto, não foi necessário fazer filtragem de qualidade, de adaptadores ou bases N.

Figura 9. Gráficos de análise de qualidade das sequências gerados pelo FASTQC. À esquerda, análise de qualidade de cada base. À direita, análise mostrando a ausência de bases não identificadas (N).



A biblioteca era composta por dois arquivos compactados, no formato FASTQ e com tamanho variando entre 16 e 20 GB cada. Ambos foram descompactados e concatenados.

4.5. Filtro de tamanho e redundâncias

Após passar pelo filtro de tamanho, restaram 86.259 *contigs* com 300 pb ou mais (79,8 %) para seguir as análises.

Após a retirada de isoformas, 59.891 *contigs* eram redundantes e foram excluídos das análises posteriores, que foram realizadas com os 26.368 *contigs* restantes.

4.6. Sequências resultantes para análise

De todos os *contigs* gerados, apenas 26.358 *contigs* foram analisados. Dez sequências foram excluídas da anotação no Blast2Go, já que os respectivos *contigs* eram maiores que 8.000 pb. Devido a uma limitação do programa, sequências deste comprimento não podem ser analisadas (MUJTAR et al., 2014).

4.7. Análise comparativa dos genes de *Atta sexdens rubropilosa*

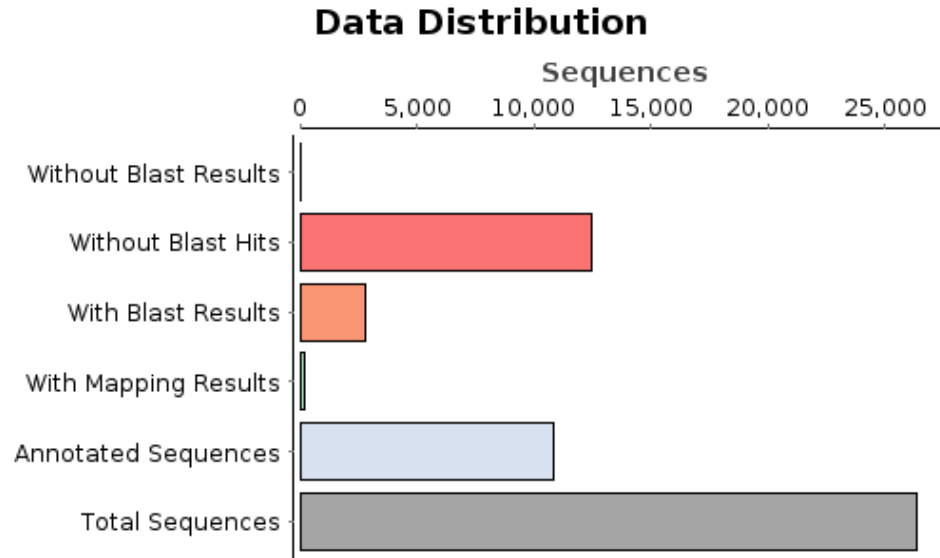
Os dados obtidos da biblioteca de *A. sexdens rubropilosa* estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 2. Dados da biblioteca de *A. sexdens rubropilosa*, obtidos após sequenciamento, montagem e anotação de sequências.

Total de <i>reads</i>	155.067.268
Total de pares de bases	15.661.794.068
Comprimento médio dos <i>reads</i>	200 pb
Total de <i>contigs</i>	108.092
Total de <i>contigs</i> após filtro de tamanho	86.259
Comprimento médio dos <i>contigs</i>	300 pb a 8.000 pb
Total de <i>contigs</i> após filtro de isoformas	26.368
Total de <i>unigenes</i>	13.865
Cobertura	47X

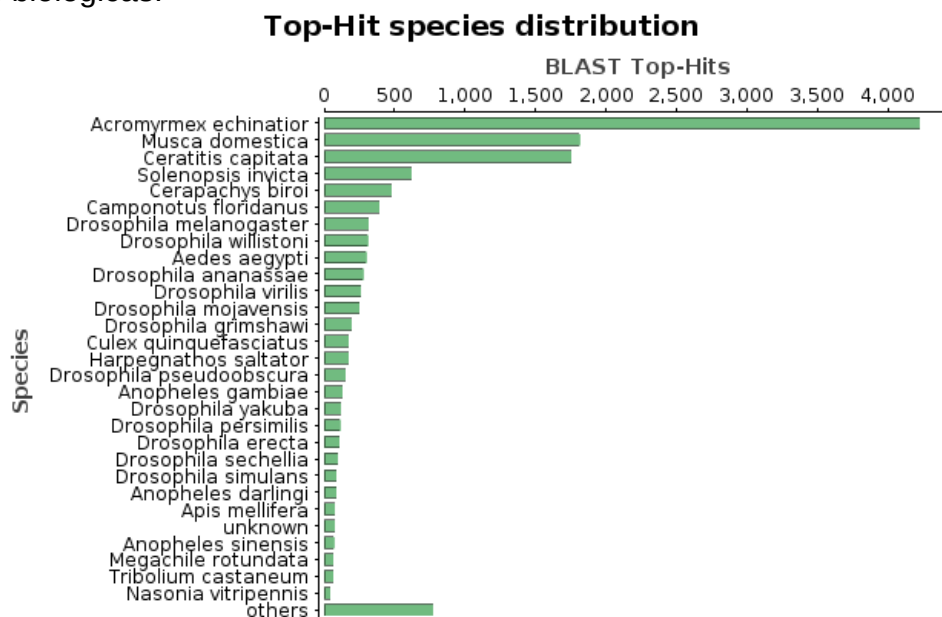
Ao utilizar o Blastx (E-value $\leq 10e-5$, consultadas na base de dados não redundante – NR –, com valor *cut-off* $10e-6$), foram encontrados 13.865 *unique sequences* (US) (52,58%) combinados significativamente com sequências do GenBank (Figura 10). Destas, 10.842 (78,2%) foram anotadas, incluindo dados de Blast, GO, EC e InterPro. Porcentagens de *hits*, tais como as obtidas neste trabalho, estão entre o valor esperado já que os valores publicados atualmente estão entre 59% (BOUZID et al., 2014), 55% (RANJAN et al., 2014) e 42,01% (CAO et al., 2014).

Figura 10. Distribuição da dados resultantes após consulta de sequências contra o GenBank, onde 12.493 sequências não obtiveram semelhantes.



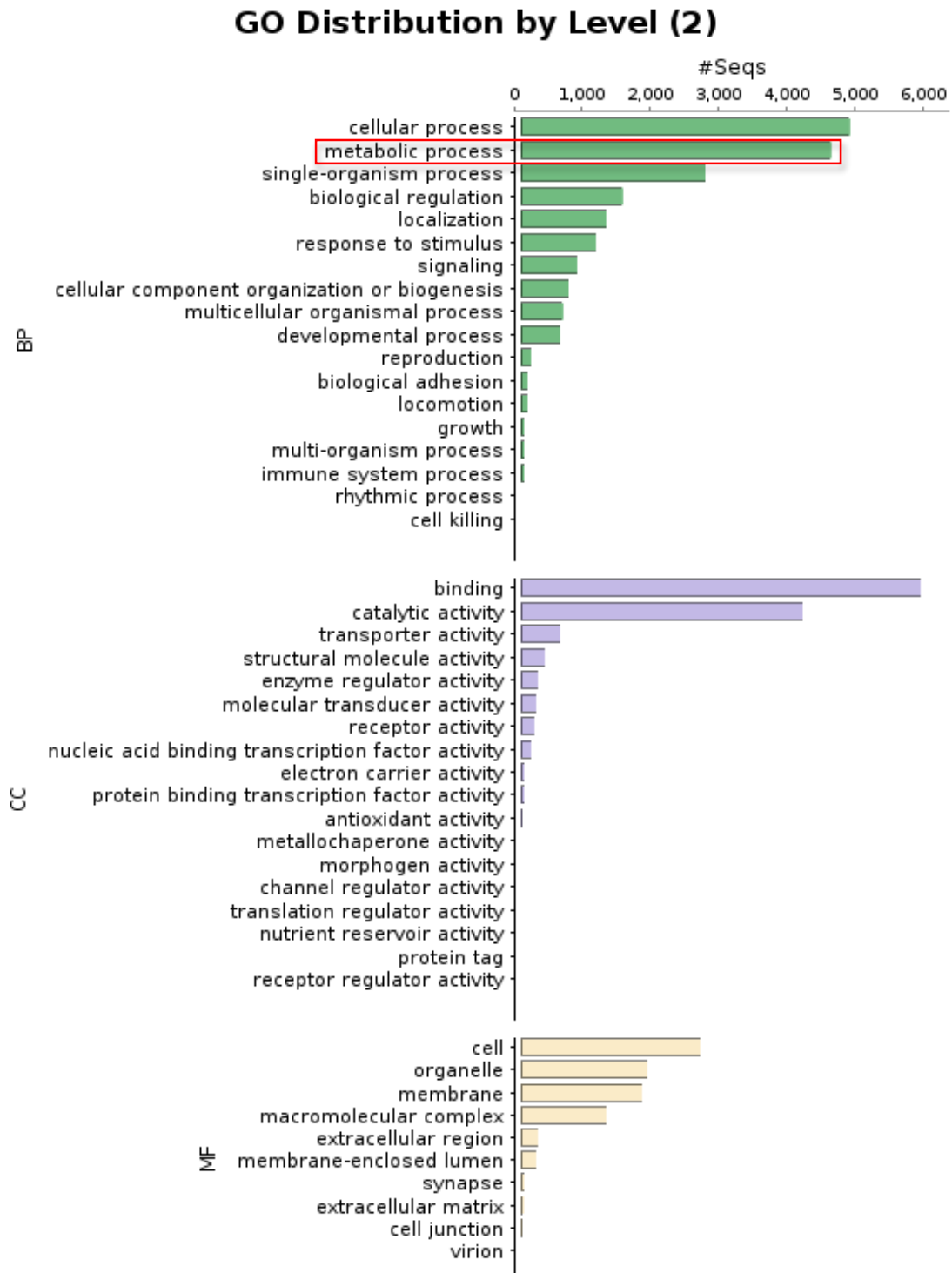
A maior parte dos melhores *hits* obtidos foi proveniente dos genomas de *Acromyrmex echinator*, mosca doméstica e *Ceratitis capitata* (Figura 11). Apenas 84 *hits* foram provenientes do genoma de *Apis mellifera* (versão 4.5), que é filogeneticamente próxima às formigas e com genoma anotado disponível em banco de dados (JOHNSON, et al. 2013).

Figura 11. Distribuição da abundância de *top-hits* encontrados em diferentes espécies biológicas.



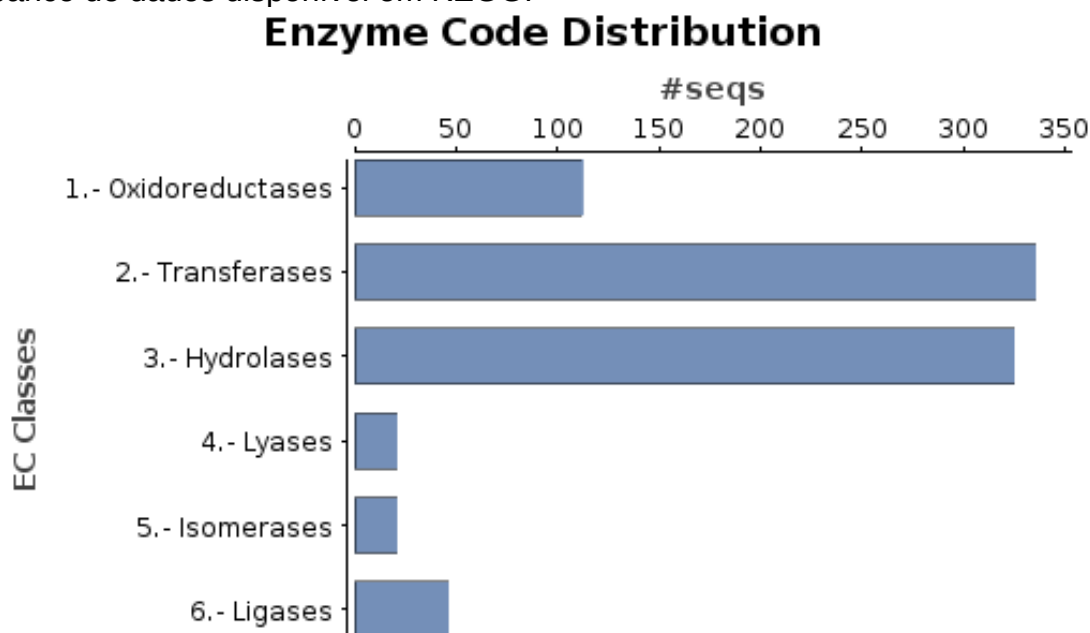
Dentre os 11.045 transcritos com pelo menos uma atribuição para GO, 4.935 transcritos foram anotados na categoria processo biológico (GO:0008150), 9.196 em função molecular (GO:0003674) e 4.064 em componente celular (GO:0005575), resultando 44,68%, 83,25% e 36,79% dos transcritos anotados, respectivamente (Figura 12). Por questões didáticas na visualização da imagem, o nível 2 foi selecionado para análise, onde pode ser visualizado o processo metabólico.

Figura 12. Distribuição dos termos de GO no nível 2 para cada categoria, que inclui: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). Retângulo vermelho evidencia seleção de processo metabólico, selecionado para análise de vias.



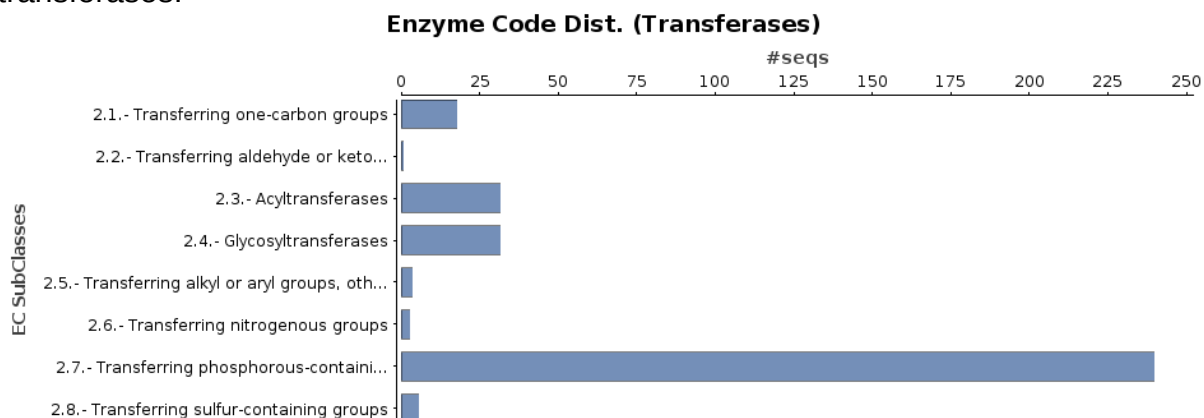
Além disso, 866 transcritos foram anotados como enzimas e confirmados pelo número de EC, disponível em KEGG. As transferases ocuparam a classe de enzimas mais abundantes, seguidas pelas hidrolases e oxirredutases (Figura 13).

Figura 13. Distribuição da abundância de classes enzimáticas de acordo com banco de dados disponível em KEGG.



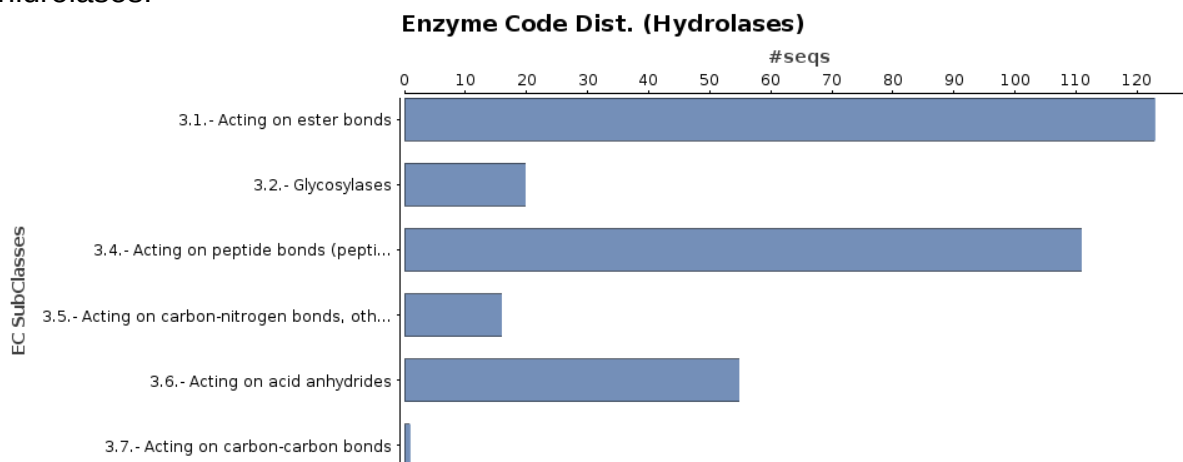
No caso das formigas, uma família de enzimas significativa correspondeu às glutathione transferases. As glutathione transferases (GSTs), também conhecidas historicamente como glutathione – S – transferases, compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Nas formigas, a atuação das GSTs é uma importante estratégia de defesa da célula na detoxificação de inseticidas (HAMOUDA, 2008). A subclasse mais abundante compreende enzimas que atuam na transferência de fósforo entre um composto doador e um receptor (Figura 14).

Figura 14. Detalhe da distribuição funcional das enzimas incluídas no grupo das transferases.



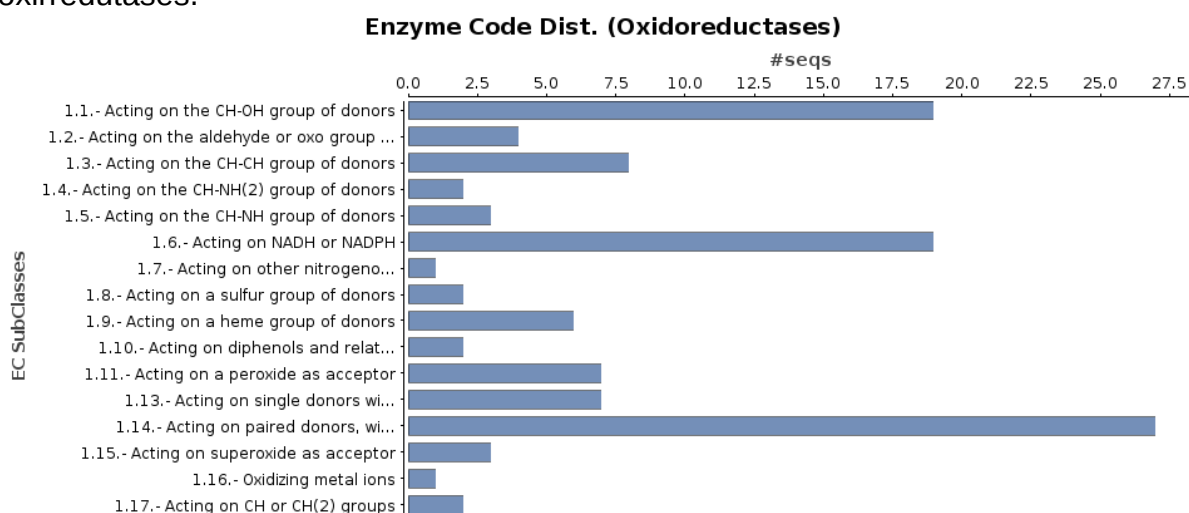
As hidrolases, por sua vez, atuam na degradação de biomassa catalisando a clivagem de uma ligação covalente com água. Também incluem esterases, fosfatases e peptidases que atuam sobre as ligações éster, fosfato e amido em peptídeos, respectivamente (HARVEY et al.; 2000). As subclasses mais abundantes compreendem enzimas que atuam em ligações de éster, seguidas das que atuam em ligações peptídicas (Figura 15). Isso indica que estas podem ser enzimas importantes na degradação da biomassa vegetal, que pode ocorrer com a cooperação entre enzimas das formigas e enzimas do fungo mutualista *L. gongylophorus* (BACCI et al., 2013). Os detalhes a respeito desta cooperação serão investigados nas demais vias metabólicas caracterizadas para *A. sexdens rubropilosa*.

Figura 15. Detalhe da distribuição funcional das enzimas incluídas no grupo das hidrolases.



Oxirredutases são metaloenzimas que catalisam a transferência de elétrons de um substrato para uma espécie receptora de elétrons, ou que catalisam a transferência de elétrons acoplada a transferência de oxigênio (KAIM e SCHWEDERSKI, 1994). Este grupo de enzimas geralmente utiliza NAD^+ ou NADP como cofatores. A subclasse mais abundante neste trabalho compreendeu oxirredutases agindo em doadores pareados, incorporando ou doando molécula de oxigênio (Figura 16). Esse processo é fundamental na desidrogenação de aminoácidos fundamentais na nutrição das formigas (AYLWARD, 2013)

Figura 16. Detalhe da distribuição funcional das enzimas incluídas no grupo das oxirredutases.



4.8. Análise comparativa das vias metabólicas de *A. sexdens rubropilosa*

Após o sequenciamento completo do genoma de *A. mellifera* (WEINSTOCK et al., 2006), foi possível entender melhor a vida social em nível molecular, não apenas das abelhas, como outras espécies sociais. Além disso, um banco de dados enriquecido permitiu análises mais detalhadas para pesquisas futuras.

Aqui, buscamos avaliar a aplicação de dados transcriptômicos para comparar algumas vias metabólicas cujas enzimas são codificadas pelo genoma de *A. mellifera*, disponíveis em KEGG, com aquelas vias identificadas a partir dos dados do transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*. Para tanto, selecionamos as vias metabólicas onde detectamos, em *A. sexdens rubropilosa*, a maior quantidade de componentes, identificados a partir de seus transcritos. Logo, vias com menos de 5 componentes em *A. sexdens rubropilosa* não estão presentes neste trabalho.

A comparação das informações presentes nas vias pode evidenciar a expressão de unidades presentes em *A. sexdens rubropilosa*, que podem não existir em *A. mellifera*.

4.8.1. Vias Metabólicas

4.8.1.1. Metabolismo de purinas

Nucleotídeos de purina e pirimidina são precursores de formas ativas de carboidratos e lipídios. Além disso, nucleotídeos derivados de vitaminas são cofatores em processos metabólicos (NELSON e COX, 2011). Para os insetos, especificamente, a via de metabolismo de purinas (Figura 17 e Figura 18) é

essencial para o crescimento de células epiteliais, síntese de novos exoesqueletos e desenvolvimento de órgãos reprodutivos internos e externos (CHAPMAN, 2013). Este caminho também é importante para bases purínicas livres a serem reutilizadas na biossíntese de ácidos nucleicos e nucleotídeos e na homeostase dos insetos (WREN, 1997; CARTER et al., 2008).

Figura 17. Via metabólica da purina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem integridade da via a que pertencem.

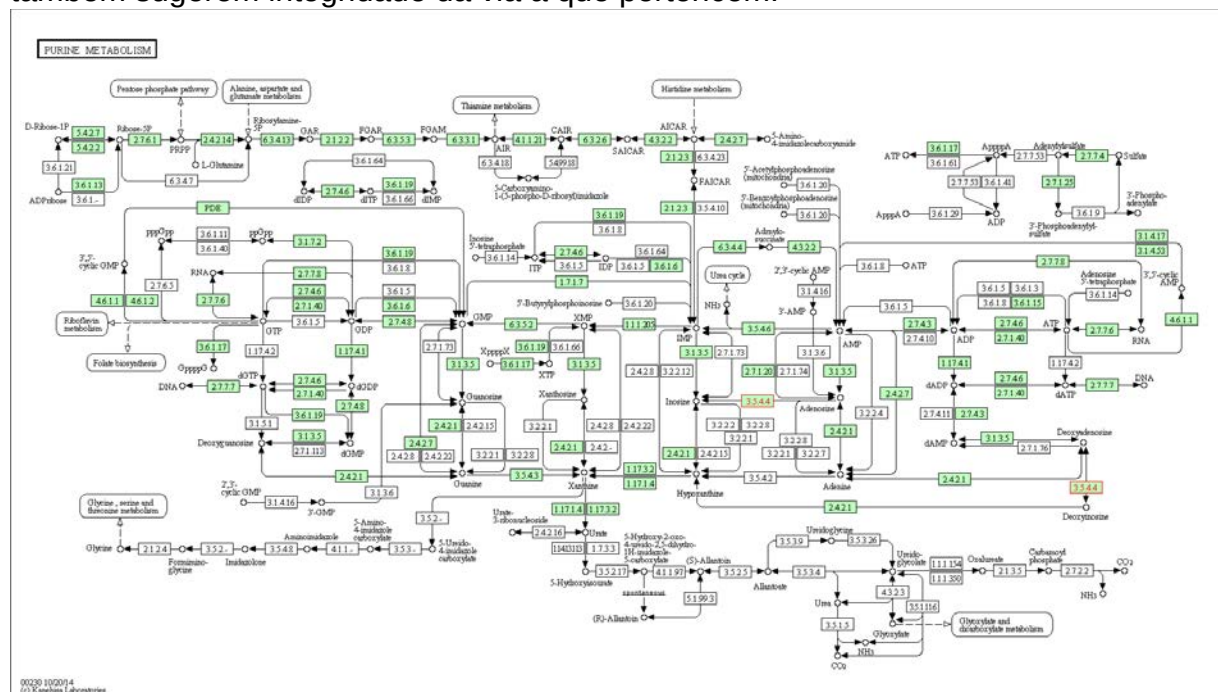
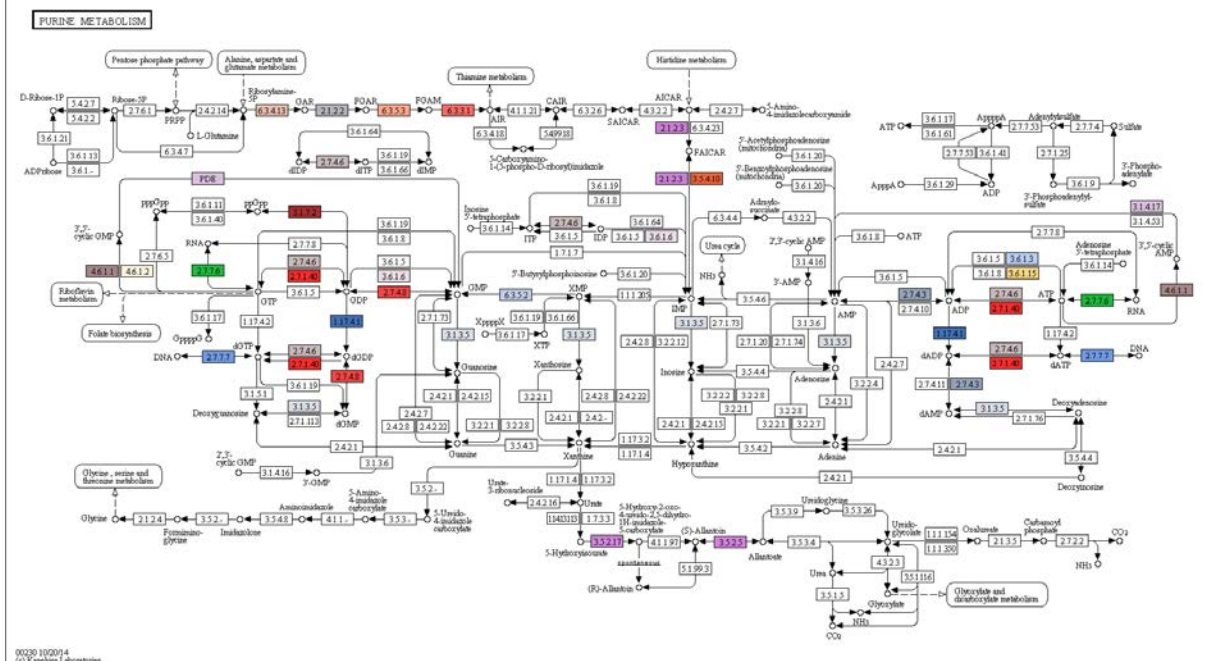
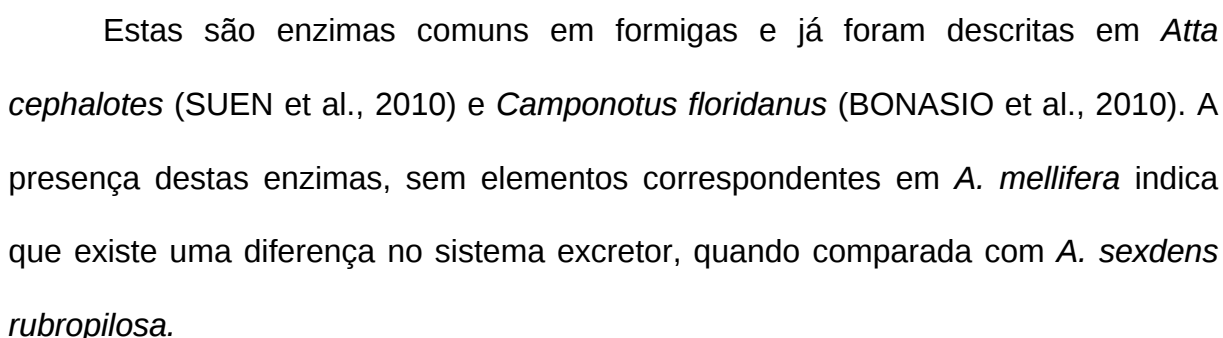


Figura 18. Via metabólica da purina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos, cores diferentes indicam enzimas diferentes.



Após sobreposição das vias (Figura 19), foi possível observar em *A. sexdens rubropilosa* a presença de duas sequências codificantes ausentes em *A. mellifera*:

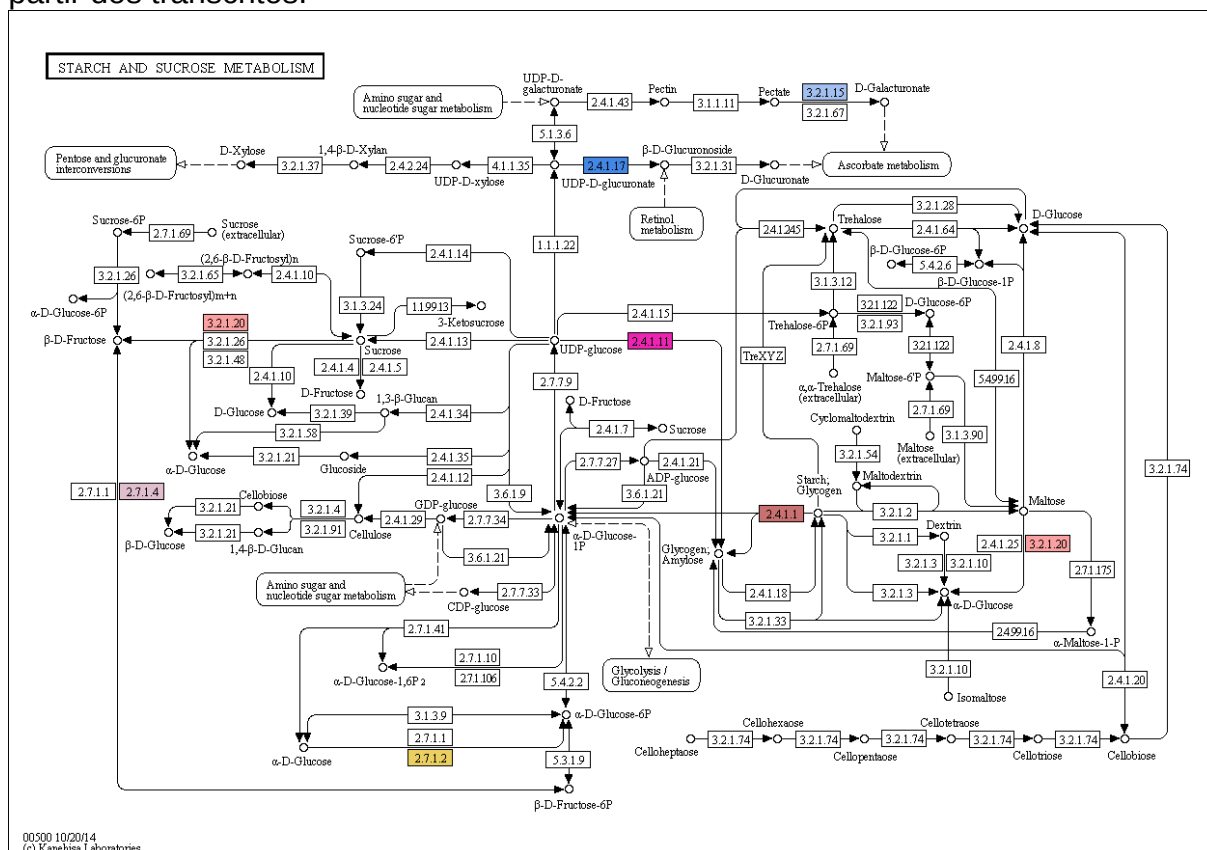
- **3.5.2.17:** gene da *Hydroxysourate hydrolase*, enzima que catalisa a hidrólise de 5-hydroxysourate em 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline, assim o urato produzido pelo metabolismo de purina é convertido em S-alantoína (RAMAZZINA et al., 2006).
- **3.5.2.5:** gene da *Allantoinase*, enzima que catalisa a hidrólise de ácido alantóico a alantoína. Esta reação é um passo fundamental na via de degradação de purinas, que produz resíduos nitrogenados para excreção (GAINES et al. 2004).



O processo de degradação vegetal é um trabalho iniciado pelas formigas e finalizado pelo fungo simbiote, que libera nutrientes a serem utilizados pelas formigas tais como proteínas, carboidratos e açúcares (BACCI et al., 1995). O

[illegible]

Figura 21. Via metabólica da purina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.



Após sobreposição das vias (Figura 22), foi possível observar em *A. sexdens rubropilosa* a presença de três sequências codificadoras ausentes em *A. mellifera*:

- 2.7.1.4: gene da *Fructokinase*, enzima que catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP (substrato) como o passo inicial na utilização da frutose. O principal papel da frutoquinase é no metabolismo de carboidratos, mais especificamente, frutose e sacarose (ISHIMOTO et al., 2012).
- 2.7.1.2: gene da *Glucokinase*, enzima útil em um conjunto de diferentes de funções. A glucoquinase tem uma menor afinidade para a glucose do que as outras hexoquinases. Não existe relato sobre a sua função em insetos, mas em micro-organismos sua função já foi

despolimerizado, proporcionando acesso aos nutrientes intracelulares vegetais. Dentre os nutrientes, destaca-se o amido que é fonte de nutrientes tanto para as formigas quanto para o seu fungo mutualista (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2003).

4.8.1.3. Metabolismo de Glicina, Serina e Treonina

Tanto a formação da serina quanto a sua utilização catabólica estão relacionadas ao metabolismo da via glicolítica (Figura 23 e Figura 24). Desta forma, a serina é considerada um aminoácido gluconeogênico importante. Outra possibilidade metabólica é a sua incorporação a glicofosfolípídeo e esfingolipídios. Sua conversão em glicina se traduz, por outro lado, em uma fonte de grupos monocarbonados para a síntese de purina e timina (HERNANDÉZ e MEDINA, 2010). A glicina é um dos aminoácidos com mais atribuições fisiológicas. É também utilizada na síntese de diversos compostos nitrogenados como a glutathione, porfirinas e purinas. Além disso, a glicina, quando conjugada ao ácido benzóico, desencadeia uma reação de destoxificação similar à que ocorre em animais superiores (SHYMALA, 1964; ASSAR, et al., 2012). A treonina é um aminoácido essencial. Sua metabolização pode produzir glicina e acetil-CoA, ou alternativamente, succinil-CoA. Assim, pode ser considerado tanto gluconeogênico, quanto cetogênico (HERNANDÉZ e MEDINA, 2010; CHAPMAN, 2013).

Figura 23. Via metabólica de glicina, serina e treonina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde com borda preta indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.

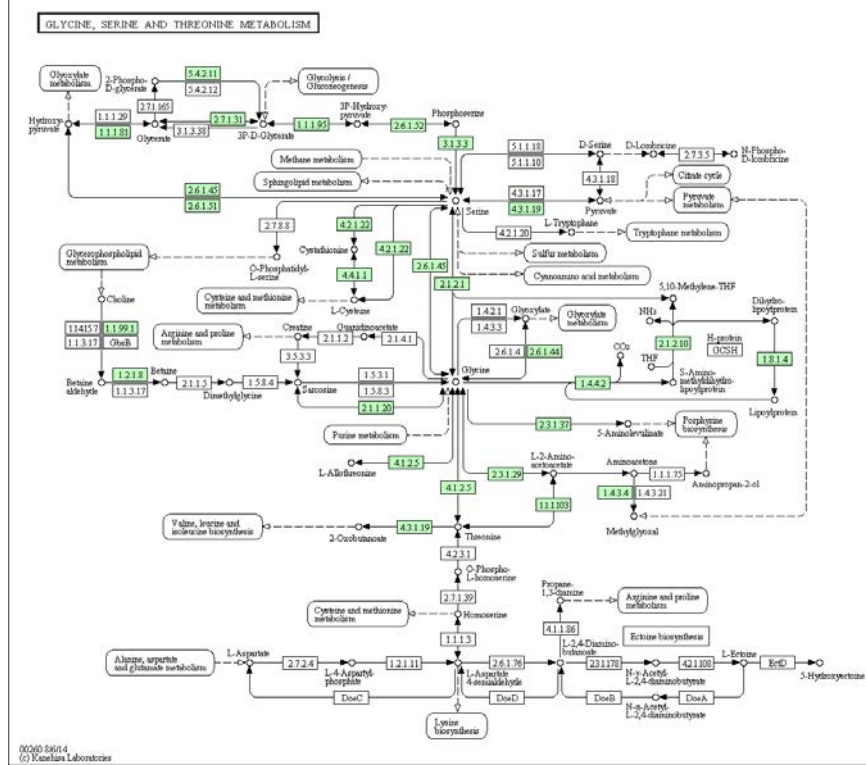
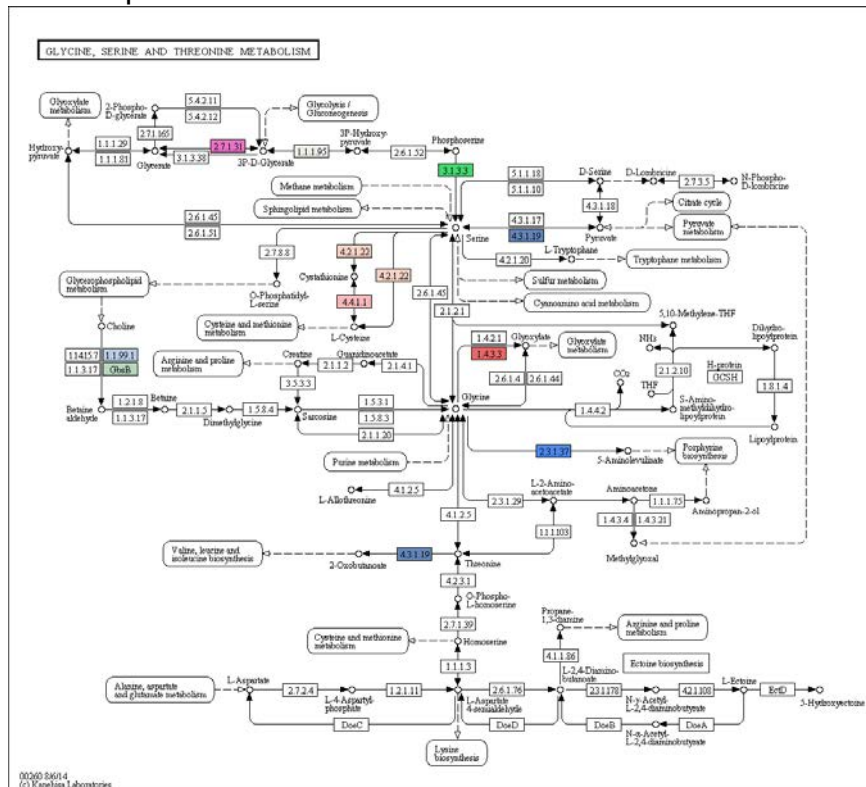
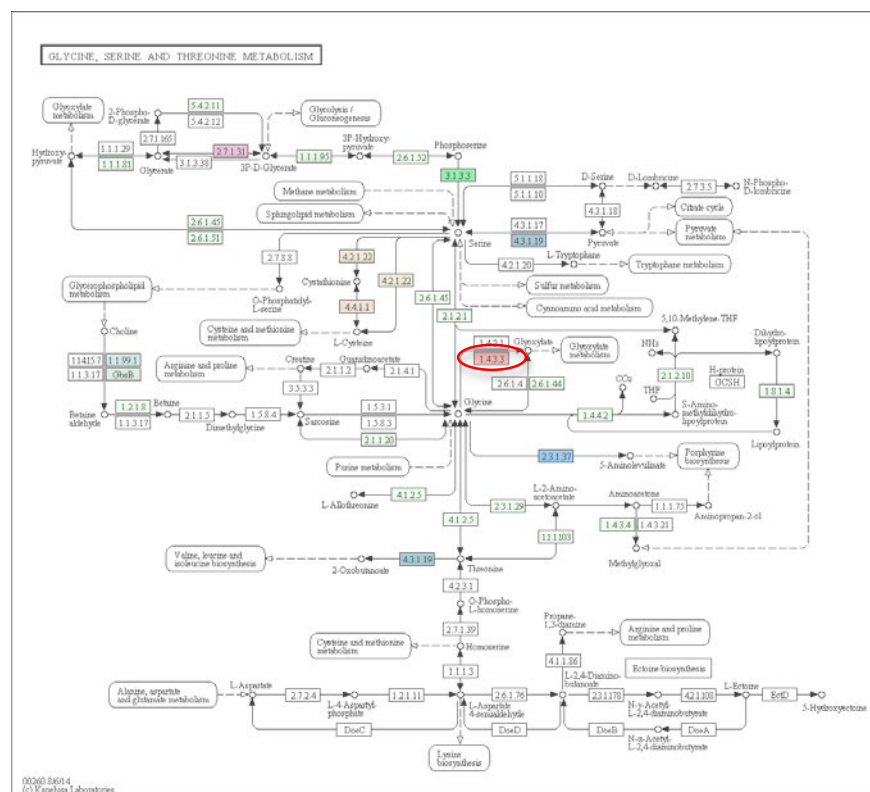


Figura 24. Via metabólica da glicina, serina e treonina em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.



A sobreposição das vias (Figura 25) indica a presença da sequência codificadora da enzima *D-amino acid oxidase* (1.4.3.3). D-aminoácido oxidase é uma enzima peroxissomal contendo cofatores expressos numa grande variedade de espécies de leveduras a humanos, ausente em plantas e bactérias. Atua como oxidante de D-aminoácidos e já foi encontrada no genoma de *A. cephalotes* (SUEN et al., 2010).

Figura 25. Sobreposição das vias metabólicas de glicina, serina e treonina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculo vermelho destaca as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.



4.8.1.4. Metabolismo de Arginina e Prolina

Prolina e arginina (Figura 22 e Figura 23) são dois aminoácidos essenciais. A arginina é fundamental na nutrição de vários insetos (HOUSE, 1965) e estudos indicam que durante a transição evolucionária os insetos perderam a capacidade de biossintetizar a arginina (TAMIR e RATNER, 1963). A prolina, por sua vez, é conhecida por ser uma possível reserva de energia e utilizada como substrato primordial durante o voo de algumas espécies (CHAPMAN, 2013). Além disso, segundo Hackman (1953), proteínas cuticulares possuem uma grande quantidade de prolina.

Figura 26. Via metabólica de arginina e prolina em *A. mellifera* disponível em KEGG. Retângulos preenchidos em verde com borda preta indicam a presença das enzimas no genoma e também sugerem a integridade da via a que pertencem.

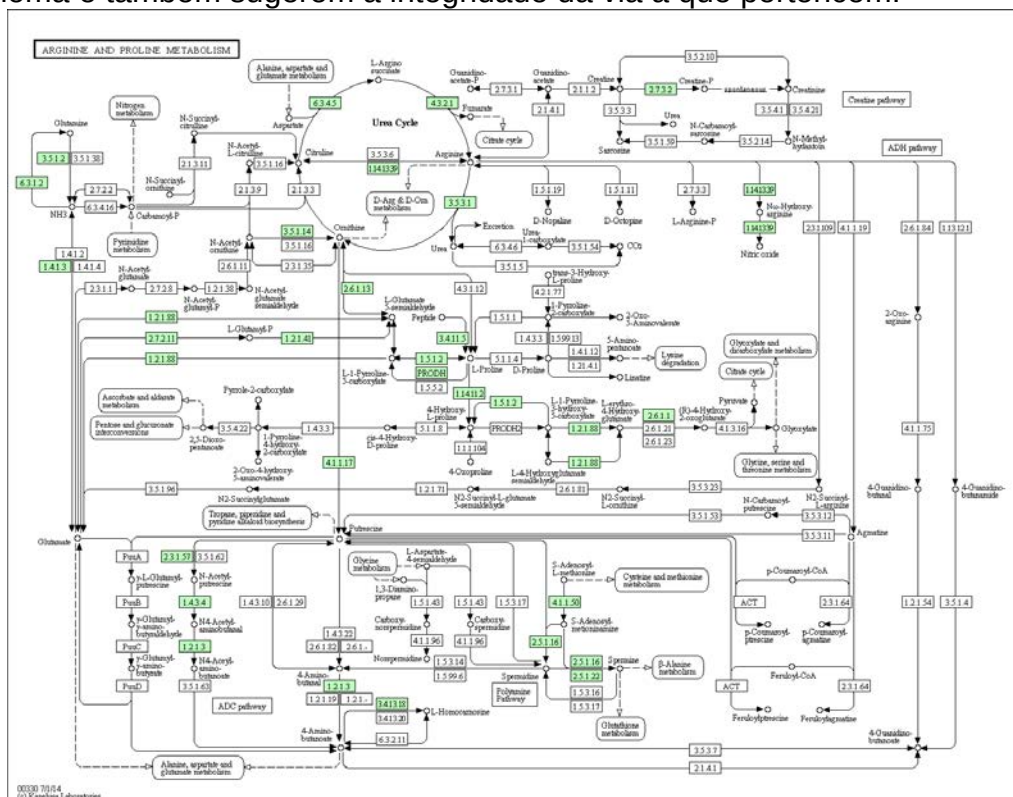
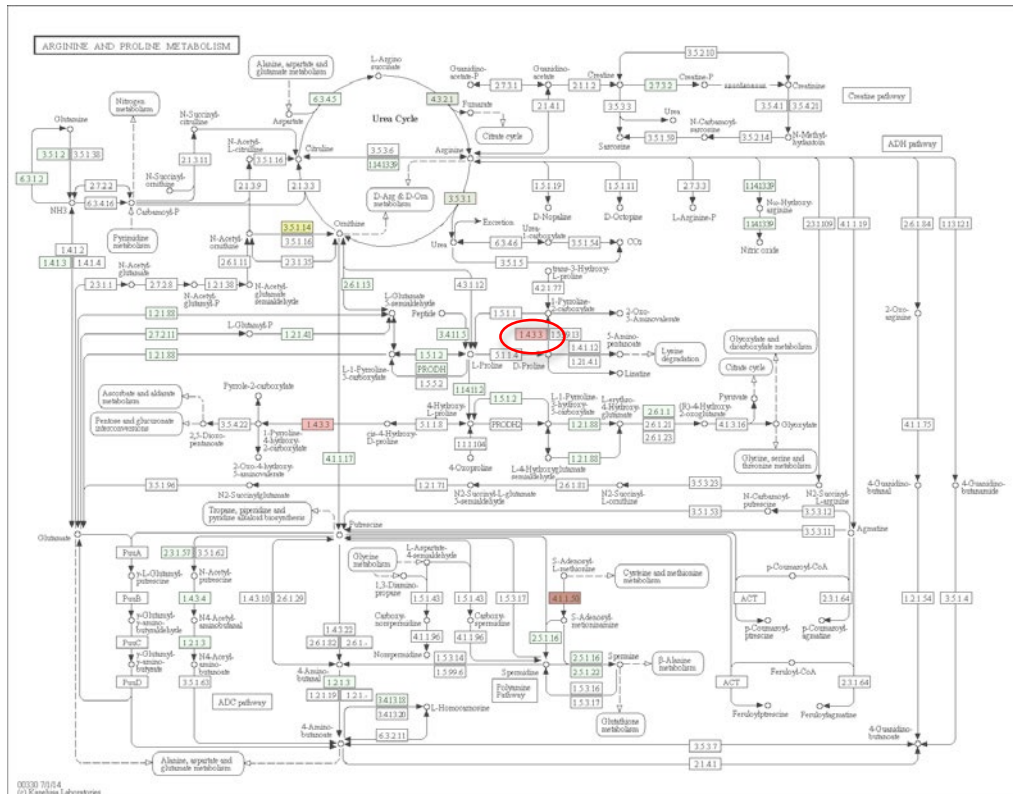


Figura 28. Sobreposição das vias metabólicas de arginina e prolina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculo vermelho destaca as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.

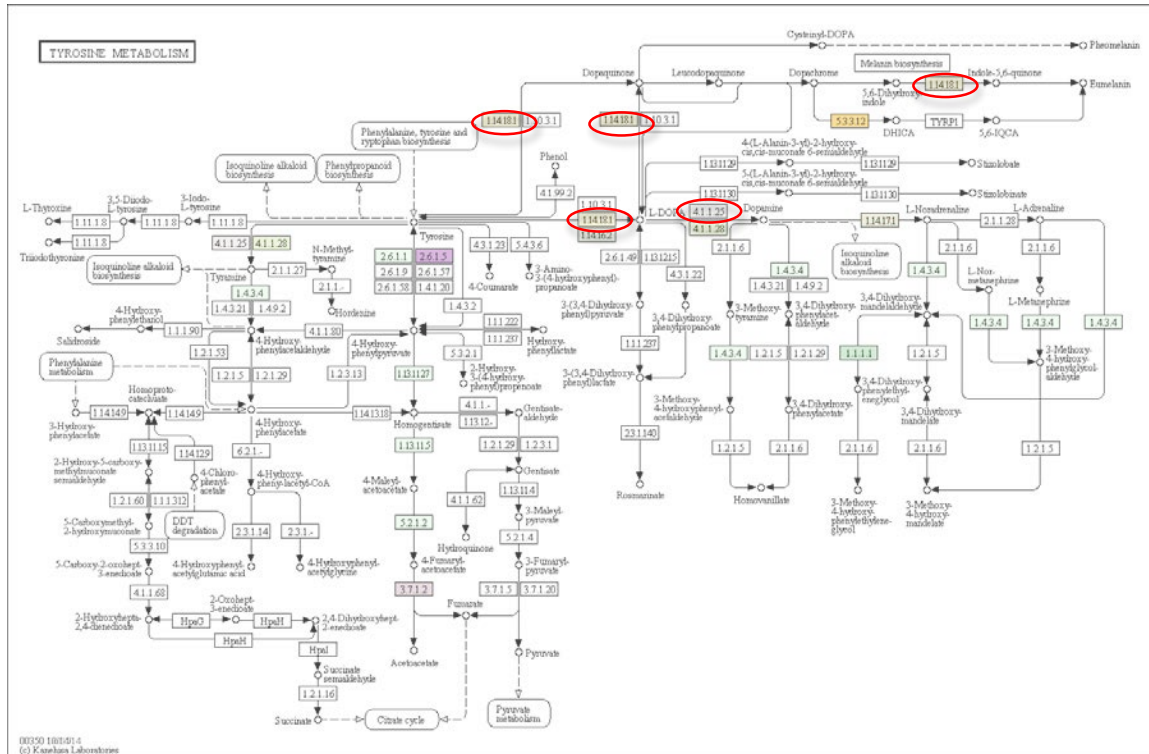


4.8.1.5. Metabolismo da Tirosina

O metabolismo da tirosina (Figura 29 e Figura 30) é de importância vital na fisiologia esquelética, nervosa, hormonal e comportamental das formigas (KRAMER e HOPKINS, 1987). Tirosina é o precursor para a formação de polifenóis e quinonas necessários para escurecimento e formação da cutícula das larvas que dá origem à formação da pupa contribuindo, portanto, na preparação da larva para a síntese de proteínas da cutícula e o escurecimento a ela associado (HACKMAN, 1953; VAVRICKA et al., 2014). Além disso, a fenilalanina, precursora da tirosina, possui

[illegible]

Figura 31. Sobreposição das vias metabólicas de tirosina de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculos vermelhos destacam as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.



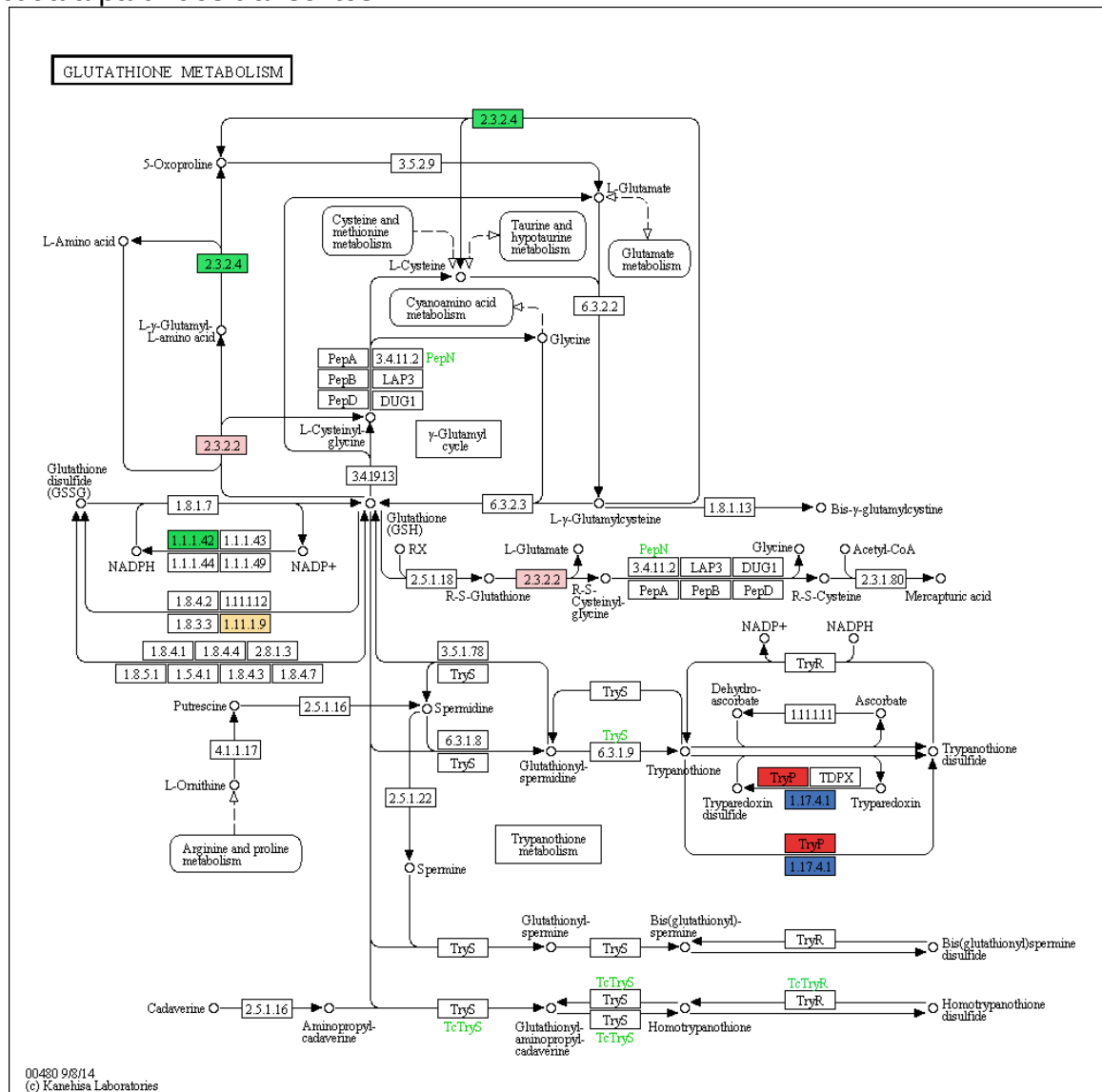
Enzimas envolvidas no escurecimento e na formação de cutícula são comuns em formigas e fundamentais no seu desenvolvimento. São frequentemente descritas em formigas tal como *A. cephalotes* (SUEN et al., 2010).

4.8.1.6. Metabolismo de Glutathione

As glutathione transferases (GSTs) (Figura 32 e Figura 33) constituem uma ampla família de enzimas envolvidas na detoxificação de grande quantidade de xenobióticos, assim como inseticidas. As GSTs catalisam determinados compostos tornando-os mais solúveis e excretáveis que substratos não catalisados (SALINAS e WONG, 1999).

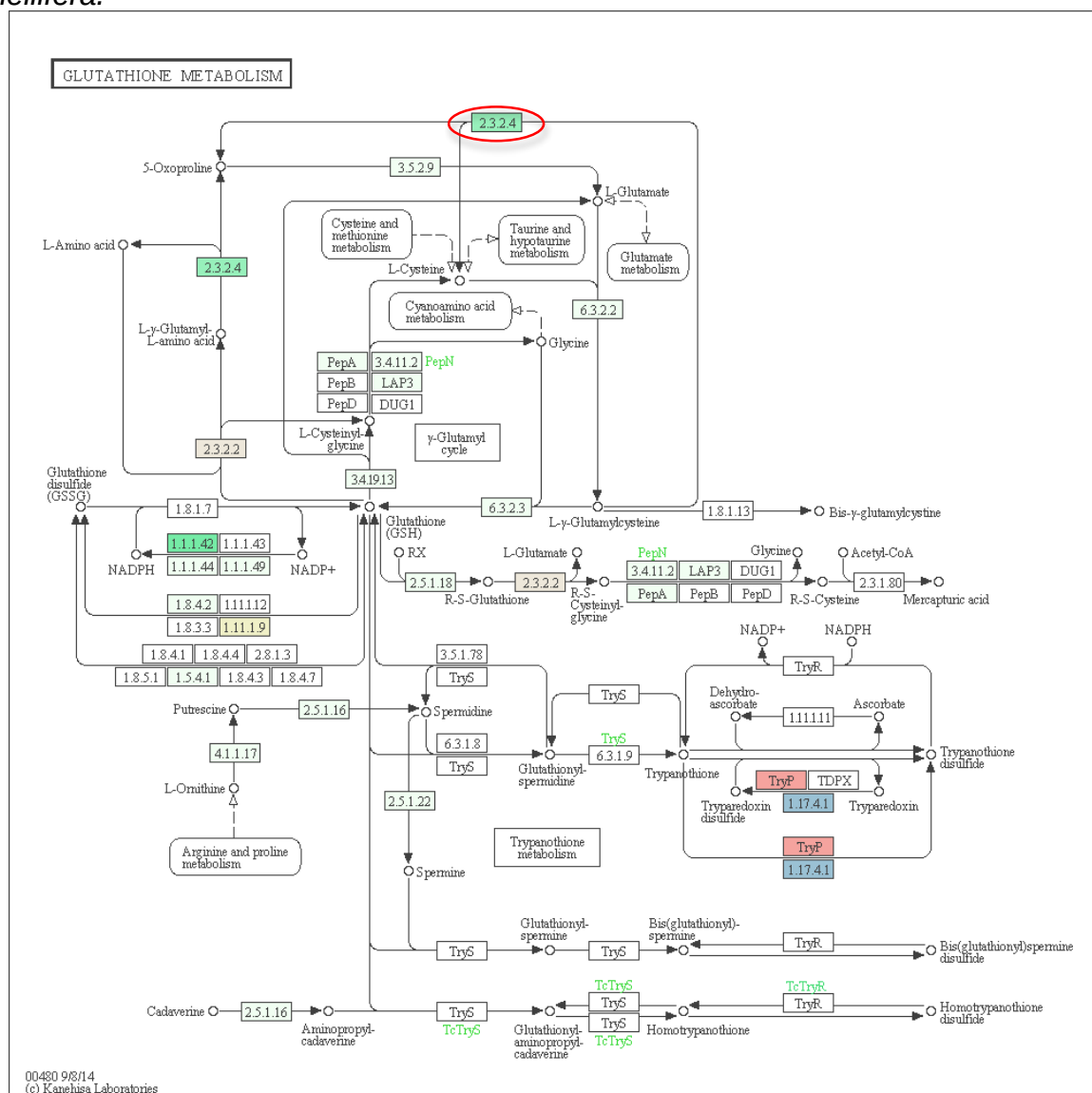
[illegible]

Figura 33. Via metabólica da glutatona em *A. sexdens rubropilosa* obtida em Blast2GO. Retângulos preenchidos com cores representam a diversidade enzimática obtida a partir dos transcritos.



A sobreposição das vias (Figura 34) mostra a presença de um elemento presente em *A. sexdens rubropilosa*, não obtido para *A. mellifera*. A sequência codifica a enzima *gamma-glutamylcyclotranferase* (2.3.2.4). Em *A. mellifera* há uma enzima correspondente que também atua na síntese de glutatona. Tais enzimas são comuns em insetos e também já foram descritas em *A. cephalotes* (SUEN et al., 2010).

Figura 34. Sobreposição das vias metabólicas de glutatona de *A. mellifera* e *A. sexdens rubropilosa* após filtro de transparência. Círculo vermelho destaca as enzimas presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, ausentes em *A. mellifera*.



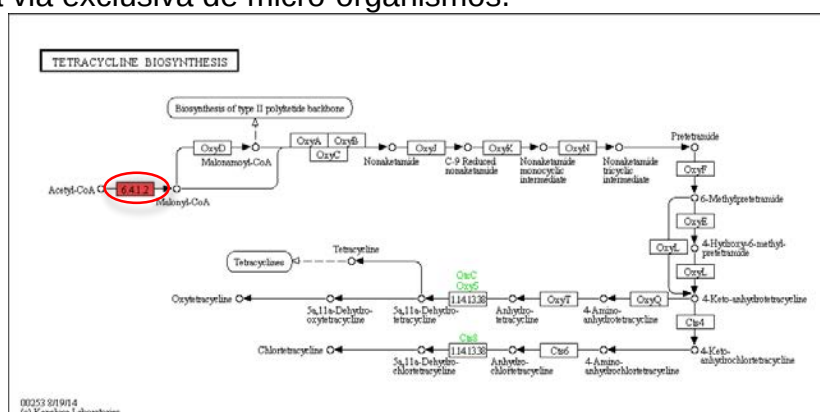
4.8.2. Vias de Biossíntese e a interpretação do KEGG

Enzimas microbianas pertencentes a diversas vias metabólicas foram encontradas entre os transcritos analisados. Vias específicas de planta e nemátodo também foram encontradas.

Em uma primeira análise, estes dados sugeriam a presença de micro-organismos associados às formigas, sendo que alguns poderiam ter um papel relevante para as formigas.

As vias de biossíntese (Figura 35), exclusivas de microrganismos não apresentaram resultados comparativos, já que os mapas correspondentes não foram encontradas em *A. mellifera*. Estes dados pareciam confirmar a interação metabólica existente entre formigas, fungos e micro-organismos.

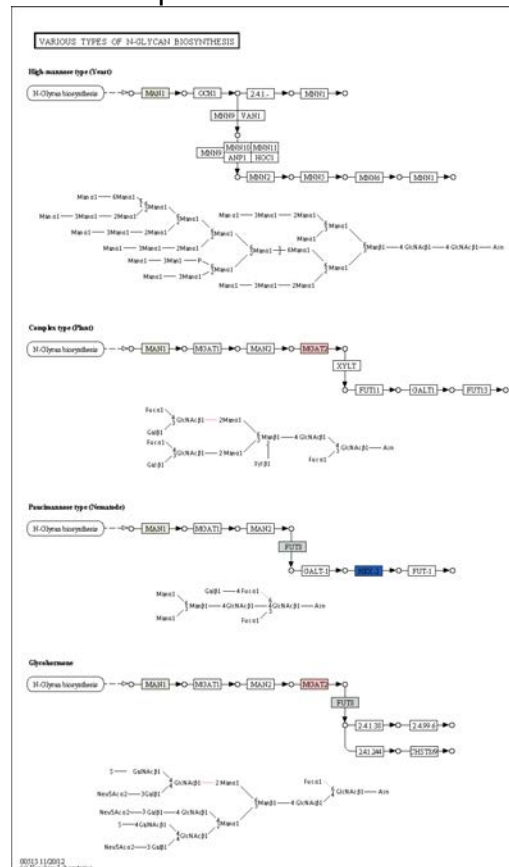
Figura 35. Via de biossíntese de antibiótico, presente no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, onde círculo vermelho demonstra expressão da enzima Acetil CoA em uma via exclusiva de micro-organismos.



No entanto, ao comparar as sequências obtidas no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*, que apareciam em vias específicas de outros organismos, os resultados de Blastx demonstraram que estas sequências eram comuns em insetos (enzima Acetil CoA, por exemplo) indicando que os resultados de KEGG quando comparado ao Blastx, estão desatualizados e incompletos, mesmo para genomas ainda não anotados. KEGG fornece vias de organismos específicos, para enzimas comum em vários organismos.

O mesmo ocorreu para a via de biossíntese de N-glicano (Figura 36) que apresentou enzimas de metabolismo de vários organismos, que poderiam estar associados às formigas.

Figura 36. Vias de biossíntese de N-glicano em diferentes organismos presentes no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*. Retângulos coloridos indicam sequências codificadoras presentes no transcriptoma.



Contudo, quando estas enzimas foram analisadas em Blastx, os *Best hits* eram sempre formigas e em seguida outros insetos.

Estes resultados demonstram que os dados do KEGG parecem estar incompletos.

4.9. Transcritos com alta expressão gênica em *A. sexdens rubropilosa*

Para análise da expressão gênica, foram selecionados os 28 (vinte) *contigs* com maior quantidade de *reads* mapeados. Foram excluídos da presente discussão

aqueles *contigs* sem homólogos identificáveis pelo Blast (NA), totalizando 20 *contigs* descritos (Tabela 7).

Entre os genes selecionados, dezesseis estão envolvidos nos três maiores processos celulares: (1) síntese de ATP acoplado a reações *redox* em mitocôndrias, (2) estrutura de músculo ou citoesqueleto e (3) processo regulatório da transcrição através de *homeobox* ou proteínas de sinalização. Além disso, quatro dos genes mais expressos correspondem a sequências de proteínas hipotéticas (4).

Tabela 3. Contigs mais expressos em *A. sexdens rubropilosa*.

Contig	Reads	FPKM	Best Hit	Function*
64734	1575770	2,17E+10	Citocromo C oxidase Subunidade I	1
52740	1292487	2,70E+09	PREDICTED: uncharacterized protein LOC1008652483339	4
29437	1254355	1,16E+10	Cytochrome c oxidase subunit iii	1
60294	1026701	4,09E+09	Long form-like	2
64733	875060	3,48E+10	Aael017413- partial	4
61879	594265	1,81E+09	Hypothetical protein G5I_02596	4
64736	554820	5,69E+09	Cytocrome B	1
38336	336896	2,79E+09	Cytochrome oxidase subunit partial	1
38337	319311	4,79E+09	Cytochrome c oxidase subunit iii	1
56937	290078	1,37E+09	Loricrin-like isoform x2	2
60292	269882	5,90E+09	Serine protease	3
29439	246332	2,38E+09	Muscle-specific protein 20-like	2
51879	231401	1,47E+09	Cytochrome p450	1
63742	207243	1,36E+09	Actin	2
51864	204841	2,33E+09	Myosin regulatory light chain	2

60664	197388	1,84E+09	Hypothetical protein X777_01625	4
56241	168549	6,28E+08	Transferrin	2
64505	156020	9,67E+08	Larval serum protein 1 beta chain-like	3
52775	148970	7,25E+08	Elongation factor 1-alpha	3

* 1. Síntese de ATP associado a reações redox em mitocôndria. 2. Estrutura de músculo ou citoesqueleto. 3. Processos regulatórios de transcrição através de *homeobox* ou proteínas de sinalização. 4. Proteínas hipotéticas.

Nossos resultados de genes altamente expressos corroboram com os resultados obtidos no genoma mitocondrial de *Atta laevigata* (RODOVALHO et al., 2011). Este estudo sugeriu que a alta expressão de genes de manutenção pode ter sido selecionada positivamente através da evolução, já que correspondem a genes responsáveis por processos vitais principalmente como a conservação de energia e estrutura celular, seguida de processos de regulação.

5. CONCLUSÕES

- A **comparação** de dados genômica já disponíveis com dados de transcriptômica mostrou-se válida para o nosso estudo.
- As diferenças encontradas entre *A. sexdens rubropilosa* e *A. mellifera* necessitam de comprovação quanto ao **significado biológico**.
- Dados disponíveis em Banco de Dados são **limitados** e devem ser interpretados com **cautela**.

- Os genes mais expressos neste estudo estão envolvidos com processos vitais como **metabolismo oxidativo**, **contração** e **mobilidade** ou **processo regulatório**.
- A presença da enzima **endopoligalacturonase** indica que esta estava expressa no transcriptoma de *A. sexdens rubropilosa*. Tal achado sugere que fungo e formiga podem estar atuando de maneira **conjunta na degradação** de matéria vegetal.
- Portanto, esta técnica foi válida para identificar possíveis atuações da formiga, em **contribuição** com o fungo, na degradação da matéria vegetal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** Oxford, UK, v. 1, n. 25, p. 3389-402, set., 1997.

AMANTE, E. Preliminary observations on the seewarming behaviour of the leaf-cutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera:Formicidae). **J Georgia Entomol Soc.** New Jersey, USA, v. 7, p.82-3, 1972.

ARGANDA, S. et al. Collective choice in ants: The role of protein and carbohydrates ratios. **J Insect Physiol.** (2014)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.04.002>

ASSAR, A. A. et al. Biochemical Effects of Cyromazine on *Culex Pipiens* Larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of American Science.** Washington, USA, v. 8, f.5, p.443-50.

AYLWARD, F. O. et al. *Leucoagaricus gongylophorus* Produces Diverse Enzymes for the Degradation of Recalcitrant Plant Polymers in Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens. **Appl Environ Microbiol.** Washington, USA, v. 79, n. 12, p.3770-8, apr., 2013.

BACCI Jr., M. B. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Braz J Med Biol Res.** Riberão Preto, BR, v. 28, p. 79–82, mar., 1995.

BACCI, M. et al. A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. **Journal of Insect Physiology.** V. 59, p. 525–31. 2013.

BARKER, R. F.; HOPKINSON, D. A. The genetic and biochemical properties of the D-amino acid oxidases in human tissues. **Ann Hum Genet.** V. 41, p. 27-42. 1977.

BASILE-BORGIA, A. E. et al. Heterologous rRNA gene expression: Internal fragmentation of *Sciara coprophila* 28S rRNA within microinjected *Xenopus laevis* oocytes. **Insect Molecular Biology.** V. 14, p. 523–36. 2005.

BAUMANN, P. Glucokinase of *Dictyostelium discoideum*. **Biochemistry.** V. 8, n. 12, p. 5011-5. 1969.

BLUMENTHAL, E. M. Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. **Am J Physiol Cell Physiol.** V. 284, p. 718-28. 2003.

BOMAR, et al. Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. **mBio.** Washington, USA, v. 2, p.11-12, abr., 2011.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Mol Ecol**. New york, v. 16, n. 5, p. 907-24, mar., 2007.

BUEDING, E.; MACKINNON, J.A. Hexokinases of *Schistosoma mansoni*. **J Biol Chem**. V. 215, p. 495-506. 1955.

CAO, P. et al. A *de novo* transcriptomic analysis to reveal functional genes in *Apolygus locorum*. **Insect Sci**. 2014.

CARREIRO, S.C. et al. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **A Van Leeuw J Microb**. GE, v. 71, n. 3, p. 243–8, mar., 1997.

CELORIO-MANCERA, M. P. et al. Identification of endo- and exo-polygalacturonase activity in *Lygus hesperus* (knight) salivary glands. **Archives of insect Bioch and Phys**. V. 70, n. 2, p.122-35. 2009.

CHAPMAN, P. **The Insects Structure and Function**. Cambridge, Mass.: Harvard University Press; Hepburn, "The Integument" in Fundamentals of Insect Physiology. 5 Ed. M. S. Blum, pp. 139-183. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2013.

CLARK, A.G. et al. Insecticide metabolism by multiple glutathione S-transferases in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L.). **Pestic Biochem Physiol**. V. 25, p. 169-75. 1986.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**. Oxford, UK, v. 21, n. 3674, 2005.

COOK, B. J., et al. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. **Mol Plant Microbe Interactions**. V. 12, p. 703–11. 1999.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annu Rev Microbiol**. Palo Alto, CA, v. 55, p. 357-80, out., 2001.

DAMON, C., et al. Interaction network of antimicrobial peptides of *Arabidopsis thaliana*, based on high-throughput yeast two-hybrid screening. **Plant Physiology and Biochemistry**. V. 58, p. 245–52. 2012.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Funct Ecol**. London, ENG, v. 23, p.38 – 47, 2009.

DOUGLAS, A. E. **The symbiotic habit**. Princeton University Press, Princeton, NJ. 2010. 216p.

FERNANDES, P. **Antibacterial discovery and development-the failure of success?** Nature Biotechnology, v.24, p.1497-503, 2006.

FREDGARDSON M. **Reino fungi – divisão basidiomycota**. Disponível em:

<http://www.ccaa.ufma.br/fredgardson/basidiomycota_alunos.pdf > Acesso em: 27 out 2013.

FISHER, J.F. et al. **Bacterial resistance to betalactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity.** Chemical Reviews, v.105, p. 395-424, 2005.

FORTI, L. C.; CROCOMO, W. B.; GUASSU, C. M. O. **Bioecologia e Controle das Formigas Cortadeiras de Folhas em Florestas Implantadas.** São Paulo. FEPAF. Boletim didático N. 4. 1987. 30p.

GAINES, P. J. et al. Insect allantoinase: cDNA cloning, purification, and characterization of the native protein from the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Insect Biochem.** Mol. Biol. V. 34, n.3, p. 203-14.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nat Biotechnol.** London, UK, v. 15, n. 29, f. 7, p. 644-52, abr., 2011.

HERNANDÉZ, A. G.; MEDINA, F. S. **Metabolismo de los Aminoácidos.** In: Tratado de Nutrición. 2 Ed. Madri, ESP. 2010.

HACKMAN, R.H. **Chemistry of insect cuticle. III – Hardening and darkening of the cuticle.** Biochem., vol. 54, p. 371 – 7, 1953.

HAMOUDA, L. S. Biochemical differences between the virgin queens and workers of the Ant, *Camponotus maculatus* (Fabricius). **Egypt Acad J Biolog Sci.** Cairo, EG, v. 1, f. 2, p.109-23.

HARVEY, A. J., et al. Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. **Proteins: Structure, Function and Genetics.** V. 41, p. 257–69. 2000.

HAWKEY, P.M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, p. 29–35, 2003.

HAYES, J. D. et al. Comparative modelling of the tree-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. **Proteins.** London, UK, v. 41, p. 257-69, 2000.

HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U., JOWSEY, I. R. (2005). Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.** V. 45, p. 51–88. 2005.

HEIM, R. A propos du *Rozites gongylophora* A. Möller. **Rev Mycol.** Toulouse, FR, v. 22, p. 293-9, 1957.

HOBSON, P. N.; WALLACE, R. J. Microbial ecology and activities in the rumen: part 1. **Crit Rev Microbiol.** London, ENG, v. 9, p.165–225, 1982.

HOLLDÖBLER, B., WILSON, E. O. **The ants.** Cambridge: Harvard University, 1991. 733p.

HOLLOBLER, B., WILSON, E. O. **The Leafcutter Ants**. W. W. Norton & Company, 2010. 160p.

HOUSE, H.L. **Physiology of Insecta**. Academic Press Inc, NY, vol.2, 1965, p. 769.

ILLUMINA. **An Introduction to Next Generation Sequencing Technology**. Disponível em
<http://www.illumina.com/Documents/products/Illumina_Sequencing_Introduction.pdf
> Acesso em 20/11/2012.

ISHIMOTO, T. et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. **PNAS**. V. 109, n. 11, p.4320-5. 2012.

JACOBY, M. **A saúva: uma inteligência nociva**. Ministério da Agricultura. Serviço de Informação Agrícola. 2ª Edição. Rio de Janeiro, 1950.

KAIM W.; SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. An introduction and Guide**. John Wiley & Sons, Chichester, 1994.

KANEHISA, M., GOTO, S. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**. V. 28, p. 27–30. 2005.

KIM, D.; PERTEA, G.; TRAPNELL, C.; PIMENTEL, H.; KELLEY, R. and SALZBERG, S.L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, v.14, R36, 2011.

KRAMER, K. J.; HOPKINS T. L. Tyrosine metabolism for insect cuticle tanning. **Arch Insect Biochem Physiol**. V. 6, p. 279-301. 1987.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**. 9:357-359, 2012.

MACKIE, R. I. 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integr. Comp. Biol.* **42**:319 –326.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. São Paulo: Ceres, 1970. 167p.

MARKOWITZ, V. M. et al. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. **Nucleic Acids Res**. London, UK, v. 40, p. 115-22, 2012.

MARTIN, M. M.; WEBER, N. A. The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica* tonsipes. **Ann Entomol Soc Am**. Lanham, MD, v. 62, n. 6, p. 1386-7, 1969.

MARTIN, M. M.; GIESELMANN, M. J.; MARTIN, J. S. Rectal Enzymes of Attine Ants. Alfa- Amilase and Chitinase. **J Insect Physiol**. Great Britain, UK, v. 19, p.1409-16, 1973.

MARTIN, M. M. et al. Activity of faecal fluid of leaf-cutting ant towards plant cell wall polysaccharides. **J Insect Physiol.** Great Britain, UK, v. 21, p.1887-92, 1975.

MILNE, I, et al. Tablet - next generation sequence assembly visualization. **Bioinformatics.** Scotlans, UK, v. 26, n. 3, p. 401-2, ago., 2010.

MILTON, A.T.V.; MARIANGELA, H. **Biologia dos solos dos cerrados.** Planaltina, DF: Embrapa, 1997.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNAseq. **Nat Methods.** London, UK, v. 5, n. 7, p. 621-8, 2008.

MUELLER, U. G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. **Evolution.** Malden, USA, v. 62, n. 11, p. 2894 –912, nov., 2008

MUELLER, U. G. et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Q Rev Biol.** Chicago, USA, v. 76, n. 2, p. 169-97, jun., 2001.

MUJTAR, V. A. et al. Development of genomic resources for *Nothofagus* species using next-generation sequencing data. **Molecular Ecology Resources.** 2014.

NAGAMOTO, N. S. Microscopic evidence supports the hypothesis of high cellulose degradation capacity by the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **J Biol Res – Thessalon.** Thessaloniki, GR, v. 16, p. 308–12, abr, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIKITINA, V. C. et al. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum*. **Microbiology.** V. 79, p. 327-33. 2010.

OONO, Y., et al. Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. **PLoS One.** V. 9, n. 5. 2014.

PORTER, E.V.; CHASSY, B.M.; HOLMLUND, C.E. Purification and kinetic characterization of a specific glucokinase from *Streptococcus mutans* OMZ70 cells. **Biochim Biophys Acta.** V. 709, p. 178-86. 1982.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecol Entomol.** USA, v. 3, p. 221–30. 1978.

RAMAZZINA, C. et al. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. **Nat Chem Biol.** V. 2, p. 144–8. 2006.

RANSON, H. et al. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in DDT resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Biochem J.** V. 359, p. 295-304. 2001.

RICO-GRAY, V. **Ants and flowers**. Biotropica. Ed. 9. 1980. p.252.

RODOVALHO, C. M. **Caracterização do transcriptoma e genoma mitocondrial da formiga cortadeira *Atta laevigata* (Fomicidae: Attini)**. 2011. 85f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

RODOVALHO, C. M. et al. Expressed sequence tags from *Atta laevigata* and identification of candidate genes for the control of pest leaf-cutting ants. **BMC Research Notes**. London, UK, v. 4, p. 203 – 13, jun., 2011.

RODOVALHO, C. M. et al. The Mitochondrial Genome of the Leaf-Cutter Ant *Atta laevigata*: A Mitogenome with a Large Number of Intergenic Spacers. **PLoS One**. Cambridge, UK, v. 9, n. 5, e. 97117, may, 2014.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal Weeds in the Leafcutter Ant Symbiosis. **Microb Ecol.** USA, v. 56, n. 4, p. 604 -14, mar., 2008.

RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiol.** Heidelberg, GE, v. 50, n. 5, p. 421-5, 2001.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione S-transferases: A review. **Curr Med Chem.** V. 6, n.4, p. 279-309. 1999.

SAWICKI, R. et al. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. **Biochem J.** V. 370, p. 661-669. 2003.

SCHLIESKY, S., et al. RNA-Seq Assembly – Are We There Yet? **Frontiers in Plant Science**. 2012.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* on different food sources. **J Insect Physiol.** v. 49, n. 4, p. 307–13, abr., 2003.

SILVA, A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiol Res.** Paris, FR, v. 161, n. 4, p. 299–303, 2006.

SILVA, J. J. R. F.; SILVA, J. A. L. D-aminoácidos em biologia – mais do que se julga. **Quím Nova.** V. 32, n. 2. 2009

SIQUEIRA, C.G., et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Appl Environ Microbiol.** Washington, USA, v. 64, n. 12, p. 4820-2, out., 1998.

SRINIVASAN, N. G.; CORRIGAN, J. J.; MEISTER, A. D-serine in the blood of the silkworm *Bombyx mori* and other lepidoptera. **J Biol Chem.** V. 237, p. 3844-5. 1962.

SUEN, G. et al. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genet.** Stanford, USA, v. 6, n. 9 : e1001129, ago., 2010.

SURGET-GROBA, Y., MONTROYA-BURGOS, J. I. Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. **Genome Research.** V. 20, p. 1432–40. 2010.

TAFT, A. D. et al. Molecular cloning of two prophenoloxidase genes from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Mol Biol.** V. 10, p. 97-103. 2001.

TAMIR, H; RATNER, S. A study of ornithine, citrulline and arginine synthesis in growing chicks. **Arch Biochem Biophys.** v. 102, p. 259-69. 1963.

TOMIYA, N., et al. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. **Glycoconj.** v. 21, f. 6, p. 343-60. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** Ed. 10. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRAPNELL, C.; HENDRICKSON, D.; SAUVAGEAU, S.; GOFF, L.; RINN, J.L.; PACHTER, L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature Biotechnology**, 2013.

UKAN, D. **Análise dos resíduos produzidos por formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório e em condições de campo.** 2011. 116f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VAVRICKA, C. J. et al. Tyrosine metabolic enzymes from insects and mammals: a comparative perspective. **Insect Sci.** V. 21, f.1, p. 13-9. 2014.

VONTAS, J.G. et al. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochem J.** V. 357, p. 65-72. 2001.

VINK, J. Human molecular genetics. **Twin Research and Human Genetics : The Official Journal of the International Society for Twin Studies.** V. 13, p. 404. 2010.

WANG, J. et al. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide resistant strain of the house fly (*Musca domestica*). **Mol Gen Genet.** V. 227, p. 260-6. 1991.

WANG, Z. et al.. The Association between EGFR Gene Amplification and the Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer: A meta-analysis. **Zhongguo Fei Ai Za Zhi.** V. 12, p. 1247–54. 2009.

WEBER, N. A. **Gardening ants: the Attines.** Philadelphia: The American

Philosophical Society, 1972. 146 p.

WEINSTOCK, G. M., et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**. 2006.

ZDOBNOV, E. M., APWEILER, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**. Oxford, ENG, v. 17, p. 847–48. 2001.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **FEMS Microbiol Rev**. London, UK, v. 32, p.723–35, 2008.

ZHANEL, G. G. et al. **Drugs**. 2004, p. 63-4.