

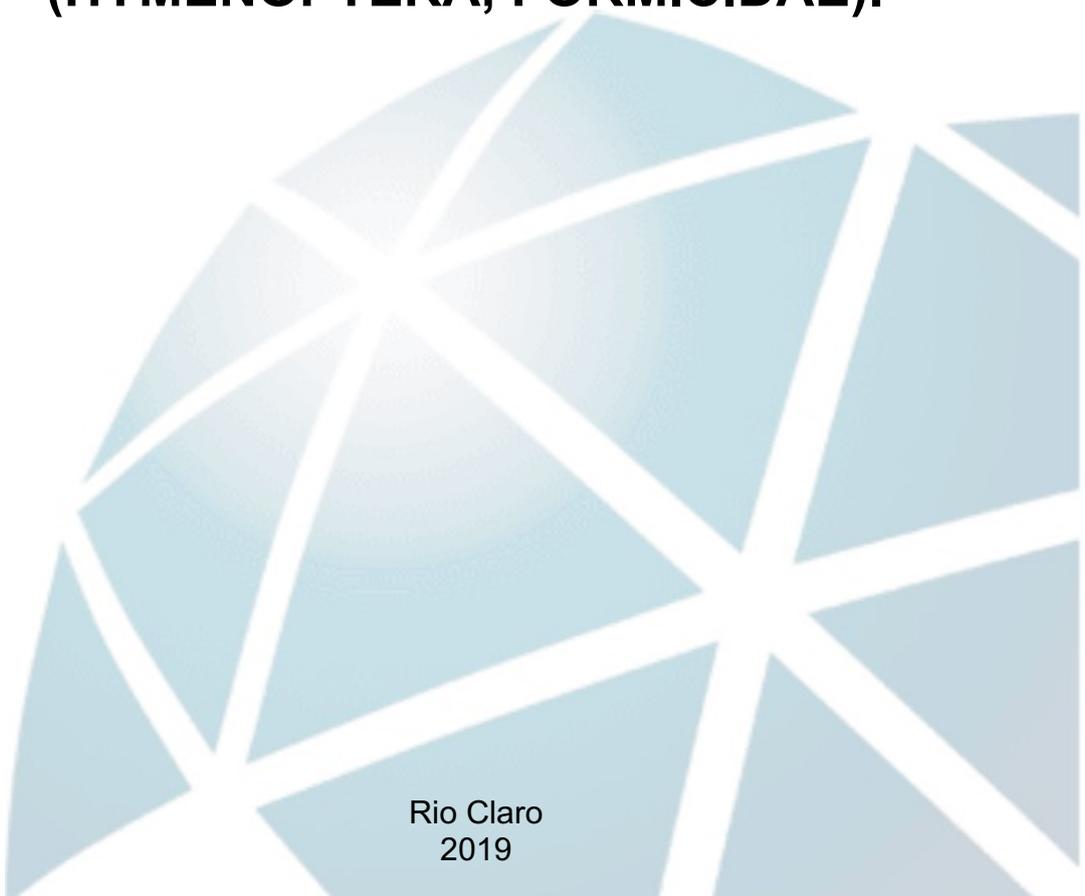
---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**BIANCA RAISSA NOGUEIRA**

**INFLUÊNCIA DO STATUS REPRODUTIVO NA  
RESPOSTA IMUNE DE RAINHAS DE DUAS  
ESPÉCIES DE FORMIGAS-CORTADEIRAS  
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE).**



Rio Claro  
2019

BIANCA RAISSA NOGUEIRA

INFLUÊNCIA DO STATUS REPRODUTIVO NA RESPOSTA  
IMUNE DE RAINHAS DE DUAS ESPÉCIES DE FORMIGAS-  
CORTADEIRAS (HYMENOPTERA, FORMICIDAE).

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Coorientadora: Mayara Cristina Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio  
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em  
Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2019

N778i

Nogueira, Bianca Raissa

Influência do status reprodutivo na resposta imune de rainhas de duas espécies de formigas-cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae). / Bianca Raissa

Nogueira. -- Rio Claro, 2019

34 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Odair Correa Bueno

Coorientadora: Mayara Cristina Pereira

1. Saúva. 2. Sociedades de insetos. 3. Imunidade celular. 4. Resposta imune. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

*Dedico esse trabalho aos meus pais, avós e todos que me deram apoio.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe e ao meu pai por todo o esforço e incentivo, sem eles nada disso seria possível; são os responsáveis pela pessoa que sou hoje. Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. À M<sup>a</sup>. Mayara Cristina Pereira, coorientadora e amiga, pelo direcionamento, auxílio e respaldo durante todos os cinco anos em que estive presente no Centro de Estudos de Insetos Sociais. A todos os amigos e amigas que o Laboratório de Formigas-Cortadeiras me proporcionou, que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, e que estarão sempre em meu coração. Em especial à Nathalia, Thais, Syndell, Thays, Daiane e Amanda. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

## RESUMO

Os insetos apresentam uma resposta imune inata com células de defesa e enzimas específicas que evoluíram com a pressão do ambiente. Essa linha de defesa pode ser dividida em defesa humoral e celular. Os hemócitos são os principais mediadores da defesa celular e participam dos processos de fagocitose e encapsulamento. Rainhas de diferentes espécies de formigas vivem vários anos e ao darem início a uma nova colônia se encontram isoladas, de forma que um *trade-off* entre reprodução e imunidade pode reduzir o investimento nas defesas imunológicas dessas formigas fundadoras. Logo, sua resistência a doenças pode estar relacionada ao seu status reprodutivo. Dessa forma o objetivo da presente pesquisa foi verificar a resposta imune celular de rainhas de formigas das espécies *Atta sexdens* e *Atta laevigata* em diferentes status reprodutivos: fêmeas reprodutoras não acasaladas (RNA), rainhas recém-acasaladas (RRA) e rainhas acasaladas há aproximadamente seis meses (RA). Para avaliar a resistência a patógenos a nível individual, um fio de nylon foi introduzido e mantido por 24 horas no gáster das rainhas, simulando um antígeno padrão. Ao fim desse período, o fio de nylon foi retirado e a taxa de encapsulamento foi mensurada a partir de fotografias, com uso do software ImageJ. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Aspectos morfológicos como massa do corpo e largura da cabeça também foram avaliados e submetidos à análise de correlação (Pearson), a fim de verificar as relações com a resposta imune desencadeada. Os resultados obtidos indicam que o status reprodutivo interfere na resposta imune de encapsulamento das rainhas de formigas-cortadeiras. Os efeitos dos eventos reprodutivos produziram regulação positiva da defesa celular em *A. laevigata* e negativa em *A. sexdens*, já que RA de *A. laevigata* apresentou o maior nível de encapsulamento quando comparado aos demais grupos. Os valores de RNA dessa espécie foram menores e próximos ao grupo RRA, sugerindo que o intervalo entre o acasalamento e a fundação da colônia influencia nos custos metabólicos investidos no sistema imune celular. O nível de encapsulamento não apresentou correlação com a largura da cabeça e nem com a massa corpórea. Por se tratar de espécies pragas, estudos pioneiros quanto aos mecanismos de defesa celular das formigas-cortadeiras podem contribuir para o esclarecimento das respostas imunes desse inseto e para o aperfeiçoamento dos métodos de controle atuais.

**Palavras-chaves:** Defesa celular. Inserção de Fio de Nylon. Encapsulamento. Saúvas.

## ABSTRACT

Insects present an innate immune response with defense cells and specific enzymes that evolved with environmental pressure. This line of defense can be divided into humoral and cellular defense. Hemocytes are the main mediators of cellular defense and participate in the processes of phagocytosis and encapsulation. Queens of different species of ants have a long life span and when initiating a new colony find themselves isolated and a trade-off between reproduction and immunity could reduce the investment in these founding ants' immune defenses. Therefore, their resistance to disease may be related to their reproductive status. Thus, the present study aimed to verify the cellular immune response of the leaf-cutting ants *Atta laevigata* and *Atta sexdens* in different reproductive status: virgin queens (RNA), newly mated queens (RRA) and queens mated for approximately six months (RA). To assess pathogen resistance at an individual level, a nylon thread was introduced and maintained for 24 hours into the queens' gaster, simulating a standard antigen. At the end of this period, the nylon thread was removed and the encapsulation rate was measured from photographs using ImageJ software. The data obtained were submitted to analysis of variance. Morphological aspects such as body mass and head width were also evaluated and submitted to correlation analysis (Pearson), in order to verify the relationships with the triggered immune response. The results indicate that the reproductive status interferes with the encapsulation immune response of leaf-cutting ants. The effects of reproductive events produced positive regulation of cell defense in *A. laevigata* and negative regulation in *A. sexdens*, as RA of *A. laevigata* presented the highest level of encapsulation when compared to the other groups. The RNA values of this species were smaller and similar to the RRA group, suggesting that the interval between mating and colony founding influences the metabolic costs invested in the cellular immune system. The encapsulation level did not correlate with head width or body mass. Because they are pest species, pioneering studies on the cellular defense mechanisms of leaf-cutting ants may contribute to the clarification of this insect's immune responses and the improvement of current control methods.

**Palavras-chaves:** Cellular defense. Nylon Thread Insertion. Encapsulation. Saúvas.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>O gênero <i>Atta</i></b> .....	<b>10</b>
<i>3.1.1</i>	<i>Acasalamento</i> .....	<i>12</i>
<b>3.2</b>	<b>Encapsulamento</b> .....	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta e identificação do material biológico</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Determinação dos níveis de encapsulamento</b> .....	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
<b>5.1</b>	<b>Cromatografia Gasosa</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2</b>	<b>Rainhas isoladas e não isoladas</b> .....	<b>21</b>
<b>5.3</b>	<b>Níveis de encapsulamento de <i>Atta sexdens</i></b> .....	<b>22</b>
<b>5.4</b>	<b>Níveis de encapsulamento de <i>Atta laevigata</i></b> .....	<b>23</b>
<b>5.5</b>	<b>Correlação</b> .....	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Animais se defendem de organismos infecciosos a partir de mecanismos da imunidade inata e adquirida (FEARON, 1997); os insetos possuem uma resposta inata bem desenvolvida e pouco se sabe sobre sua imunidade adquirida. Quando infectados, o tegumento dos insetos e a produção de várias moléculas citotóxicas no local da lesão formam barreiras físicas que atuam como defesas iniciais. Os microrganismos que ultrapassam essas barreiras e chegam até a hemocele são contidos por células de defesa, os hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002).

O sistema imune de insetos é subdividido em defesa humoral e celular. A defesa humoral consiste na produção de peptídeos antimicrobianos (MEISTER; HETRU; HOFFMANN, 2000; LOWENBERGER, 2001), intermediários reativos de nitrogênio ou oxigênio (BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; VASS; NAPPI, 2001) e a coagulação ou a melanização da hemolinfa. Já a defesa celular é uma resposta imune mediada por hemócitos, como a fagocitose, nodulação e o encapsulamento (STRAND; PECH, 1995; SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001).

Durante a resposta de encapsulamento, certas classes de hemócitos se agregam e se espalham pela superfície do antígeno, formando várias camadas de células e eliminando o alvo por asfixia ou pela liberação de componentes necrosantes (STRAND; PECH, 1995; NAPPI *et al.*, 1995; GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997). Para avaliar a resistência a patógenos reais a nível individual, o nível de encapsulamento é quantificado pela introdução de um antígeno padrão no corpo do inseto, como um filamento de nylon (RANTALA; ROFF, 2007).

O sucesso evolutivo das formigas pode ser atribuído ao seu comportamento eussocial, já que são capazes de realizar atividades complexas a partir da cooperação mútua. Contudo, uma das desvantagens da vida em grupo é a facilidade da contaminação por patógenos entre os indivíduos da colônia (SOUZA *et al.*, 2008). Frente a isso, as formigas possuem diferentes mecanismos de controle de doenças como a secreção glandular antimicrobiana, os comportamentos de limpeza (*grooming*), a remoção dos indivíduos doentes do ninho e as respostas imunes inatas e adaptativas dos membros da colônia (ROSENGAUS *et al.*, 1998, 1999, 2000). Tais mecanismos atuam a níveis comportamentais, fisiológicos e organizacionais, e em conjunto impedem o estabelecimento e a transmissão de patógenos entre os indivíduos da colônia (CREMER; ARMITAGE; SCHMID-HEMPEL, 2007). Dessa forma, pode-se dizer que essas barreiras funcionais formam um complexo sistema de imunidade social (CREMER; ARMITAGE; SCHMID-HEMPEL, 2007).

A especificidade da resposta imune pode variar com a longevidade do hospedeiro e a probabilidade de ser exposto mais de uma vez ao mesmo patógeno (ROLFF; REYNOLDS, 2009; BEST; TIDBURY; WHITE, 2013). Indivíduos de vida longa devem investir mais em imunidade ao longo tempo do que indivíduos de vida efêmera (GARNIER; BOULINIER; GANDON, 2013). As rainhas de diferentes espécies de formigas vivem vários anos e, portanto, apresentam uma vida longa e fixa em sua colônia, o que as torna mais susceptíveis a estarem expostas mais de uma vez ao mesmo patógeno (GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014).

O investimento em defesa imune em rainhas de formigas pode depender de vários fatores e também variar com a idade e o status de acasalamento (GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014). Fêmeas reprodutoras não acasaladas estão protegidas no interior de suas colônias de origem, mas quando deixam essas colônias para iniciar o processo de criação de um novo ninho se encontram inicialmente isoladas, e um *trade-off* entre reprodução e imunidade pode reduzir o investimento nas defesas imunológicas dessas formigas fundadoras (GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014). Formigas-cortadeiras da espécie *Atta colombica* elevaram sua resposta imunológica após cavarem seus ninhos, como possível resposta adaptativa contra patógenos (BAER; ARMITAGE; BOOMSMA, 2006).

As formigas-cortadeiras vivem em sociedade com divisão de castas, as quais desempenham diferentes funções na colônia (WILSON, 1980). Elas são encontradas principalmente na região Neotropical (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). São formigas que cultivam o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* para a sua alimentação e para tal realizam intensa atividade de corte de materiais vegetais, que são substrato para o crescimento do fungo (BASS; CHERRETT, 1995; ANDRADE *et al.*, 2002; PAUL; ROCES, 2003).

Segundo Ribeiro *et al.* (2011), o controle de doenças em uma colônia adulta da espécie *Atta sexdens* envolve alterações na resposta imune inata de acordo com a idade e tarefa das operárias. Gálvez e Chapuisat (2014), demonstram que o status reprodutivo de rainhas das espécies *Lasius niger* e *Formica selysi* influencia sua resistência a doenças e que esta pode variar entre espécies e as condições de acasalamento. Como as rainhas das formigas-cortadeiras apresentam vida longa, necessitam investir em diferentes mecanismos de defesa e, uma vez que são fundamentais para a manutenção do formigueiro, torna-se altamente relevante avaliar fatores que influenciam sua resistência às doenças. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo verificar a resposta imune celular de rainhas de formigas-cortadeiras *Atta sexdens* e *Atta laevigata* em diferentes status reprodutivo.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar alterações na resposta imune celular de encapsulamento em rainhas das espécies *Atta sexdens* e *Atta laevigata* em diferentes estágios do status reprodutivo: fêmeas reprodutoras não acasaladas (com asas), fêmeas recém-acasaladas (sem asas) e rainhas acasaladas há aproximadamente seis meses (ninhos incipientes).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O gênero *Atta*

A tribo Attini compreende os gêneros mais diversos de formigas cultivadoras de fungo, dentre eles *Acromyrmex* e *Atta* (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009; DELLA LUCIA, 2011). Esses gêneros representam as verdadeiras formigas-cortadeiras, pois todas as espécies contidas apresentam o hábito de cortar partes verdes de plantas para o cultivo de seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (DELLA LUCIA, 2011). Trata-se de um grupo muito estudado devido aos prejuízos causados à economia pelo corte intenso de folhas em culturas cultivadas e naturais, e também aos benefícios gerados ao ecossistema, como a aeração, drenagem e revolvimento do solo e dispersão secundária de sementes.

Há 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008) formigas cortadeiras desenvolveram agricultura avançada baseada no cultivo e simbiose mutualística obrigatória com o fungo basidiomiceto responsável pela sua nutrição, sendo consideradas insetos fungívoros (DELLA LUCIA, 2011). Villesen *et al.* (2002) sugerem que a utilização de recursos altamente disponíveis para o cultivo do fungo simbiote, como materiais vegetais, possibilitou que as formigas-cortadeiras constituíssem grandes colônias, portando rainhas de vida longa e formas de organização social mais complexas. As colônias do gênero *Atta* podem conter milhões de indivíduos divididos em castas e representam o maior dos superorganismos da Terra (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

O gênero *Atta* apresenta um polimorfismo (diferenciação morfológica) acentuado entre as operárias, sendo organizadas de acordo com o trabalho e as funções que exercem. Associa-se assim com a noção de castas, ou seja, um grupo de indivíduos distintos em tipo morfológico, grupo de idade ou estado fisiológico que desempenham certos comportamentos e atividades especializados na colônia. (WILSON, 1971). A organização social das formigas-cortadeiras está entre as mais complexas, permitindo a realização de tarefas em cooperação e um sistema auto-organizável que pode produzir comportamentos coletivos altamente estruturados (DELLA LUCIA, 2011).

Centenas ou milhares de fêmeas e machos alados são encontrados no interior do ninho em épocas de reprodução e em determinado momento, esses indivíduos se dirigem à superfície do solo para realizarem a revoada. Como não retornam aos seus ninhos de origem, formam uma casta temporária. A fêmea acasalada que funda um novo ninho e passa a ser chamada de rainha, juntamente com as inúmeras operárias de vida curta que realizarão a

manutenção do formigueiro, constituem uma casta permanente (DELLA LUCIA, 2011). A rainha constitui também a casta reprodutiva do formigueiro, podendo viver mais de 20 anos e ovipositando durante todo o seu período de vida. Como a rainha não pode ser substituída por outra e há apenas uma por ninho, é essencial que ela se mantenha viva para a sobrevivência da colônia.

As operárias de *Atta* são fêmeas inférteis, e em *A. sexdens* podem distinguir-se em jardineiras e babás, generalistas dentro do ninho, forrageadoras e escavadoras, e defensoras ou soldados (WILSON, 1980). Estudos sugerem que a determinação das castas é feita a partir de um mecanismo plástico que depende de nutrição e fatores genéticos (DELLA LUCIA, 2011) e que esse sistema geneticamente-baseado se dá devido ao aumento da diversidade genética pelos múltiplos acasalamentos das formigas cortadeiras, permitindo que respondam de maneira eficiente a perturbações do ambiente (OLDROYD; FEWELL, 2007).

Formigas podem ser consideradas os principais e numericamente mais abundantes insetos sociais (WILSON, 1971). Dessa forma a vivência em grupo tem sido associada com o aumento da disseminação de patógenos (ALEXANDER, 1974), mas estudos recentes têm mostrado que interações comportamentais garantem uma defesa efetiva, assim como mecanismos de resposta imune densidade-dependente, associando o comportamento social com a redução da disseminação de patógenos (BOOMSMA; SCHMID-HEMPEL; HUGHES, 2003). O antagonismo dos dados pode ser justificado pelos diferentes modos de transmissão desses parasitas, já que parasitas transmitidos por contato direto são positivamente correlacionados com o tamanho do grupo, e parasitas que procuram ativamente um hospedeiro, negativamente correlacionados (CÔTÉ; POULIN, 1995).

O sistema de defesa das formigas-cortadeiras consiste em mecanismos comportamentais, fisiológicos e associações com outros organismos (DELLA LUCIA, 2011). Dentre esses comportamentos estão o *autogrooming* e o *allogrooming*, o ato das operárias de lambe-lamber a si mesmas e as companheiras do ninho, inclusive a rainha, respectivamente. Este comportamento é considerado profilático, pois ocorre após o contato com a glândula metapleurale e suas substâncias antibióticas (ORTIUS-LECHNER *et al.*, 2000).

Logo após o acasalamento as fêmeas reprodutoras se dirigem ao solo, onde retiram suas asas e passam a procurar o lugar ideal para a escavação de seus ninhos. Inicialmente, a rainha da espécie *A. sexdens* constrói um pequeno canal e uma pequena câmara em posição lateral de 8,5 a 15 cm de profundidade, e lá permanece enclausurada por 80 a 90 dias (AUTUORI, 1941, 1942). Após esse período a rainha constrói uma nova câmara com profundidade entre 60 a 80 cm, podendo o comprimento total do canal chegar a 1,40 m. Seis

meses após o acasalamento, um ninho de *A. sexdens* contém uma câmara de fungo e poucos canais. O desenvolvimento segue um padrão geral, mas pode variar em tempo com o número de operárias (JACOBY, 1937 *apud* DELLA LUCIA, 2011).

As câmaras que constituem os ninhos das formigas-cortadeiras possuem diferentes funções, dentre elas, abrigar o fungo cultivado juntamente com os ovos, larvas, pupas, operárias e rainha. A grande especialização na construção dos ninhos das formigas-cortadeiras funciona como um mecanismo de defesa contra inimigos naturais e fatores ambientais desfavoráveis (DELLA LUCIA, 2011), de modo a proteger seus descendentes e a rainha e realizar um controle microclimático (AMANTE, 1960; SUDD, 1970, 1982; BRIAN, 1983). Dessa forma, apesar da escavação do ninho ter considerável custo energético, a energia investida é revertida em benefícios para a própria colônia (DELLA LUCIA, 2011).

Na atualidade, vários métodos de controle são utilizados visando diminuir os prejuízos causados por essas formigas, dentre eles as iscas tóxicas, os pós, líquidos e gases químicos, a termonebulização, o controle biológico e os métodos culturais (BOARETTO; FORTI, 1997). Contudo, por serem insetos bem estabelecidos e de complexa organização, as formigas-cortadeiras são de difícil controle. Dessa forma, estudos de base e que objetivam o aprimoramento dessas técnicas são necessários.

### 3.1.1 Acasalamento

O voo nupcial ou revoada das formigas do gênero *Atta* é a maneira mais comum de reprodução e garante a dispersão e a fundação de uma nova colônia. Ocorre quando a colônia atinge o amadurecimento sexual, com cerca de 38 meses de idade desde a sua fundação e se repete anualmente até o ninho se extinguir (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA; BENTO, 1993). O período da revoada se dá quando as condições ambientais estão favoráveis, variando regionalmente devido às diferentes condições climáticas. O voo nupcial se inicia quando os alados saem de seus ninhos, os bitus seguidos pelas içás, que antes de abandonarem o ninho coletam uma porção do fungo mutualista e a mantém protegida em uma cavidade infrabucal até a fundação do novo formigueiro (DELLA LUCIA, 2011).

Os alados realizam múltiplas cópulas em pleno voo, garantindo mais de um acasalamento e aumentando a variabilidade genética e o número de ovos fecundados. As içás podem armazenar até 465 milhões de espermatozóides em sua espermateca, variando por espécie, o que contribui para o prolongamento de sua vida e a da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Quando fecundadas, as rainhas se dirigem ao solo e retiram suas asas para

iniciar a escavação de seus ninhos e estabelecerem suas colônias. A fundação dos ninhos em *Atta* spp. é haplométrica, ou seja, realizada por apenas uma rainha, que se enclausura em sua câmara inicial e cria sua prole inicial no isolamento.

O período mais crucial da colônia é a construção inicial do ninho, que pode durar entre seis e oito horas (WEBER, 1966; MARICONI, 1970; WILSON, 1971; FERNÁNDEZ-MARÍN; ZIMMERMAN; WCISLO, 2004). O trabalho incessante da iça que se inicia com o voo nupcial e perdura até a fundação da colônia implica em grande gasto energético e consequente perda de peso (MINTZER, 1990). Após cinco a seis dias do trabalho inicial de escavação do ninho a oviposição é iniciada, as primeiras larvas emergindo em aproximadamente 20 dias, e a rainha é responsável pela alimentação e cuidados com a prole, assim como cuidar da porção inicial do fungo e sua própria alimentação (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA, 2011).

### **3.2 Encapsulamento**

A defesa celular dos insetos é mediada por hemócitos, e consiste em respostas imunes como fagocitose, nodulação e encapsulamento (STRAND; PECH, 1995; SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001). Os hemócitos podem reconhecer componentes externos por interação direta com receptores de outros hemócitos que tiveram contato prévio e apresentam moléculas do organismo invasor. Ou por contato indireto através do reconhecimento de receptores humorais, que se ligam e opsonizam a superfície do invasor. Eventos de sinalização coordenam então respostas efetoras como fagocitose e encapsulamento (LAVINE; STRAND, 2002). Pró-hemócitos, células granulares, plasmócitos e células esféricas são tipos de hemócitos descritos em espécies de diversas ordens de insetos.

Nodulação consiste na ligação de diversos hemócitos em aglomerados de bactérias enquanto encapsulamento se trata da ligação de diversos hemócitos em alvos maiores, como parasitóides e nematóides. Diferente da fagocitose, nodulação e encapsulamento resultam em formações de hemócitos sobrepostos revestindo o alvo. As cápsulas formadas são na maioria das vezes compostas por células granulares, plasmócitos e lamelócitos (SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001; VASS; NAPPI, 2001). Receptores celulares e humorais estão envolvidos no reconhecimento de alvos a serem encapsulados e uma vez realizado o reconhecimento, células granulares ou opsoninas humorais se ligam ao invasor e induzem a diferenciação de plasmócitos não-adesivos para altamente adesivos que se ligam entre si e no alvo e formam grande parte da cápsula (LAVINE; STRAND, 2002).

A resposta de encapsulamento a um antígeno padrão é comumente usada para avaliar a defesa imune em insetos (KONIG; SCHMID-HEMPEL, 1995; RANTALA *et al.*, 2000, 2002, 2003; RYDER; SIVA-JOTHY, 2000; RANTALA; KORTET, 2003; BAER; ARMITAGE; BOOMSMA, 2006). Para isto, faz-se a introdução de um monofilamento de nylon no indivíduo. A coloração do fio após certo período de tempo pode ser mais escura ou mais clara, característica utilizada para a diferenciação de um alto ou baixo nível de encapsulamento, respectivamente. Quanto mais escura a coloração maior a resposta celular do organismo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e identificação do material biológico

Os ensaios foram realizados com fêmeas reprodutoras não acasaladas (RNA), rainhas recém-acasaladas (RRA) e rainhas acasaladas há aproximadamente seis meses (RA), das espécies *Atta sexdens* e *Atta laevigata* (Figura 1). As RNA foram coletadas anteriormente à revoada, em outubro, no momento em que saíram de seus ninhos de origem para então realizar o voo nupcial. As RRA foram coletadas durante a revoada, após o acasalamento, quando com suas asas já retiradas e em busca de um local para fundação de um novo ninho. Ambas foram coletadas em campo na Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade” – Rio Claro/SP. A coleta das RA ocorreu em Itirapina/SP, para isso, os ninhos recém-formados foram escavados e a rainha foi cuidadosamente removida juntamente com o fungo simbionte, as operárias e as crias. As rainhas foram mantidas em potes de polipropileno no Laboratório de Formigas Cortadeiras no Centro de Estudo de Insetos Sociais do Instituto de Biociências do Câmpus UNESP – Rio Claro/SP, em sala climatizada com temperatura entre 22°C a 25°C, com umidade relativa de aproximadamente 70%.

As RNA foram coletadas próximas aos olheiros de seus ninhos de origem e, para distinguir as espécies, comparou-se características morfológicas e o odor característico das operárias médias da colônia de *A. sexdens* (saúva-limão), o mesmo método de identificação foi utilizado para as RA. Uma vez que as RRA foram coletadas após voo nupcial e, portanto, longe de seu ninho de origem, outro método de identificação foi utilizado. Para tal, foi realizada a técnica de cromatografia gasosa, no Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências do Câmpus UNESP – Rio Claro/SP, que possibilitou a identificação da espécie a partir do perfil de hidrocarbonetos presentes na cutícula das formigas (CARLOS, 2013).

As castas reprodutivas foram imersas em 5 mL de hexano pelo período de 90 segundos, com intervalos de cinco segundos a cada 30 segundos. As amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), Shimadzu. Para as análises no CG-EM utilizou-se uma coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm), o protocolo de temperatura do cromatógrafo utilizado foi: 80 °C/2min, 12°C/min, 300 °C durante 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 320 °C e do detector de 80 °C. Os dados foram analisados pelo software LabSolution CGMSolution versão 2.53 SU1. A identificação

dos compostos foi realizada através da análise das fragmentações representada pelo espectro de massas (CARLOS, 2013). Os métodos de identificação a nível de espécie das rainhas coletadas buscaram garantir a diferenciação das espécies alvo desse estudo, *A. sexdens* e *A. laevigata*, as quais ocorrem na mesma região e possuem morfologia externa semelhante.

**Figura 1** - Esquerda: rainha acasalada, ausência de asas; Direita: içá não acasalada, presença de asas. Ambas da espécie *A. sexdens*, que não apresentam diferença morfológica com a espécie *A. laevigata*.



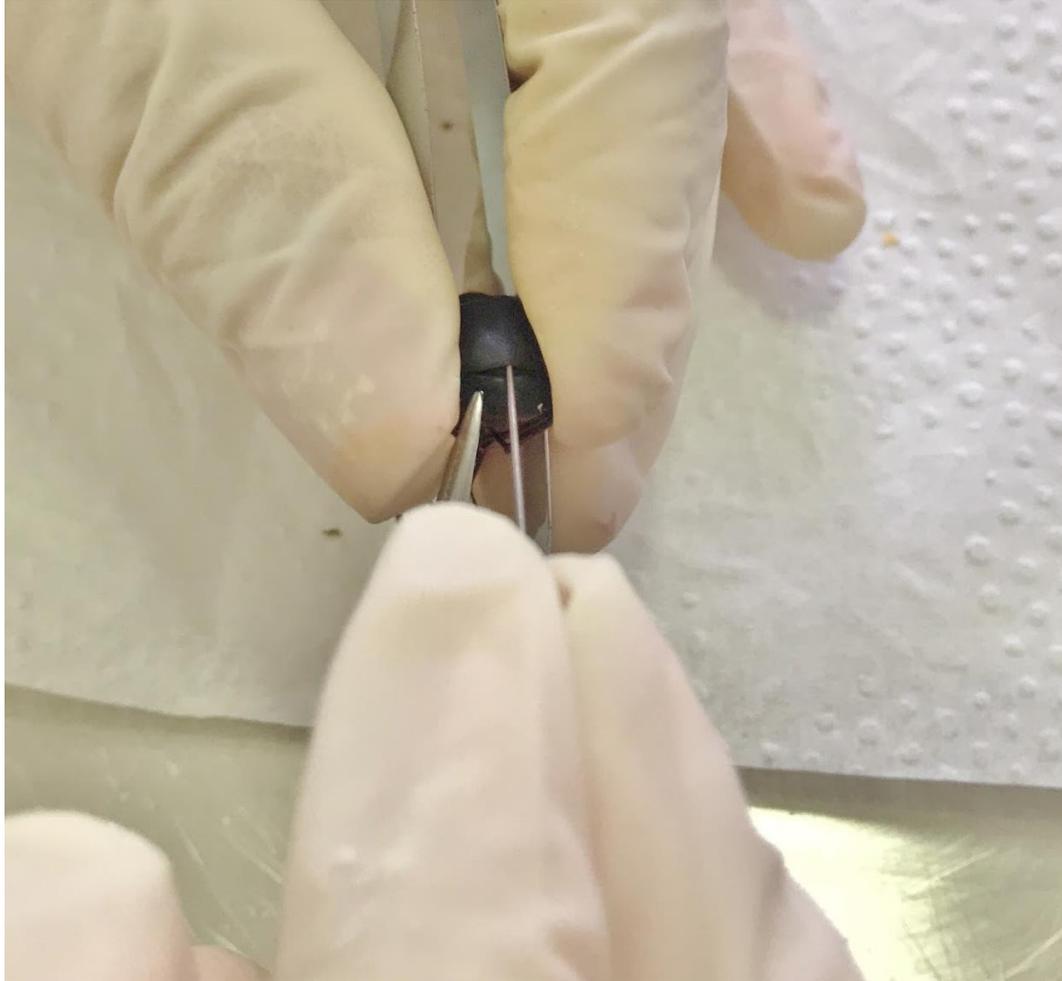
Fonte: Autor

#### 4.2 Determinação dos níveis de encapsulamento

O nível de encapsulamento foi avaliado a partir da inserção de um fragmento de fio de nylon transparente de 4,0 mm de comprimento e 1,8 mm de espessura no gáster dos indivíduos, entre o 4º e 5º tergito. A inserção do fio de nylon buscou simular a entrada de um antígeno no corpo da formiga, a fim de avaliar a capacidade de opsonização dos hemócitos no processo de encapsulamento. Os fragmentos de fio de nylon foram previamente lixados, mantidos por quatro horas em álcool 95% para esterilização e inseridos com um nó em uma das extremidades para facilitar a retirada (RANTALA *et al.*, 2002). A inserção do fio no gáster da formiga foi realizada com auxílio de alfinete e pinça entomológicos esterilizados (Figura 2 e 3). Após a introdução do antígeno, as rainhas foram mantidas por 24h em sala climatizada com temperatura entre 22°C e 25°C e umidade relativa de aproximadamente 70%. A massa corporal dos indivíduos foi mensurada em balança de precisão e, após a retirada do

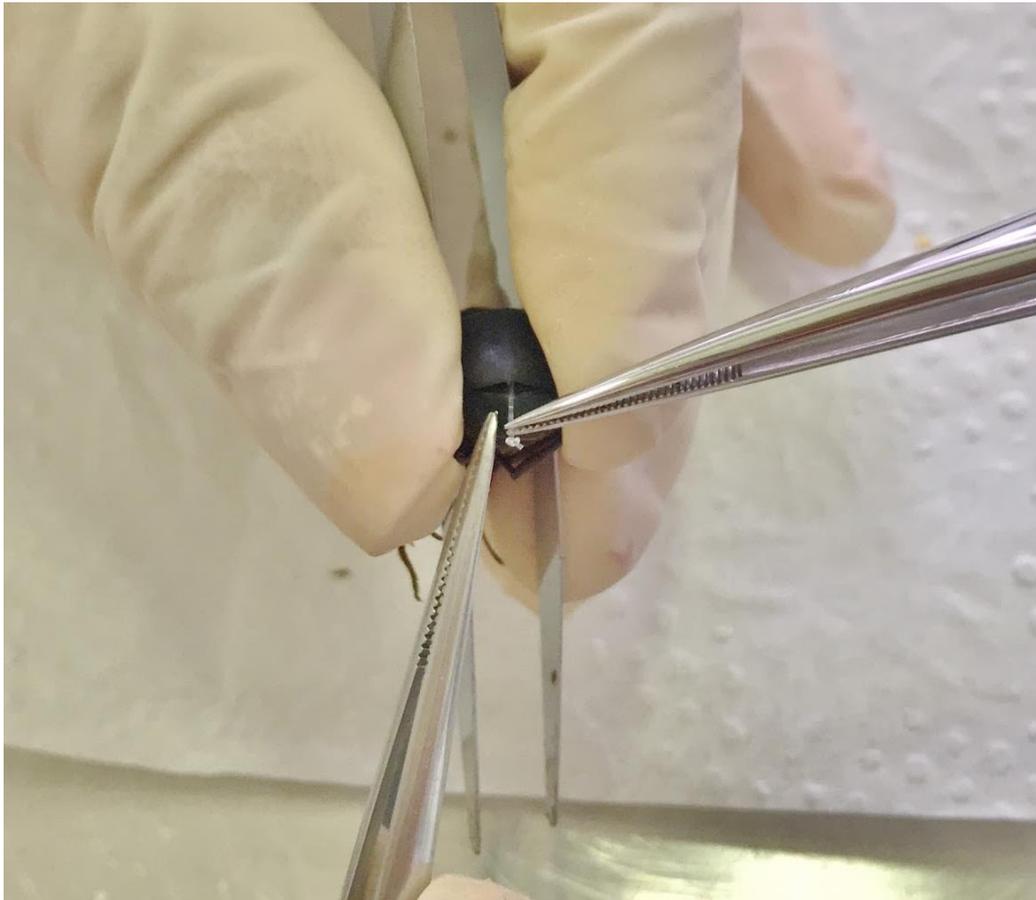
antígeno, a largura da cabeça foi medida em estereomicroscópio (Figura 5), a fim de verificar se características morfológicas estão relacionadas aos resultados encontrados.

**Figura 2** - Introdução de alfinete esterilizado entre o 4º e 5º tergito do gáster de rainha *Atta* sp. no método para inserção do fio de nylon.



Fonte: Autor

**Figura 3** - Introdução do fio de nylon na região membranosa entre o 4º e 5º tergito do gáster de rainha *Atta* sp. com auxílio de uma pinça entomológica esterilizada.



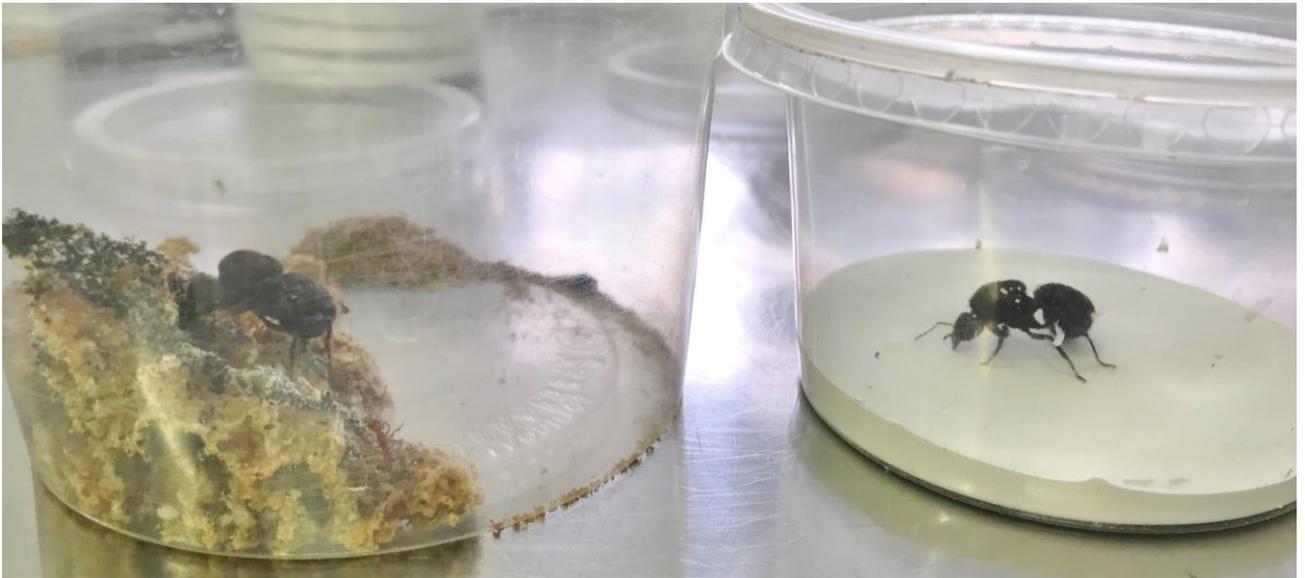
Fonte: Autor

A fim de avaliar se o convívio social das rainhas com operárias, imaturos e o fungo simbiote durante o ensaio interfere nos níveis de encapsulamento, dois grupos foram estabelecidos: rainhas isoladas e rainhas não isoladas. Ambas foram colocadas em potes de polipropileno, sendo que as não isoladas foram mantidas junto às operárias, crias e seu jardim de fungo simbiote (Figura 4).

Antes da remoção do antígeno as rainhas foram anestesiadas por resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Os fragmentos de fio de nylon foram retirados com auxílio de pinça entomológica e colocados sobre lâminas de vidro contendo glicerina. As lâminas foram cobertas com lamínula de vidro e mantidas em temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram observadas e fotografadas em microscópio invertido Primovert Zeiss®. As fotomicrografias foram analisadas utilizando o programa Image J e os níveis de encapsulamento foram medidos utilizando os valores da escala de cinza de cada imagem. Os dados foram adaptados de forma que as escalas de cinza mais escuras, quando comparadas ao controle, caracterizaram maior índice de encapsulamento (RANTALA *et al.*, 2002), variando

de 0 (branco) a 255 (preto). Os histogramas das fotomicrografias foram padronizados, de modo que o brilho e o contraste das imagens não alterassem a análise da taxa de encapsulamento. As taxas médias de encapsulamento de cada grupo foram comparadas por ANOVA e, então, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Figura 4** - Esquerda: RA (rainha acasalada) não isolada, presença de operárias e o jardim de fungo; Direita: RA (rainha acasalada) isolada.



Fonte: Autor

**Figura 5** - Cabeça de rainha de *Atta* sp. sob estereomicroscópio com lente ocular contendo régua milimetrada. O tamanho da cabeça foi aferido considerando a distância na altura dos olhos.



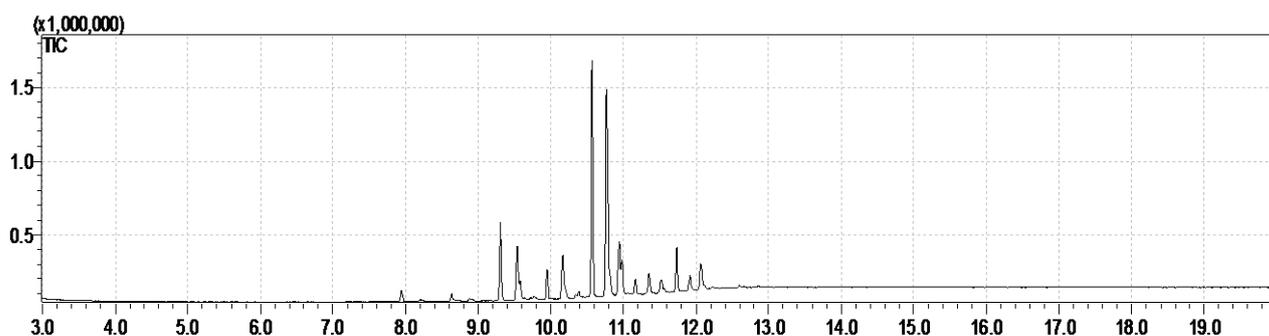
Fonte: Autor

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cromatografia Gasosa

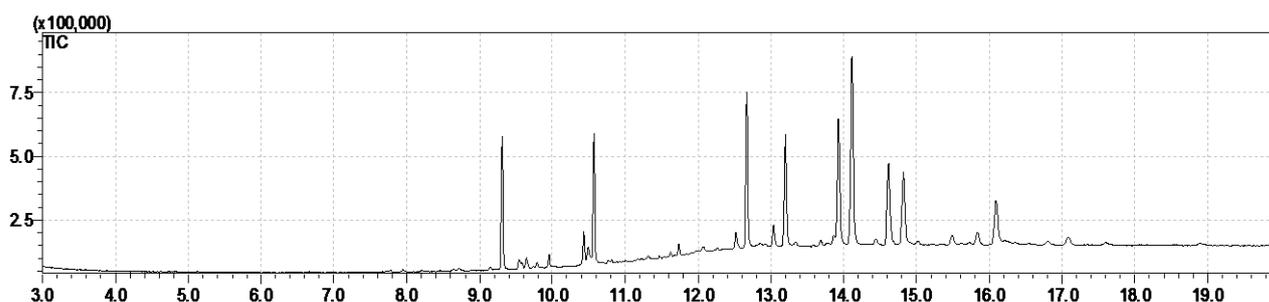
O perfil químico cuticular dos indivíduos analisados apresentou diferenças (Figura 6 e 7), possibilitando a identificação das espécies.

**Figura 6** - Espectros de hidrocarbonetos cuticulares de fêmeas fecundadas de *Atta laevigata*



Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 7** - Espectros de hidrocarbonetos cuticulares de fêmeas fecundadas de *Atta sexdens*



Fonte: Dados da pesquisa

### 5.2 Rainhas isoladas e não isoladas

As rainhas acasaladas (RA) foram mantidas em duas condições: isoladas e não isoladas. Ambas espécies não apresentaram diferenças quanto aos níveis de encapsulamento nas duas condições estabelecidas. Assim, a permanência da rainha junto às operárias e ao jardim de fungo não influenciou no processo de encapsulamento do fio de nylon. Contudo, observaram-se alterações comportamentais das operárias mantidas junto a rainha após a inserção do fio de nylon, como a maior frequência de comportamentos de limpeza

(*grooming*). Além disso, em dois ninhos de *A. laevigata* e em um de *A. sexdens* as operárias removeram o filamento de nylon do gáster da rainha, depositando-o na câmara de descarte (Figura 8). Os dados obtidos para RA isoladas e não isoladas foram somados e submetidos à análise estatística para cada espécie alvo desse estudo.

**Figura 8** - Filamento de nylon removido pelas operárias do gáster de RA, encontrado na câmara de descarte do ninho.



Fonte: Autor

### 5.3 Níveis de encapsulamento de *Atta sexdens*

Não foi possível a coleta de fêmeas reprodutoras não acasaladas (RNA) de *A. sexdens* e, portanto, não foi realizada a análise comparativa entre os três estágios do acasalamento e entre as espécies. Dentre os grupos analisados, RA apresentou a menor taxa de encapsulamento (Figura 11) quando comparado com RRA e com os dados obtidos para *A. laevigata* ( $p < 0,0001$ ). O grupo de rainhas recém-acasaladas (RRA) apresentou o mesmo nível de encapsulamento encontrado em *A. laevigata*. Mais pesquisas são necessárias para elucidar como o acasalamento influencia as respostas imunes dessa espécie.

Figura 9 - Filamentos de nylon encapsulados removidos de RA de *A. sexdens* após 24 horas.



Fonte: Autor

#### 5.4 Níveis de encapsulamento de *Atta laevigata*

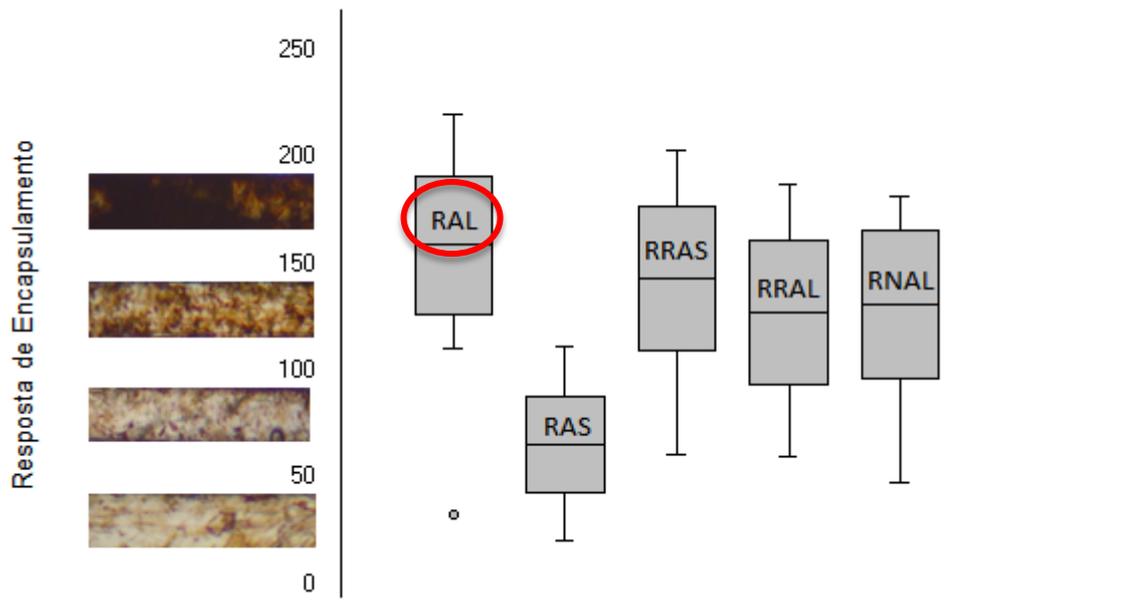
Os níveis de encapsulamento foram quantificados quanto à coloração dos filamentos de nylon retirados do gáster das rainhas. As RA apresentaram o maior nível de encapsulamento (coloração mais escura) quando comparado aos grupos RRA e RNA ( $p < 0,0001$ ), os quais apresentaram níveis semelhantes (Figura 10 e 11). Os resultados obtidos sugerem que os eventos de acasalamento e estabelecimento do ninho têm efeitos nas respostas imunes celulares das rainhas dessa espécie, assim como o tempo entre os estágios do status reprodutivo.

**Figura 10** - Filamentos de nylon encapsulados removidos do gáster de: (a) rainhas acasaladas (RA); (b) rainhas recém-acasaladas (RRA); (c) rainhas não acasaladas (RNA) de *A. laevigata*.



Fonte: Autor

**Figura 11** - Análise comparativa entre os níveis de encapsulamento de rainhas em diferentes estágios do status reprodutivo. RAL: rainhas acasaladas de *A. laevigata*; RAS: rainhas acasaladas de *A. sexdens*; RRAS: rainhas recém-acasaladas de *A. sexdens*; RRAL: rainhas recém-acasaladas de *A. laevigata*; RNAL: fêmeas reprodutoras não acasaladas de *A. laevigata*. No círculo vermelho o grupo que apresentou a menor massa corpórea ( $p < 0,0001$ ).



Fonte: Autor

## 5.5 Correlação

O encapsulamento não apresentou correlação significativa com a massa do corpo e o tamanho da cabeça das rainhas em ambas espécies. Contudo, a massa corpórea diferiu entre os estágios do status reprodutivo ( $p < 0,0001$ ). Para as duas espécies, RA apresentou a menor massa corporal, enquanto que RRA e RNA apresentaram massas similares.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que o acasalamento influencia a defesa imune interna das rainhas de *A. sexdens* e *A. laevigata*. Contudo, as alterações nos níveis celulares de defesa interna só foram verificadas após a fase de fundação do ninho, sendo que para *A. laevigata* foi observada regulação positiva da resposta imune e para *A. sexdens* a regulação negativa. Os dados obtidos nesse estudo sugerem que, apesar do nível de encapsulamento ter sido alterado nos diferentes estágios da reprodução, a cópula não é um fator que atua de maneira imediata no sistema de defesa celular, já que os níveis de encapsulamento se mantiveram inalterados logo após o acasalamento. Os eventos reprodutivos pós-acasalamento, como a fundação do ninho, provocaram a regulação do sistema imune celular.

O termo *immune priming* é utilizado para discutir alterações na defesa imune celular de rainhas naturalmente acasaladas de *L. niger* e a maior resistência à patógenos em rainhas naturalmente acasaladas das espécies *L. niger* e *F. selysi* (GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014). Os autores sugerem que o *immune priming* depende do status reprodutivo e varia com as condições de acasalamento e espécie, e que o acasalamento desencadeia uma reação positiva no sistema imune desses indivíduos, podendo estar relacionada com mudanças hormonais associadas com oviposição, fluido seminal, transmissão de patógenos durante o acasalamento, histólise muscular, feridas de acasalamento e perda das asas (SHOEMAKER *et al.*, 2006; KAMIMURA, 2007; CASTELLA *et al.*, 2009).

A resposta de encapsulamento é mantida durante o voo nupcial e, possivelmente, regulada de forma positiva após a fundação da colônia. Em *A. colombica* rainhas recém-acasaladas não apresentaram diferença significativa no número de hemócitos quando comparado aos valores de rainhas não acasaladas (BAER; ARMITAGE; BOOMSMA, 2006). Essas alterações na defesa a nível celular do indivíduo também foram verificadas na presente pesquisa, já que o grupo RA apresentou maior nível de encapsulamento na espécie *A. laevigata* quando comparado aos grupos RNA e RRA, que tiveram valores próximos nas duas espécies. Em *A. sexdens* RA apresentou menor nível de encapsulamento, sugerindo que nessa espécie ocorre uma regulação negativa do sistema imune celular após a reprodução.

Baer, Armitage e Boomsma (2006) discutem que o risco de rainhas de *A. colombica* adoecerem após o voo nupcial e até morrerem é proporcional à quantidade de espermatozoides estocados na espermateca e ao número de inseminações. De maneira que, os custos metabólicos para manter os espermatozoides ocasionam um *trade-off* diante as respostas imunes a nível individual durante o período solitário de fundação da colônia,

quando há limitação de recursos. O efeito negativo do número de inseminações pode ser um custo tardio da reprodução, pois copular com mais machos implicaria em mais horas de voo e maior uso da reserva energética que também seria usada em respostas imunes durante a fundação da colônia (BAER; ARMITAGE; BOOMSMA, 2006). Assim, os custos metabólicos investidos no acasalamento provocam um intervalo do investimento na defesa celular, o qual é redirecionado à defesa após o estabelecimento da colônia.

A ativação e o uso do sistema imune celular têm custo energético e podem ser comprometidos com a ocorrência simultânea de outras atividades que exigem energia (NORDLING *et al.*, 1998; KONIG; SCHMID-HEMPEL, 1995; DEMAS *et al.*, 1997). De modo que o efeito principal de uma infecção não é o dano direto causado pelo parasita, mas sim o custo imposto ao hospedeiro para ativação eficiente do sistema imune celular. Assim, o custo para a sobrevivência é constantemente pago para controlar infecções e tal custo só é notado quando há falta de recursos disponíveis para compensá-lo (MORET; SCHMID-HEMPEL, 2000). O período solitário da fundação da colônia pode representar a redução dos recursos disponíveis e altos gastos energéticos, o que interfere na regulação de seu sistema imune.

Em fêmeas reprodutoras de *F. aquilonia*, os maiores indivíduos apresentaram maior nível de encapsulamento em habitat de floresta quando tiveram seus valores comparados a indivíduos em áreas desmatadas. Em indivíduos encontrados em áreas perturbadas a relação entre o nível de encapsulamento e o tamanho do corpo era inversa, os menores apresentaram maior resposta imune celular. Fêmeas com melhores recursos e condições podem ter o potencial de alocar recursos tanto para crescimento quanto para defesa imune, enquanto indivíduos com poucos recursos e condições desfavoráveis podem não apresentar tal potencial, levando a um *trade-off* entre tamanho do corpo e defesa imune. A largura da cabeça foi utilizada como medida padrão para o tamanho do corpo (SORVARI; HAKKARAINEN; RANTALA, 2008).

Na presente pesquisa não foram encontradas correlações entre a taxa de encapsulamento, tamanho do corpo (largura da cabeça) e massa, e essa última foi diferente para cada status reprodutivo. Ainda que não seja possível afirmar que a massa do corpo está relacionada diretamente com a defesa imune celular, o investimento na fundação da colônia e nas defesas imunes gera altos custos energéticos, o que pode reduzir a massa corpórea. Em *A. laevigata*, o grupo coletado logo após o nascimento das primeiras operárias, que apresentou maior nível de encapsulamento, apresentou a menor massa corporal. Os custos investidos na defesa imunológica dos insetos são dependentes da condição de sua nutrição e é desregulada

quando em estresse nutricional (SUWANCHAICHINDA; PASKEWITZ, 1998; SIVA-JOTHY; THOMPSON, 2002, RANTALA *et al.* 2003a), como no período pós-acasalamento das RRA.

A eussociabilidade das formigas pode ser o fator que possibilita o investimento em reprodução e subsistência, pois diferente de insetos solitários, não permanecem sozinhas após a fundação da colônia (GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014). O aumento dos comportamentos de trofalaxia após a indução de respostas imunes observado em operárias de *Camponotus fellah* (SOUZA *et al.* 2008) e a presença de secreções depositadas por operárias de *A. sexdens* sobre o jardim de fungo que têm participação na assepsia do ninho e na inibição de patógenos (RODRIGUES *et al.*, 2008; PEREIRA; BUENO, 2019) são exemplos de que a imunidade social complementa os mecanismos individuais de defesa.

As RA foram mantidas isoladas e não isoladas nos ensaios realizados na presente pesquisa. Os resultados dos níveis de encapsulamento não evidenciarem os efeitos do isolamento, mas no grupo não isolado observaram-se alterações comportamentais das operárias que tentaram remover o filamento de nylon do gáster da rainha. Essa alteração sugere que a vida em grupo pode suprir alguns papéis das respostas imunes a nível individual, já que com a remoção do antígeno pelas operárias a rainha reduz seu investimento em mecanismos celulares de defesa. Mais estudos são necessários para esclarecer a diferença encontrada entre as espécies *A. sexdens* e *A. laevigata* quanto aos investimentos na defesa celular e a influência dos eventos da reprodução nos processos mediados pelos hemócitos que estão presentes na hemolinfa.

## 7 CONCLUSÃO

O status reprodutivo interferiu na resposta imune de encapsulamento das rainhas de formigas-cortadeiras das espécies *Atta sexdens* e *Atta laevigata*. E, portanto, a resistência a patógenos nas rainhas que foram objeto desse estudo foi influenciada pela reprodução. Os eventos reprodutivos produziram regulação positiva da defesa celular em *A. laevigata* e negativa em *A. sexdens*, já que RA (rainhas acasaladas) de *A. laevigata* apresentou o maior nível de encapsulamento quando comparado aos demais grupos. Os valores de RNA (rainhas não acasaladas) dessa espécie foram menores e próximos ao grupo RRA (rainhas recém-acasaladas), sugerindo que o intervalo entre o acasalamento e a fundação da colônia influencia nos custos metabólicos investidos no sistema imune celular. O nível de encapsulamento não apresentou correlação com a largura da cabeça e nem com a massa corpórea. Por se tratarem de espécies pragas, estudos pioneiros quanto aos mecanismos de defesa celular das formigas cortadeiras podem contribuir para o esclarecimento das respostas imunes desse inseto e para o aperfeiçoamento dos métodos de controle atuais.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, R. D. The evolution of social behavior. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, 5, 325-383, 1974.
- AMANTE, E. Comentários sobre a ecologia da saúva *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, nos meses frios. **Divulgação Agronômica**, São Paulo, 2, 34-5, 1960.
- ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, 40, 293–306, 2002.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera-Formicidae). I – Evolução do saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, 12, 197-228, 1941.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera: Formicidae): III – Escavação de um saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, 13, 136-148, 1942.
- BAER, B.; ARMITAGE S.A.O.; BOOMSMA, J.J. Sperm storage induces an immunity cost in ants. **Nature**, 441, 872–875, 2006.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, 20,1–6, 1995.
- BEST, A. H.; TIDBURY, A.; WHITE, M. The evolutionary dynamics of within-generation immune priming in invertebrate hosts. **Journal of The Royal Society Interface**, 10, 80, 2013.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectiva no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, 11, 31-46, 1997.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, 12, 64–76, 2000.
- BOOMSMA, J.; SCHMID-HEMPEL, P.; HUGHES, W. O. H. Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. In: FELLOWES, M. D. E.; HOLLOWAY, G. J. *et al.* (Ed.). **Insects Evolutionary ecology** – Proceedings of the Royal Entomological Society's 22nd Symposium. Reading – UK: CABI Publishing, 2003.
- BRIAN, M. V. Leaf-cutting ants bleed mineral elements out of rainforest in Southern Venezuela. **Tropical Ecology**, New York, 24, 86-93, 1983.
- CARLOS, A. A. **Semioquímicos e comunicação sonora em formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. 2013. Tese - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

- CASTELLA, G.; CHRISTE, P.; CHAPUISAT, M. Mating triggers dynamic immune regulations in wood ant queens. **Journal of Evolutionary Biology**, 22, 564–570, 2009.
- CÔTÉ, I. M.; POULIN, R. Parasitism and group size in social mammals: a metaanalysis. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Berlin, v. 6, p. 159-165, 1995.
- CREMER S.; ARMITAGE S. A. O.; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. **Current Biology**, 17, 693–702, 2007.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; BENTO, J. M. S. Voo nupcial ou revoada. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas-cortadeiras**. Folha de Viçosa, Viçosa, 54-59, 1993.
- DELLA LUCIA, T. M. C. *et al.* **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. da UFV, 2011.
- DEMAS, G. E.; CHEFER, V.; TALAN, M. I.; Nelson, R. J. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. **American Journal of Physiology**, 273, 1997.
- FEARON, D.T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**, 388, 323–324, 1997.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Biological Journal of the Linnean Society**, 81, 39-48, 2004.
- GÁLVEZ, D.; CHAPUISAT, M. Immune priming and pathogen resistance in ant queens. **Ecology and evolution**, 4, 10, 1761-1767, 2014.
- GARNIER, R.; BOULINIER, T.; GANDON, S. Evolution of the temporal persistence of immune protection. **Biology Letters**. 9:20130017, 2013.
- GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, 42, 611–643, 1997.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. Cambridge: Harvard University Press, 732, 1990.
- HÖLLDOBLER, B; WILSON, E. O. **The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies**. New York: WW Norton & Company, 2009.
- JACOBY, M. Das raumliche wachsen des *Atta*-nestes vom 50. Bis zum 90. tage (Hymenoptera, Formicidae). **Revista de Entomologia**, Curitiba, 7, 416-425, 1937.
- KAMIMURA, Y. Copulatory wounds in the monandrous ant species *Formica japonica* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, 55, 5 –53, 2008.
- KONIG, P.; SCHMID-HEMPEL, P. Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris*. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, 260, 1995.

- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. - Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, 32, 10, 1295-1309, 2002.
- LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 31, 219–229, 2001.
- MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 167, 1970.
- MEISTER, M.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. **Current Topics in Microbiology**, 248, 17–36, 2000.
- MEHDIABADI, N.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, 13, 37-55, 2009.
- MINTZER, A. Foundress female weight and cooperative foundation in *Atta* leaf-cutting ants. In: VANDER MEER, R. K.; CEDENO, A. (Ed.). **Applied myrmecology: a word perspective**, 211-219, 1990.
- MORET, Y.; SCHMID-HEMPEL, P. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. **Science**, 290, 1166–1168, 2000.
- NAPPI, A. J.; VASS, E.; FREY, F.; CARTON, Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **European Journal of Cell Biology**, 68, 450–456, 1995.
- NORDLING, D. *et al.* Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 265, 1403, 1291-1298, 1998.
- OLDROYD, B. P.; FEWELL, J. H. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. **Trends in Ecology and Evolution**, Massachusetts, 22, 8, 408-413, 2007.
- ORTIUS-LECHNER, D.; MAILE, R; MORGAN, E. D.; BOOMSMA, J. J. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance. **Journal of Chemical Ecology**, Berlin, 26, 7, 1667-1683, 2000.
- PAUL, J.; ROCES, F. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. **Journal of Insect Physiology**. 49, 347-357, 2003.
- PEREIRA, M. C. **O papel das secreções das formigas-cortadeiras na defesa da colônia**. 2019. Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.
- RANTALA, M. J.; KOSKIMA KI, J.; TASKINEN, J.; TYNKKYNNEN, K.; SUHONEN, J. Immunocompetence, developmental stability and wing spot size in the damselfly *Calopteryx splendens*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 267, 2453–2457, 2000.
- RANTALA, M. J.; JOKINEN, I.; KORTET, R.; VAINIKKA, A.; SUHONEN, J. Do pheromones reveal male immunocompetence? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 269, 1681–1685, 2002.

RANTALA, M. J., KORTET, R., KOTIAHO, J. S., VAINIKKA, A. & SUHONEN, J. Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. **Functional Ecology**, 17, 534–540, 2003a.

RANTALA M. J., KORTET R. Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*? **Biological Journal of the Linnean Society**, 79, 503–510, 2003.

RANTALA M. J.; ROFF D. A. Inbreeding and extreme outbreeding cause sex differences in immune defence and life history traits in *Epirrita autumnata*. **Nature**, 98, 329–336, 2007.

RIBEIRO, M. M. R.; SOUZA, D. J.; GANDRA, L. C.; DELLA-LUCIA, T. M. C. Immunocompetence and energetic metabolism in different groups of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, 58, 2, 2011.

ROLFF, J.; REYNOLDS, S. **Insect infection and immunity: evolution, ecology and mechanisms**. Oxford: Oxford Univ. Press, 2009.

ROSENGAUS, R. B.; MAXMEN, A. B.; COATES, L. E.; TRANIELLO, J. F. A. Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis*. **Behavior Ecology Sociobiology**, 44, 124–134, 1998.

ROSENGAUS, R. B.; JORDAN, C.; LEFEBVRE, M. L.; TRANIELLO, J. F. A. Pathogen alarm behavior in a termite: a new form of communication in social insects. **Naturwissenschaften**. 86, 544–548, 1999.

ROSENGAUS, R. B.; LEFEBVRE, M. L.; TRANIELLO, J. F. A. Inhibition of fungal spore germination by Nasutitermes: evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. **Journal Chemical Ecology**. 26, 21–39, 2000.

RYDER, J. J.; SIVA–JOTHY, M. T. Male calling song provides a reliable signal of immune function in a cricket. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 267, 1449, 1171–1175, 2000.

SCHMIDT, O., THEOPOLD, U., STRAND, M. R. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. **BioEssays**, 23, 344–351. 2001.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 105, 5435–5440, 2008.

SHOEMAKER, K. L.; PARSONS N. M.; ADAMO, S. A. Mating enhances parasite resistance in the cricket *Gryllus texensis*. **Animal Behaviour**, 71, 371–380, 2006.

SIVA- JOTHY, M. T.; THOMPSON, J. J. W. Short-term nutrient deprivation affects immune function. **Physiological Entomology**, 27, 3, 206–212, 2002.

SORVARI, J.; HAKKARAINEN, H.; RANTALA, M. J. Immune defense of ants is associated with changes in habitat characteristics. **Environmental Entomology**, 37, 51–56, 2008.

- SOUZA, D. J.; VLAENDEREN, J. V.; MORET, Y.; LENOIR, A. Immune response affects ant trophallactic behaviour. **Journal of Insect Physiology**, 54, 828– 832, 2008.
- STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. **Annual Review of Entomology**. 40, 31–56, 1995.
- SUDD, J. H. **An introduction to the behavior of ants**. London: Edward Arnold Ltda. 200, 1970.
- SUDD, J. H. Ants: foraging, nesting, brood behavior, and polyethism. In: HERMANN. H. R. (Ed.). **Social Insects**. 4. Ed. New York: Academic Press, 107-155, 1982.
- SUWANCHAICHINDA, C; PASKEWITZ, S. M. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to melanize *Sephadex beads*. **Journal of Medical Entomology**, 35, 2, 157-161, 1998.
- VASS, E.; NAPPI, A.J. Fruit fly immunity. **BioEssays**. 51, 529–535, 2001.
- VILLESEN, P. *et al.* Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 269, 1500, 1541-1548, 2002.
- WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, 153, 587-604, 1966.
- WEBER, N. A. **Gardening ants: the Attines**. Pennsylvania: American Philosophical Society, 146, 1972.
- WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta. I. The overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 7, 143-156, 1980.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 548, 1971.

Rio Claro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Bianca Raissa Nogueira  
(Aluna)

---

Odair Correa Bueno  
(Orientador)

---

Mayara Cristina Pereira  
(Coorientadora)