

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E DO DESENVOLVIMENTO – ICB

LEANDRO GOMES DA SILVA

**Morte celular programada em corpo gorduroso de *Atta*
sexdens rubropilosa (Hymenoptera, Formicidae) no
desenvolvimento pós-embrionário**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2018

LEANDRO GOMES DA SILVA

Morte celular programada em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) no desenvolvimento pós-embrionário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Fábio Siviero

Versão Corrigida

**SÃO PAULO
2018**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo (a) autor(a)

Silva, Leandro Gomes da

Morte Celular programada em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) no desenvolvimento pós-embriônico. / Leandro Gomes da Silva; orientador (a) Prof. Dr. Fábio Siviero.-- São Paulo, 2019.

99 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Morte celular programada. 2. Corpo gorduroso. 3. *Atta sexdens rubropilosa*. 4. Metamorfose . I. Siviero, Fábio, orientador . II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Gomes da Silva

Titulo da Dissertação/Tese: Morte celular programada em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) no desenvolvimento pós-embriônico

Orientador: Prof. Dr. Fábio Siviero

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

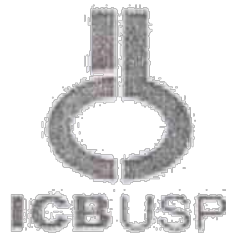
() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05505-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3693-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 816/2016 referente ao projeto intitulado: *"Morte celular programada em corpo gorduroso de Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera, Formicidae) no desenvolvimento pós-embriônico"* sob a responsabilidade de *Leandro Gomes da Silva* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Fábio Siviero*, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPESH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 08 de junho de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. Paulo Marinho A. Zanotto
Coordenador CEPESH ICB/USP



A Alfonso Vivar

“É tão estranho, os bons morrem jovens [...]”

Legião Urbana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador e amigo Fábio Siviero, pela extrema dedicação e paciência, sem o qual esse trabalho jamais seria concebido.

Aos professores André Frazão (IB – USP) e Odair (CEIS – UNESP), e à Ana Eugênia (Inst. Biológico – SP), pelo fornecimento dos espécimes.

Aos técnicos de laboratório do ICB – USP, que muito me auxiliaram durante toda a pesquisa: Edilberto, Cruz, Gisela, Fernanda, Roberto Cabado; e aos colegas de pós-graduação, que também deram importante auxílio técnico, bons conselhos e horas de prazerosa convivência: Alfonso (*in memoriam*), Norton, Melissa e Natália (ICB), e à Dani (IB – Fisiologia), pelas preciosas dicas e ajuda.

À Carla, pelo coleguismo e pelo auxílio nas sessões de microscopia de fluorescência.

A Bruno Lira, por se dispor de tempo e paciência para me ensinar as técnicas de dissecação, mesmo não pertencendo mais formalmente ao quadro do corpo discente do Instituto.

À professora Dra. Vanessa Freitas e à Ana, pelos anticorpos concedidos gentilmente.

À Jô e ao CEFAP, pela disponibilização do laboratório de microscopia de fluorescência.

Aos amigos Alex e Rodrigo, pelos conselhos de quem já passou pelo mestrado (e sobreviveram!) e pelas boas conversas fiadas também.

A Sergio Lisboa, igualmente pelos bons conselhos, por me trazer de volta ao chão quando eu insistia em devanear, por me reerguer quando eu achava que não pudesse mais me levantar.

À minha família, pelo apoio e carinho de toda a vida, em especial à minha mãe Elizabeth, a quem devo desculpas por não ter comparecido tanto quanto eu gostaria às reuniões de família devido às sessões de trabalho acadêmico.

Aos amigos do Colégio Escalada e da Etec Jaraguá, por todo apoio e amizade.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente ao sucesso desse trabalho e que, devido a minha fraca memória, eu não pude citá-los, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Ninguém está mais desarmado do que o cientista para pensar sua ciência.”

Edgar Morin

RESUMO

SILVA, L.G. Morte celular programada em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) no desenvolvimento pós-embrionário. 2018. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.

O corpo gorduroso na formiga cortadeira saúva-limão (*Atta sexdens rubropilosa* – Forel 1908) é o tecido responsável pelo armazenamento de substâncias de reserva e sede de uma série de reações metabólicas promotoras da homeostase nos diversos estágios do desenvolvimento pós-embrionário. A metamorfose representa o período de mudanças mais drásticas a esse tecido, que passa por uma modificação acentuada, sobretudo devido à morte celular programada, ao reaproveitamento e à reciclagem de estruturas celulares. Em nossos achados, a morte celular provocada pela autofagia apresentou-se como o principal mecanismo de histólise do corpo gorduroso, sobretudo nas fases de larva e pupa. As análises histoquímica e ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão apresentaram um caráter morfológico compatível com o estado de desagregação celular e de consumo do conteúdo citoplasmático. Marcações com MDC e anti-LC3 também demonstraram a formação de vacúolos autofágicos, bem como a marcação positiva para anti-Lamp1 sugeriu a atuação lisossômica no tecido, principalmente nas fases juvenis. Além disso, o qPCR para *Atg4b* mostrou a presença de expressão nessas mesmas fases, revalidando a hipótese de atuação ativa da autofagia na transformação do corpo gorduroso. Embora não se exclua a possibilidade da ocorrência concomitante de outras categorias de morte celular, os testes para apoptose que foram empregados, como a análise da degradação do DNA e a coloração com laranja de acridina, não demonstraram a mesma importância na reestruturação tecidual. Mesmo o citoesqueleto das células apresentou-se íntegro, em sua maior parte. Assim, sugerimos que, em *A. sexdens rubropilosa*, a morte celular do corpo gorduroso atuante durante a metamorfose é sobretudo autofágica.

Palavras-chaves: corpo gorduroso; morte celular programada; metamorfose; *Atta sexdens rubropilosa*.

ABSTRACT

SILVA, L.G. Programmed cell death in fat body of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) in post-embryonic development. 2018. 94 s. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo. 2018.

The fat body in the leaf-cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa* - Forel 1908) is the tissue responsible for storing reserve substances and hosts a series of homeostasis-promoting metabolic reactions at various stages of post-embryonic development. Metamorphosis represents the period of more drastic changes to this tissue, which undergoes a marked change, mainly due to programmed cell death, reuse and recycling of cellular structures. In our findings, cell death caused by autophagy was the main mechanism of histolysis of the fat body, especially in larvae and pupa phases. The histochemical and ultrastructural analyzes in transmission electron microscopy presented a morphological character compatible with the state of cellular disaggregation and consumption of the cytoplasmic content. Labeling with MDC and anti-LC3 also demonstrated the formation of autophagic vacuoles, as well as the positive labeling for anti-Lamp1 suggested the lysosomal action in the tissue, mainly in juvenile phases. In addition, the qPCR for Atg4b showed expression in these same phases, revalidating the hypothesis of active action of autophagy in the transformation of the fat body. Although the possibility of concomitant occurrence of other categories of cell death is not excluded, the apoptosis tests that were employed, such as DNA degradation analysis and acridine orange staining, did not demonstrate the same importance in tissue remodeling. Even the cytoskeleton of the cells was intact, for the most part. Thus, we suggest that, in *A. sexdens rubropilosa*, cell death of the fat body acting during the metamorphosis is mainly autophagic.

Keywords: fat body; programmed cell death; metamorphosis; *Atta sexdens rubropilosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Modelos da via intrínseca da apoptose em três diferentes espécies.....	30
Figura 02: Etapas da macroautofagia em eucariotos.....	32
Figura 03: Papel do complexo mTOR e dos diversos fatores atg na formação da membrana do autofagossomo.....	34
Figura 04: Principais vias de morte celular programada.....	37
Figura 05: Sequência similar a Atg4b em <i>A. sexdens rubropilosa</i>	56
Figura 06: Sequência similar a Atg4b em <i>Atta</i>	56
Figura 07: ORF de sequência similar a Atg4b em <i>Atta</i>	57
Figura 08: Histoquímica do corpo gorduroso das variedades juvenil e adulta de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	59
Figura 09: MET de corpo gorduroso de larva de <i>A. sexdens rubropilosa</i> mostrando vesículas em degradação.....	60
Figura 10: MET de corpo gorduroso de larva de <i>A. sexdens rubropilosa</i> mostrando a presença de vacúolos autofágicos.....	61
Figura 11: MET de corpo gorduroso de larva de <i>A. sexdens rubropilosa</i> mostrando células em degradação autofágica.....	62
Figura 12: MET de corpo gorduroso de pupa de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	63
Figura 13: MET de corpo gorduroso de operária adulta de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	64
Figura 14: MET de corpo gorduroso de operária adulta de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	65

Figura 15: MET de corpo gorduroso de operária adulta de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	66
Figura 16: MET de corpo gorduroso de operária adulta de operária lixeira adulta	67
Figura 17: Microscopia Confocal de varredura a laser em corpo gorduroso de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	68
Figura 18: Marcação vermelho do Nilo (Nile Red)	69
Figura 19: Amostra não fixada de corpo gorduroso de <i>A. sexdens rubropilosa</i> marcadas em MDC.....	69
Figura 20: Imunomarcção MDC / Lamp 1.....	70
Figura 21: Imunomarcção com MDC e anti LC3	71
Figura 22: Coloração com laranja de acridina.....	72
Figura 23: Eletroforese em gel: extração de DNA do corpo gorduroso de larva, pupa e adulto	72
Figura 24: Quantificação de níveis de transcrição de ATG-4B por PCR em tempo real em corpo gorduroso.....	73
Figura 25: Curva de melting da reação de qRT-PCR.....	73
Figura 26: Análise evolutiva pelo método de máxima verossimilhança.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Caracterização dos espécimes de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizados em cada ensaio	42
Tabela 02: Parâmetros utilizados nas reações de RT-PCR.....	47
Tabela 03: Condições de ciclagem da RT-PCR em tempo real.....	47
Tabela 04: Primers usados no protocolo de qRT-PCR.....	48
Tabela 05: Números de acesso das sequências utilizadas para a análise filogenética de Atg4b-like	49

LISTA DE ABREVIATURAS

20E – hormônio 20-hidroxicadisona

ATG – proteína relacionada à autofagia

ATP – trifosfato de adenosina

Blast – Basic local alignment search tool

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

Cvt – alvo da vacuolização do citoplasma

DAG – diacilglicerol

DNA – ácido desoxirribonucleico

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GenBank – base de dados de sequências genéticas

GP – glândulas prootorácicas

IL – interleucina

JH – hormônio juvenil

Lamp1- proteína associada à membrana lisossomal 1

LC3 – proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos

MCP – morte celular programada

MDC – monodansylcadaverina

MLKL – domínio da quinase de linhagem mista

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NGS – sequenciamento de próxima geração -

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PE – fosfatidiletanolamina

PTTH – hormônio protoracicotrópico

qPCR – PCR quantitativo

RER – retículo endoplasmático rugoso

RIP – receptor de interação à proteína quinase

RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR – PCR em transcriptase reversa

TAG – triacilglicerol

TCA – ácido tricarbóxico

TOR – alvo da rapamicina

TUNEL – marcação de nicks por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase

USP – proteína ultraespiráculo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O corpo gorduroso em insetos	19
1.2 Atta sexdens rubropilosa	25
1.2.1 Metamorfose	26
1.3 Morte celular programada	28
1.3.1 Apoptose	29
1.3.2 Autofagia	31
1.3.3 Outros tipos de MCP	35
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4 RESULTADOS	50
5 DISCUSSÃO	75
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE	98

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Desde o estabelecimento dos primeiros metazoários, a multicelularidade já estava consolidada como um paradigma aos seres vivos. Mesmo após a diferenciação celular, estas continuam a se comunicar entre si e com as diversas células do organismo a partir de uma intrincada rede de comunicação e interação, também conhecidas como vias de sinalização celular. Através dessas vias, os tecidos estabelecem o equilíbrio homeostático do organismo, promovem o crescimento e o desenvolvimento estrutural e determinam quais células não são mais necessárias ao bem do conjunto. Essas são chamadas de vias de morte celular programada. O seu acionamento nos momentos certos garante a sobrevivência e o bom funcionamento de todo o organismo.

Paralelamente, a evolução selecionou diversas estratégias de desenvolvimento, garantindo assim a diversificação biológica. Uma dessas categorias é o desenvolvimento holometábolo, apresentado por muitas ordens de insetos, e até mesmo entre alguns vertebrados, como anfíbios anuros. Nesse tipo de desenvolvimento, uma série de transformações celulares tem lugar em órgãos e tecidos de indivíduos jovens, visando à reestruturação, às vezes quase que completa, de toda a anatomia, interna e externa. Decorre daí a importância da morte celular programada no desenvolvimento pós-embriônico.

Soma-se a isso, a necessidade de se manter o organismo bem nutrido para as demandas energéticas exigidas por essa modalidade de desenvolvimento. Nos insetos, surge um tipo de tecido multifuncional, o qual também é um armazenador de substâncias, suprimindo o metabolismo em períodos de escassez. Esse tecido é o corpo gorduroso, que embora o nome possa sugerir, não armazena apenas gordura, mas sim, uma série de substâncias, além de sintetizar muitas outras.

Esse presente trabalho visa estabelecer a relação entre os possíveis tipos de morte celular programada que são estabelecidos no corpo gorduroso de insetos, tomando como modelo a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*.

1.1 O corpo gorduroso em insetos

O corpo gorduroso, tecido presente na maioria dos insetos, tem como principais funções o preenchimento, o armazenamento e a reserva de nutrientes no corpo do animal. Normalmente, o corpo gorduroso apresenta-se em duas camadas, a perivisceral, em volta do tubo digestório; e a parietal, adjacente à parte interna do tegumento (HAUNERLAND e SHIRK, 1995).

Em himenóptera, o tecido perivisceral encontra-se em contato direto com as porções do intestino, no abdômen, embora também possa ser encontrado na região cefálica (ROMA et al., 2005). Esse contato com a porção digestiva garante a mobilização dos nutrientes ingeridos ao citoplasma de suas células, as quais estabelecem contato direto com a hemolinfa, garantindo o transporte de substâncias através da circulação (GULLAN e CRANSTON, 2017; CHAPMAN et al., 2012).

Embora pareça homogêneo, o corpo gorduroso é composto por diversos tipos celulares. Os mais recorrentes são os trofócitos e os enócitos. Os trofócitos, antigamente chamados de adipócitos, são células de origem mesodérmica e consideradas as principais células de reserva energética (ARRESE e SOULAGES, 2010; HAUNERLAND e SHIRK, 1995).

Seu citoplasma apresenta diversas vesículas preenchidas por materiais de natureza lipídica, em sua maioria, mas também por proteínas e glicídios. Devido à presença das vesículas de reserva, o núcleo dessas células frequentemente apresenta formato irregular, muitas vezes mostrando-se periférico e poliédrico (ROMA et al., 2005).

Os enócitos são células de origem ectodérmica, de formato ovalar e núcleo arredondado. São encontrados na porção parietal, bem como disperso entre os

trofócitos, na porção perivisceral. Seu citoplasma é rico em retículo endoplasmático liso (REL) e frequentemente é uniformemente corado, porém, sob determinadas circunstâncias, pode apresentar vesículas (ROMA et al., 2005). Desempenham diferentes funções, dentre elas o metabolismo de ácidos graxos e hidrocarbonetos, síntese e processamento de lipídios e a detoxificação do organismo, funções similares às dos hepatócitos, nos vertebrados (MAKKI et al., 2014; MARTINS e RAMALHO-ORTIGÃO, 2012).

Alguns insetos apresentam ainda outros tipos celulares em seu corpo gorduroso. As células de urato, ou urócitos, apresentam depósitos de ácido úrico em seu citoplasma. A Ordem Blattodea e alguns insetos da Ordem Hemiptera apresentam micetócitos, células que abrigam microrganismos simbiotes relacionados com a imunidade e nutrição desses insetos (CHAPMAN et al., 2012; PAES DE OLIVEIRA e CRUZ-LANDIM, 2003).

O corpo gorduroso também desempenha funções endócrinas e de síntese de vitelogenina em fêmeas férteis. Como órgão endócrino, é responsável pela hidroxilação de ecdisona em 20-hidroecdisona (20E), o hormônio promotor da ecdise (GULLAN e CRANSTON, 2017).

1.1.1 *Metabolismo de lipídios*

Nos insetos, os lipídios representam uma reserva em processos que demandam um gasto energético intenso. A estocagem lipídica é marcadamente presente durante períodos que precedem o voo prolongado, durante períodos de inanição, como por exemplo, a pupação e metamorfose; e nas fêmeas durante a ovogênese (CHAPMAN et al., 2013; CANDY e KILBY, 1975). Além disso, o armazenamento de lipídios requer menos espaço nos tecidos do corpo gorduroso do que a porção equivalente de glicogênio, dessa forma, otimizando a massa corporal a ser sustentada durante o voo (ATELLA et al., 2012; SIMPSON e DOUGLAS, 2013).

Os ácidos graxos liberados durante a digestão são absorvidos pelas células do epitélio intestinal e posteriormente utilizados para a síntese de lipídios mais complexos. A internalização dos lipídios da hemolinfa para as células é realizada através de carregadores fosfolipoprotéicos conhecidos como lipoforinas (CHINO et al., 1981; CANAVOSO et al., 2001). Existem diversas classes de lipoforinas, que variam de acordo com o peso molecular e a quantidade de lipídio a qual estão associados.

Os insetos também apresentam lipídios de função estrutural e mediadores químicos, como o colesterol e as prostaglandinas (CANAVOSO et al., 2001). O colesterol é o principal esteroide utilizado como constituinte da membrana plasmática das células e como precursor de hormônios ecdisteroides. Ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico e o ácido linolênico, apresentaram-se essenciais durante o desenvolvimento regular de estruturas adultas na metamorfose em Lepidoptera e Hymenoptera (CANAVOSO et al., 2001).

Há poucos estudos relatando a ação de prostaglandinas nos insetos. Sua ação estaria relacionada regulação da secreção de fluidos nos túbulos de Malpighi e como moduladores da imunidade em *A. aegypti* e na formiga *Formica polyctena* (CANAVOSO et al., 2001). Os carotenoides, assim como entre os outros animais, devem ser ingeridos, e contribuem para a coloração do corpo dos insetos (KLOWDEN, 2007). As vitaminas lipossolúveis A e E contribuem respectivamente para o bom desempenho da visão e para a fertilidade (CHAPMAN et al., 2013). Ainda não há trabalhos conclusivos relatando a importância da vitamina K nos artrópodes (KLOWDEN, 2007; CANAVOSO et al., 2001).

A esterificação desses lipídios forma especialmente fosfolipídios, diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG), estes últimos compoendo mais da metade do peso seco do corpo gorduroso (ATELLA et al., 2012; SIMPSON e DOUGLAS, 2013). Canavoso e Wells (2000) demonstraram que, em *M. sexta*, TAG representam um reservatório e uma fonte de liberação de DAG, evitando-se assim o acúmulo de DAG nos tecidos, os quais são tóxicos em altas concentrações.

1.1.2 Metabolismo de proteínas

A digestão de proteínas, bem como a digestão final de carboidratos, ocorre no intestino intermediário, onde o pH pode variar de ácido a neutro. A hidrólise de proteínas é feita por enzimas proteolíticas, classificadas como endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas, removendo aminoácidos terminais da cadeia (KLOWDEN, 2007). Os aminoácidos resultantes da digestão são então transportados através das vilosidades intestinais, por estruturas de membrana conhecidas como microvilosidades, em diferentes porções do intestino intermediário (KLOWDEN, 2007; CHAPMAN et al., 2012).

Na hemolinfa, são formadas as proteínas de estoque, componentes dos grânulos de proteínas do corpo gorduroso. A formação de grânulos de proteínas advém de três vias principais: (1) sequestro de proteínas da hemolinfa; (2) isolamento e autólise de organelas celulares; e (3) isolamento, autólise incompleta e estoque intermediário de RER (LOCKE e COLLINS, 1968; 1965; HAUNERLAND, 1996).

Em *Calpodes ethlius* (Lepidoptera, Hesperiiidae), a principal reserva de glicogênio e proteínas, é formada no 5º instar, de 30 a 35 h antes da pupação. Os grânulos de proteínas são interiorizados pelas células do corpo gorduroso através da formação de vesículas pinocíticas (também chamadas corpúsculos multivesiculares), até 4h antes da ecdise (LOCKE e COLLINS, 1968). A formação de novos grânulos de proteínas persiste na pupa, o que pode sugerir que essas proteínas são produto da reabsorção da epiderme logo após a muda. Posteriormente, ocorre a formação de vacúolos autofágicos, contendo proteínas e RNA, originados principalmente pela autólise do RER (LOCKE e COLLINS, 1965).

Em *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), a diminuição na concentração de proteínas na hemolinfa e o seu aumento no corpo gorduroso coincide com o estágio larval-pupal. As fêmeas apresentaram maior concentração de grânulos de proteínas no corpo gorduroso do que machos e foram as únicas a apresentarem vitelogenina, a proteína precursora do vitelo (TOJO et al., 1979).

Nas formigas em geral, a síntese e a estocagem de proteínas representam o acúmulo de aminoácidos, estes mobilizados no organismo em tempo de escassez de alimento e/ou quando ocorre alta demanda energética. O padrão de estoque e utilização de proteínas pode variar entre as castas, de acordo com a dinâmica do desenvolvimento do ninho (WHEELER e MARTINEZ, 1995).

1.1.3 Metabolismo de carboidratos

Nos insetos, a digestão dos carboidratos é realizada por enzimas glicosidases específicas, capazes de hidrolisar ligações α e β , de acordo com o tipo de ligação glicolítica apresentada pelo carboidrato (KLOWDEN, 2007). O principal polissacarídeo de reserva é o glicogênio, armazenado nos músculos e no corpo gorduroso, importante para o voo imediato, ao passo que o voo prolongado mobiliza principalmente o metabolismo de lipídios (BEENAKKERS, 1969).

A trealose, dissacarídeo composto por duas moléculas de α -glicose, pode ser aproveitado por alguns insetos por apresentarem a enzima trealase (CHAPMAN, 2012). A digestão da trealose representa uma fonte imediata de energia, sendo, portanto, muito utilizada durante a manutenção do metabolismo basal (VARDANIS, 1962). O corpo gorduroso é estimulado por neuropeptídios produzidos pelo corpóra cardíaca, causando a diminuição de frutose 2,6-bifosfato e sinergicamente inibindo a produção da enzima 1,6-frutose bifosfatase, promovendo assim a síntese de trealose no tecido (BECKER et al., 1996).

A celulose, polissacarídeo constituinte da parede celular vegetal, normalmente não é digerida pelos insetos. Alguns fitófagos o conseguem fazê-lo graças a sua associação com protozoários endossimbiontes em seu intestino, que sintetizam α -glucanases, fornecendo a glicose aos seus hospedeiros, como produto da hidrólise do polissacarídeo (KLOWDEN, 2007). As formigas cortadeiras obtêm

os nutrientes da celulose a partir de sua digestão pelo fungo simbiote (CHAPMAN, 2012). O material vegetal, além de servir como um substrato ao fungo, serve como fonte de carboidratos e lipídios. Os aminoácidos essenciais são obtidos pela ingestão das hifas do fungo.

1.2 *Atta sexdens rubropilosa*

A formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) é uma das principais espécies considerada como praga agrícola. Popularmente, esta espécie é conhecida como saúva-limão, devido ao odor característico exalado quando esmagada devido à produção de citral em suas glândulas mandibulares (HÖLDOBBER e WILSON, 2010). Como todas as cortadeiras, a saúva-limão também apresenta fortes mandíbulas, além de corpo avermelhado e piloso. Seu tamanho pode variar desde a poucos milímetros a cerca de 2 cm no adulto.

As colônias são polimórficas, ou seja, o tamanho dos indivíduos adultos é muito variável e não necessariamente condiz com a divisão do trabalho na sociedade. Embora classifique-se as diferentes castas de acordo com a função realizada no ninho, como por exemplo, cortadeiras, carregadeiras, escoteiras, um mesmo indivíduo pode desempenhar diferentes funções, especialmente em ninhos mais jovens (FORTI et al., 2000). Dentre as distintas atividades realizadas pelas operárias adultas estão o cuidado com a prole, o forrageamento e a coleta de material vegetal, o cuidado e cultivo do substrato para o fungo, o cuidado da rainha e a limpeza do ninho (SCHNEIDER, 2003).

A recolha do material vegetal é feita diariamente, sendo as folhas o material mais coletado. Entretanto, também é possível observar operárias carregando pequenos frutos e/ou fragmentos de frutos maiores, flores e pecíolos foliares. Esse material vegetal é processado no interior do ninho, sob a ação da secreção das glândulas salivares e depósito do líquido fecal. O material resultante é então prensado, recortado e então incorporado ao jardim do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales, Basidiomycota), do qual obtêm parte de sua alimentação (SILVA et al., 2015; NICKELE et al., 2013; DINIZ e BUENO, 2007).

Embora reconhecidas como causadoras de enormes danos econômicos aos cultivos de *Eucalyptus* ssp. e *Pinus* spp., silvicultura e pecuária (NICKELE et al., 2013; FORTI et al., 2000), a relação de *A. sexdens rubropilosa* não

aparenta ser de todo danosa ao meio ambiente. De acordo com Leal et al. (2012), as formigas cortadeiras exercem um papel ambíguo em relação às plantas. Como efeito direto, por um lado praticam a herbivoria, predando principalmente as folhas para o preparo do substrato do fungo simbiote; e ao mesmo tempo, são importantes dispersoras de sementes, beneficiando diretamente a disseminação das espécies vegetais. Podem atuar ainda como agentes modeladores do solo e interferindo no regime de luz em matas de dossel.

1.2.1 Metamorfose

Assim como os demais insetos himenópteros, a saúva-limão também apresenta o ciclo de vida holometábolo, ou seja, como metamorfose completa. A metamorfose é o período de transformações metabólicas e morfológicas entre a fase larval e o adulto. Tal processo é influenciado por fatores endócrinos e ambientais (CHAPMAN, 2012; GULLAN e CRANSTON, 2017; PECHENIK, 2016).

As larvas de *A. sexdens rubropilosa* são ápodes, do tipo vermiforme. Acredita-se que, assim como na maioria dos himenópteros, elas possuam cinco estágios larvais. Muito embora não haja registros experimentais comprovando tal fato, uma vez que o comportamento de cuidado com a prole pelas formigas adultas dificulta o monitoramento dessas mudanças (SCHNEIDER, 2003). Um outro fator é o polimorfismo apresentado já na fase juvenil, impossibilitando-se a padronização de um sistema de classificação etária apenas pela morfologia larval.

A pupa em *A. sexdens rubropilosa* é do tipo exarata, onde os apêndices não estão rigidamente aderidos ao corpo (GULLAN e CRANSTON, 2017; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2016). O seu formato externo é muito semelhante ao de um adulto, porém possuem coloração esbranquiçada devido à ausência de esclerotização da cutícula.

Durante o estágio pupal o indivíduo não se alimenta. A sua sobrevivência provém da hemolinfa, através do consumo de reservas acumuladas durante o estágio larval. Assim, o desenvolvimento pós-embrionário dos insetos holometábolos é caracterizado pela histólise dos tecidos larvais, e pela histogênese de novos tecidos e estruturas (TRIPLEHORN e JOHNSON, 2016).

O sistema hormonal que rege as mudanças da metamorfose envolve principalmente os hormônios protoracicotrópico (PTTH), ecdisona e o hormônio juvenil (JH) (PECHENIK, 2016). Células neurosecretoras do cérebro produzem o PTTH, que por meio da hemolinfa ativa as glândulas protorácicas (GP). Na sequência, as GP secretam o precursor da ecdisona, que é convertido em 20-E nos tecidos alvo, promovendo a muda. Uma outra glândula localizada atrás do cérebro, a *corpora allata*, secreta o JH. Altas doses de JH inibem a secreção de PTTH e conseqüentemente impedem a ação da ecdisona, mantendo o indivíduo no estágio larval.

1.3 Morte celular programada

Os eventos de morte celular programada (MCP) foram extensivamente explorados nos últimos anos. Na nomenclatura antiga, o critério de classificação para a morte das células era o seu caráter bioquímico e morfológico, tipificando-se em I quando na presença de enzimas caspases e características típicas de apoptose; II na ocorrência de vacúolos autofágicos por toda a célula; e III, havendo o rompimento e extravasamento do conteúdo celular, caracterizando um quadro de inflamação, típico de necrose. Recentemente, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD*) reconsiderou alguns critérios de classificação baseando-se tanto na natureza do evento causador de morte (acidental ou regulada) quanto na configuração molecular apresentada, a fim de auxiliar os pesquisadores na identificação dos tipos de morte celular programada (GALLUZZI et al., 2015).

Segundo Ameisen (2002), MCP é um fenômeno de destituição dos componentes celulares frente a mudanças metabólicas e morfológicas, causadas previamente por ativação de um comando geneticamente programado. Como bem nos asseguram Danial e Korsmeyer (2004), MCP é um episódio de transformação tecidual promovido pelo remanejamento de células e estruturas a favor da homeostase. Para Kroemer et al. (2009), o conceito de MCP facilita a padronização dos critérios de identificação e classificação dos achados observados nas pesquisas dos ramos da biologia celular, morfologia, desenvolvimento e áreas afins.

O conceito de MCP é amplamente utilizado em grandes áreas da biologia celular, particularmente àquelas dedicadas ao estudo das modificações estruturais causadas por fatores intrínsecos, como a biologia do desenvolvimento e a senescência celular; ou provocadas por fatores extrínsecos, como a patologia, a imunologia e a farmacologia. Evidentemente, a aplicação pode ser utilizada para enquadrar os tipos de morte celular de

acordo com a caracterização morfológica, bioquímica, enzimática e segundo a via de sinalização molecular apresentada.

Considera-se que houve morte celular quando a célula perde a integridade de sua membrana plasmática, tem o seu núcleo fragmentado, numerosos autofagossomos em seu citosol, ou até mesmo tem seus restos fagocitados por células adjacentes. Cita-se, como exemplo, o desenvolvimento de metazoários e plantas, durante os quais há diversos relatos da ocorrência de MCP. A eliminação de células indesejáveis segue pelo menos um dos padrões de MCP, comandado pela expressão gênica de seus respectivos ativadores. Nos insetos, a principal ocorrência de MCP se dá durante o desenvolvimento pós-embrionário, durante as mudanças promovidas pela metamorfose nos holometábolos.

Logo, é importante compreender que embora haja diversas categorias de MCP, algumas são mais recorrentes do que outras e, portanto, melhor caracterizadas. Em muitas vezes, observa-se a ocorrência simultânea de dois ou mais tipos de MCP, bem como o intercruzamento de suas vias. A seguir, estão resumidos os principais eventos de MCP e suas particularidades.

. 1.3.1 Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular mediado por proteases chamadas caspases. As caspases são responsáveis por clivar estruturas celulares, culminando com o total desarranjo da célula e a endocitose de seus componentes por células vizinhas (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

Como bem nos assegura Elmore (2007), a apoptose é um componente de extrema importância para a homeostase celular e tecidual dentre os metazoários. Sua ocorrência também está associada ao desenvolvimento embrionário, envelhecimento celular e ao correto funcionamento do sistema imune.

As células apoptóticas apresentam uma série de sinais morfológicos que permitem classificá-las dentro dessa categoria de MCP. O núcleo da célula

apresenta condensação da cromatina (picnose) e fragmentação internucleossomal do DNA e da membrana nuclear (cariorrexe).

No entanto, a membrana plasmática é preservada e não se observa extravasamento de conteúdo celular. Ao invés disso, a célula sofre desagregação pela formação de projeções chamadas corpúsculos apoptóticos, que são fagocitadas por macrófagos e por células vizinhas, prevenindo-se a inflamação do tecido adjacente (DOONAN e COTTER, 2008).

Existem dois modos de ativação da apoptose, a forma dependente de caspases e a forma independente de caspases (HONGMEI, 2012). No primeiro tipo, as caspases são as enzimas efetoras da destruição da arquitetura celular. Distinguem-se duas vias dependentes de caspases, a via extrínseca e a via intrínseca (fig. 01).

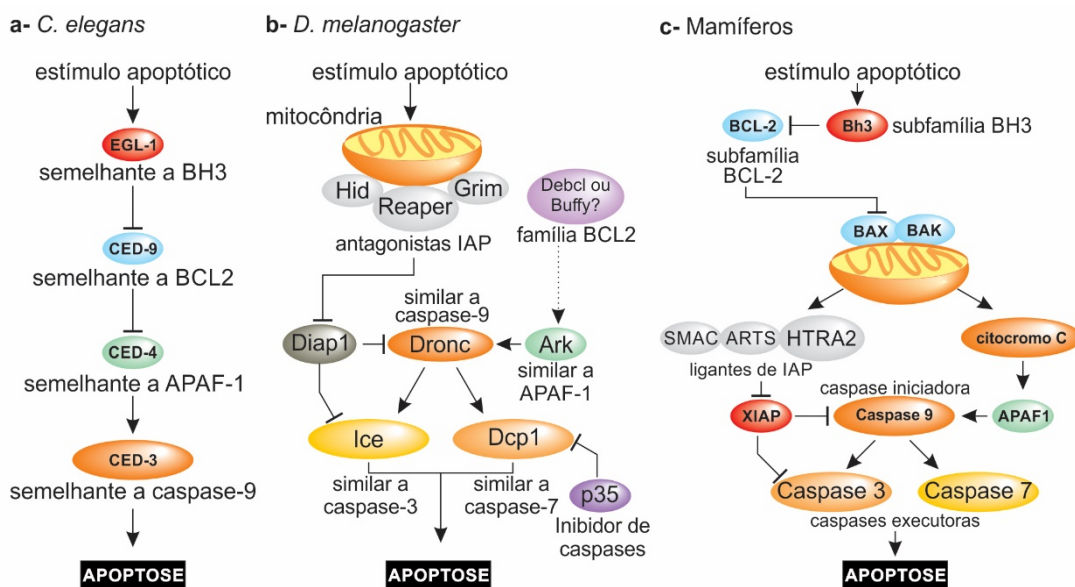


Figura 01: Modelos da via intrínseca da apoptose em três diferentes espécies. **A.** a via apoptótica em *C. elegans* envolve um conjunto menor de fatores, culminando com a ativação de CED-3, a caspase efetora da apoptose; **B.** em *D. melanogaster*, ocorre uma via mais complexa, sendo Ice e Dcp1 as caspases responsáveis pela morte da célula; **C.** a via intrínseca da apoptose em mamíferos é a mais estudada, envolvendo uma série de ativadores e repressores, além do intercruzamento com outras vias de MCP (Adaptado de Fuchs e Steller, 2015).

A distinção entre as duas vias se dá pelo tipo de ligante acionado e à participação de organelas, como a mitocôndria, no processo de desagregação celular. A forma independente de caspases ocorre pela liberação de espécies

reativas de oxigênio pelas mitocôndrias e o conseqüente dano ao material genético no núcleo, independentemente ao acionamento da cascata de sinalização das protoenzimas caspáticas.

1.3.2 Autofagia

Autofagia é um sistema de degradação intracelular regulado pela atividade dos lisossomos. Nesse caso, o material degradado pertence à própria célula, e os componentes da digestão podem ser reaproveitados para o metabolismo celular (MIZUSHIMA e KOMATSU, 2011). A autofagia é mediada pela ação de proteínas *atg*, responsáveis pela formação do autofagossomo e pelo recrutamento da porção citoplasmática a ser digerida (TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2005).

Para Bento et al. (2016) a autofagia facilita restaurar estruturas celulares, tais como organelas - mitocôndrias, retículo endoplasmático; consumir substâncias de reserva, disponibilizando os nutrientes armazenados para o metabolismo energético; extinguir a ação de compostos nocivos à célula, como as espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo.

Embora o processo molecular da autofagia ainda não esteja totalmente elucidado nos organismos pluricelulares, o estudo em levedura permitiu a compreensão das principais etapas da autofagia e o controle genético envolvido (LEVINE e YUAN, 2005). Inicialmente, um sinal para autofagia desencadeia a indução, ou seja, a formação da membrana de isolamento e a formação do fagóforo. Em levedura, a indução pode ser acionada através de duas vias diferentes, a primeira pelo complexo Atg1 + TOR e a segunda pela via Cvt, ao passo que nos demais eucariotos só se observou até agora a primeira via (KLIONSKY e EMR, 2000). Em seguida, ocorre a expansão do fagóforo através da fosforilação de Atg8 por Atg4. Na sequência, Atg7 e Atg3 promovem a incorporação do PE ao Atg8, ao mesmo passo em que forma-se um complexo multimérico Atg12-Atg5-Atg16, levando à formação de um fagóforo de dupla membrana, o vacúolo. Por fim, ocorre a fusão do vacúolo

com o sistema lisossomal e a degradação de seu conteúdo, conjunto o qual é chamado de vacúolo autofágico (fig.02).

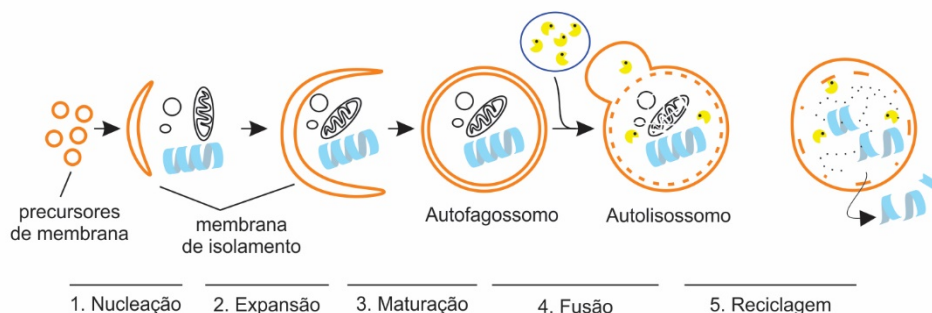


Figura 02: Etapas da macroautofagia em eucariotos. (1) Nucleação – recrutamento de precusores de membrana em torno do substrato alvo; (2) Expansão – formação da membrana de isolamento ao redor do substrato; (3) Maturação – isolamento completo do conteúdo citoplasmático a ser digerido pelo lisossomo; (4) Fusão – fusão do lisossomo ao autofagossomo, formando o autolisossomo; (5) Reciclagem – o produto formado pela digestão é disponibilizado ao metabolismo da célula. (Adaptado de Zaffagnini e Martens, 2016).

Em *Drosophila*, foram caracterizadas duas principais vias regulatórias da autofagia. A primeira delas é mediada pelo complexo TOR, assim como em levedura (fig.03). Enquanto o estado nutricional se mantiver adequado e não houver nenhum estímulo ambiental (ex. presença de rapamicina), esse complexo inibe a ação de Atg1, responsável pela iniciação da formação do fagóforo. Por outro lado, em episódios de baixa ingesta alimentar e/ou na presença de fatores ativadores, o complexo TOR se desfaz, iniciando-se então a cascata de autofagia. A segunda via é mediada por PI3K, que assim como TOR, também inibe a autofagia no corpo gorduroso durante a homeostase. Na ausência prolongada de ingestão alimentar e/ou devido a fatores do desenvolvimento (ex. secreção do hormônio ecdisona), PI3K é inibido, acionando da mesma forma a reação autofágica (GREWAL e SAUCEDO, 2004).

A princípio, a autofagia representa um mecanismo de sobrevivência da célula, digerindo e reaproveitando seus próprios componentes (SAIKUMAR e VENKATACHALAM, 2009), no entanto, sob determinadas circunstâncias, quando a degradação é intensa e a célula não consegue lidar com essa deterioração, diz-se que ela está submetida à morte celular autofágica (LEVINE

e YUAN, 2005). Nesse sentido, a morte celular autofágica provou ser crucial ao desenvolvimento de organismos como o *C. elegans*, a drosófila e o camundongo. Mutantes para genes Atg apresentaram alterações fenotípicas acentuadas e invariavelmente evoluíram para a letalidade (LEVINE e KLIONSKY, 2004). Nos insetos holometábolos, a autofagia no corpo gorduroso das fases larvais é essencial para o desenvolvimento subsequente e metamorfose (LINDMO et al., 2006).

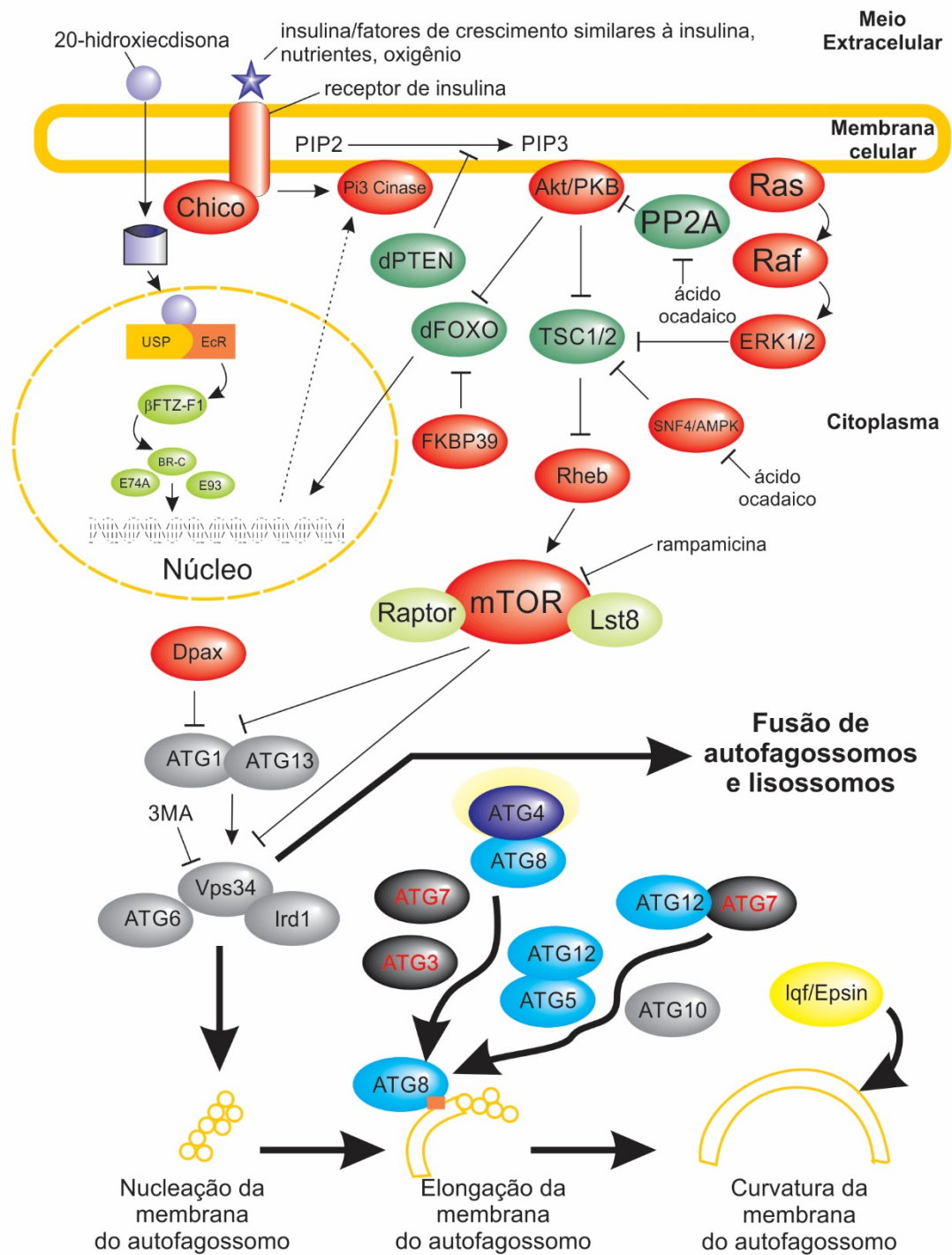


Figura 03: Papel do complexo mTOR e dos diversos fatores atg na formação da membrana do autofagossomo. Após clivado por atg4, o atg8 conjuga-se à PE na membrana do fagóforo, promovendo sua elongação e curvatura. (Adaptado de Malagoli et al., 2010).

1.3.3 Outros tipos de MCP

Há ainda outras categorias de MCP presentes na literatura. Algumas delas sinalizam o processo de morte celular por si, enquanto outras são estágios característicos de um processo maior (fig. 04).

1.3.3.1 Necrose e necroptose

Durante muito tempo, a necrose foi considerada na literatura como um tipo de morte celular acidental ou como um evento pós-morte (MAJNO e LORIS, 1995; VAN CRUCHTEN e VAN DEN BROECK, 2002; KANDUC et al., 2002). Morfológicamente, a necrose apresenta vacuolização e extravasamento do citoplasma, liberando fatores de inflamação ao tecido adjacente (EDINGER e THOMPSON, 2004; KRYSKO et al., 2008). O núcleo da célula também apresenta condensação da cromatina e fragmentação, assim como na apoptose, no entanto, não há ativação de caspases na morte celular por necrose (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Atualmente, sabe-se que a morte celular necrótica corresponde a um fenômeno altamente controlado, apresentando uma via de regulação, ao contrário do que se pensava ao se atribuir à necrose como um evento meramente acidental. Dessa forma, passou-se a chamar de necroptose a via controladora da morte celular necrótica (JOUAN-LANHOUE ET AL., 2014). Resumidamente, a ativação da via de necroptose envolve um ligante de morte ao receptor, uma infecção viral ou bacteriana, recrutando a quinase RIP1, que media a ativação de RIP3 e fosforilação de MLKL, desencadeando a resposta (ZHOU e YUAN, 2014; ALMAGRO e VUCIC, 2015).

A necroptose representa uma forma de proteção do organismo através da modulação da inflamação (KACZMAREK et al., 2013). Ao permitir a permeabilização da membrana e liberação do conteúdo citoplasmático, a necroptose pode acionar diversas cadeias de ativação imunológica, implicando na caracterização patofisiológica do(s) tecido(s) afetado(s) (KACZMAREK et al., 2013; VANDENABEELE et al., 2010).

1.3.3.2 Oncose

Oncose é um estado que antecede a morte celular, geralmente por necrose (FINK e COOKSON, 2005). A oncose é caracterizada pelo inchaço de estruturas celulares, como retículo endoplasmático, mitocôndrias e o citosol como um todo, causado pela redução do fluxo intracelular de ATP e alterações no influxo de Ca^{2+} devido à exposição da célula a determinadas toxinas (FINK e COOKSON, 2005; KERN e KEHRER, 2002; TRUMP et al., 1997).

1.3.3.3 Piroptose

Assim como a apoptose, a piroptose também é um mecanismo de morte celular ativado por caspase. Nesse caso, o estímulo de morte celular é uma infecção microbiana, estimulando a formação de um complexo denominado inflamosomo, que por sua vez, ativa a caspase 1. A caspase 1 cliva então outras estruturas celulares, liberando citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, além de levar à formação de poros na membrana plasmática e ao extravasamento do conteúdo celular (BERGSBAKEN et al., 2009; LIU et al., 2016), liberando fatores inflamatórios a outras células, diferentemente da apoptose. Além de sua importância no sistema de defesa imune, a piroptose parece estar relacionada com uma série de efeitos fisiológicos ainda não compreendidos completamente (FINK e COOKSON, 2005).

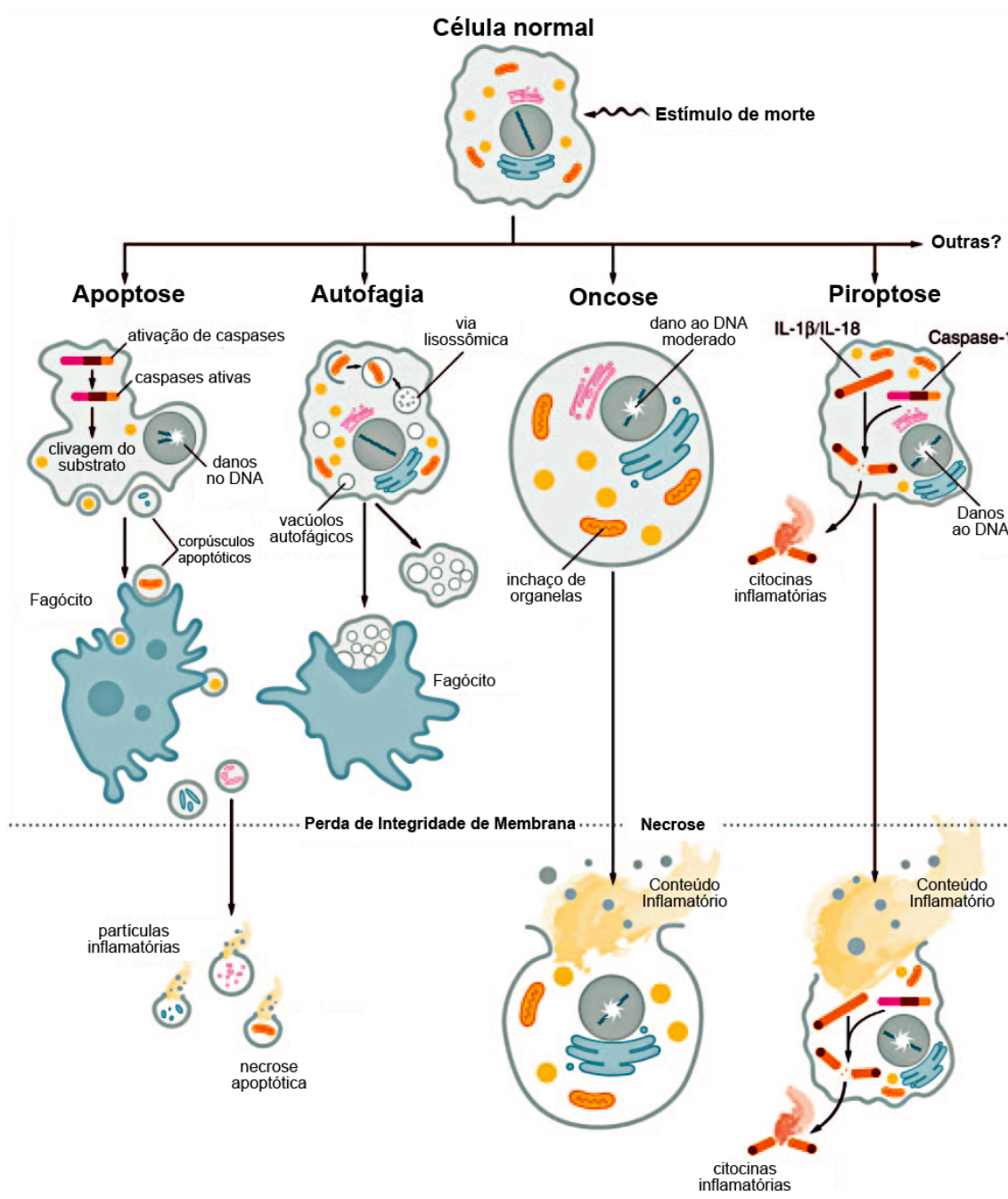


Figura 04: Principais vias de morte celular programada. A distinção entre as diversas modalidades de MCP se dá pelo caráter bioquímico e de expressão, embora o caráter morfológico continue como um critério de diferenciação e classificação entre elas. Nota-se que a apoptose, autofagia, oncose e fase inicial da piroptose caracterizam células em processo de morte, enquanto que a necrose e a fase final da piroptose ocorrem em células no pós-morte (Adaptado de Fink e Cookson, 2005).

É sabido que a ocorrência de MCP é primordial para a metamorfose de insetos holometábolos (FACEY e LOCKSHIN, 2010; MALAGOLI et al., 2010), no entanto, o mecanismo completo de sua ativação e suas vias de preferência ainda não se encontram totalmente esclarecidos e mostram diferenças entre as espécies. Nesse panorama, o uso de *Atta sexdens rubropilosa* como organismo modelo para o estudo da MCP em seu corpo gorduroso mostra-se promissor, visto que é um inseto holometábolo de relativamente fácil obtenção e manutenção nas condições laboratoriais. Além disso, como todas as formigas cortadeiras, no Brasil, *A. sexdens rubropilosa* representa uma ameaça às lavouras, sendo que o estudo dessa espécie possui uma importância econômica (ROMA et al., 2006). Até o presente momento, não há nenhuma publicação retratando a ocorrência detalhada de MCP em *Atta* ou em qualquer outro gênero de formiga, de forma que esse trabalho se propõe a fornecer bases para pesquisas posteriores nesse campo de estudo.

Nosso grupo possui uma coleção de sequências obtida por RNA-Seq, contendo fragmentos consideráveis de genes envolvidos no controle de MCP. Estes dados possibilitam o início de estudos funcionais destes genes na MCP no modelo proposto. Uma sequência em específico despertou interesse à sua análise, o gene *ATG4b*, que em levedura e em células de mamíferos codifica a proteinase de cisteína atg4, que por sua vez, promove a quebra de atg8 para promover sua interação com fosfatidiletanolamina (PE), cujo complexo auxilia na formação da membrana do fagóforo ou do autofagossomo (MALAGOLI, 2010). Obtivemos fragmentos conhecidos adequados ao desenho de novos oligos e de alta homologia com os respectivos genes em outros organismos.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

- Caracterizar a morte celular programada na metamorfose de *Atta sexdens rubropilosa*, através do estudo morfológico e ultraestrutural durante sua ocorrência no corpo gorduroso da espécie durante os processos de muda e de metamorfose.
- Avaliar o papel funcional do gene específico para autofagia *Atg 4b* através da determinação de sua expressão gênica em diferentes fases do desenvolvimento.
- Gerar novos levantamentos, até então desconhecidos ou não publicados, a respeito do padrão da estrutura do corpo gorduroso de *A. sexdens rubropilosa* em diferentes estágios do seu desenvolvimento, constituindo novas referências para pesquisas envolvendo o mesmo grupo taxonômico ou de proximidade filogenética.

3 Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Dissecção do corpo gorduroso

Larvas, pupas e adultos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) obtidos em ninhos artificiais de aproximadamente 2 anos foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Eugenia de Carvalho Campos – Instituto Biológico – SP; pelo Dr. André Frazão Helene – Instituto de Biociências – USP; e pelo Dr. Odair Correa Bueno – Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), UNESP Rio Claro. Os espécimes foram dessensibilizados em gelo e dissecados em PBS, pH 7,2, em estereomicroscópio *Olympus SZX16*. O corpo gorduroso coletado foi processado a fresco ou fixado de acordo com o procedimento adotado. O número de indivíduos utilizados em cada procedimento, bem como a sua caracterização, está descrito na tabela 01.

Tabela 01: Caracterização dos espécimes de *A. sexdens rubropilosa* utilizados em cada ensaio.

Estágio	Tamanho do corpo (em cm)	Nº de indivíduos (n)
Larva	0,2 ± 0,1	10
Pupa	0,4 ± 0,1	10
Operária	1,8 ± 0,1	20
Lixeira	1,6 ± 0,1	20

3.2 Microscopia de luz

3.2.1. Análise histoquímica

O corpo gorduroso dos estágios imaturos e de operárias foram fixados em paraformaldeído 4%, durante 12h e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura. As lâminas foram montadas e

coradas de acordo com técnicas específicas para cada análise: *hematoxilina-eosina* (HE) para marcação de núcleo e citoplasma; *ácido periódico Schiff* (PAS) para glicoconjugados e membrana basal; *alcian blue* para polissacarídeos ácidos, *azul de bromofenol* para proteínas totais (dados não mostrados); e *tricolor de Mallory*, no tecido de operárias adultas.

3.2.2 Microscopia confocal de varredura a laser

O citoesqueleto de actina foi visualizado por meio de coloração com FITC-faloidina (Sigma) por 1 h, após o corpo gorduroso ser tratado com RNAase (Sigma-Aldrich) por 20 min, e os núcleos foram contra-corados com iodeto de propídio.

Amostras de tecido foram incubadas em diluição de MDC (Sigma-Aldrich) 1:10, durante 30 minutos. Depois lavou-se três vezes em PBS e fixou-se em paraformaldeído a 4% durante 20 minutos. As imagens confocais de varredura a laser foram adquiridas em microscópio LSM 510 (Zeiss) utilizando os lasers verde Argon (458, 488 e 514 nm), Helio-Neon 1 (543 nm) e Helio-Neon 2 (633 nm). As fatias ópticas foram obtidas em intervalos adequados ao longo do eixo Z (entre 0,5 e 1 μm de largura).

3.2.3 Vermelho do Nilo (Nile Red)

Amostras de corpo gorduroso das três idades foram dissecado em PBS e incubados em solução de vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL em metanol, diluída em 100x em PBS, durante 20 minutos, para a detecção de lipídios. Os núcleos foram contra-corados por marcador de DNA Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich).

3.2.4 *Monodansylcadaverina (MDC)*

Amostras de tecido foram incubadas em MDC (Sigma-Aldrich), diluição 1:10, durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se a lavagem em PBS – 3x e fixação em paraformaldeído 4%, durante 20 minutos, com posterior lavagem em PBS – 3x. As lâminas foram montadas em Vectashield e armazenadas ao abrigo da luz. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (ZEISS AIO-X), sob filtro FITC (verde).

3.2.5 *Imunomarcação anti-LC3 e anti-Lamp1*

Os tecidos fixados foram tratados com 1% de Triton X-100 em PBS durante 10 min, bloqueados com PBS contendo 1% de albumina bovina durante 1 h e lavados com PBS. Posteriormente, foram incubados com um anticorpo primário específico de LC3 gerado em coelho (anti-LC3, Abcam) 1: 500 diluído durante a noite e anticorpo primário anti-Lamp-1 de coelho (Cell Signaling). Após três lavagens com PBS, foram incubados durante 2 h com um anticorpo IgG secundário anti-coelho marcado com Alexa 568 (Sigma-Aldrich), diluído 1: 200 em PBS. As lâminas foram protegidas da luz e montadas em Vectashield. Os núcleos foram contrastados com DAPI. Em lâminas de controle positivo, os mesmos tipos de células foram dissecados em PBS e incubados em uma solução composta por PBS + cloridrato de metformina (Merck) 0,1M durante 20 min antes da fixação. Nas lâminas de controle negativo, o anticorpo primário foi omitido.

3.2.6 *Marcação em laranja de acridina*

O corpo gorduroso foi extraído de cada grupo dos três estágios em PBS pH 7,2 e corado em 50 mM de solução de laranja de acridina (Sigma-Aldrich) durante 3 minutos. As lâminas foram então montadas e analisadas imediatamente sob o microscópio de fluorescência (Zeiss AIO-X) sob os filtros FITC (verde) e Rodamina (vermelho).

3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

O corpo gorduroso de larvas, pupas, operárias e lixeiras fixados com glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M (pH 7.2) durante duas horas a temperatura ambiente. O material foi lavado com o tampão cacodilato de sódio 0.1 M (pH 7.2) por 5 minutos, procedimento repetido três vezes e em seguida lavado com água destilada. O material foi pós-fixado com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2 durante 1 hora e em seguida lavado novamente com água destilada, repetido o procedimento três vezes. Logo após, incubou-se o material uranila alcoólica, por 12 horas. Na sequência foram feitas lavagens com etanol em uma série de concentrações crescentes até 100%, começando com o etanol 70%.

Os materiais foram colocados em uma mistura de resina acrílica Spurr e óxido de propileno numa proporção de 1:1, durante 5 horas. Após esse período para retirar o excesso de óxido de propileno, retira-se a mistura e adiciona-se resina Spurr por mais 5 horas. Os materiais embebidos em resina serão posicionados corretamente em formas devidamente identificadas com uma etiqueta. A forma será mantida em uma temperatura de 70°C durante o período de 72 horas.

A inclusão foi feita em resina (Leica). Inicialmente, os materiais foram lavados em água destilada, durante 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a sequência de desidratação, com banhos em etanol 70%, 2x; etanol 95%, 2x; etanol 100%, 2x. A solução de infiltração (resina + ativador) foi diluída em etanol 100%, na qual o material foi imerso durante 2 horas. A seguir, o material foi imerso em resina, overnight. Por fim, cada material foi posicionado em forma e submerso em solução de infiltração, adicionada ao endurecedor, para a formação dos blocos. Cada bloco foi submetido a cortes de 2µm de espessura. As amostras foram então posicionadas em grades metálicas de níquel e de ouro e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) TECNAI G2 e JEOL 1010.

3.4. Análise de fragmentação do DNA

O DNA total foi extraído do corpo gorduroso dos estágios de larva (n = 20), pupa (n = 20) e operária (n = 40). Os tecidos foram tratados com solução de digestão (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8) e homogenizados. Após a mistura com SDS a 1%, a solução foi incubada a 65 ° C por 1 h na presença de proteinase K (10 µg / mL), seguida de extração orgânica com fenol e fenol-clorofórmio (1: 1 vol / vol). O DNA foi precipitado com acetato de Na 0,3 M pH 5,2 e etanol absoluto 2,5 vol, lavado com etanol a 70%, seco e dissolvido em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 e EDTA 1 mM). O DNA foi tratado com RNase 10 mg / ml (Sigma-Aldrich, EUA) a 37 ° C durante 30 min. 5 µg de cada amostra foram corados com Sybr Green I (1: 1000) e separados em gel de agarose a 2% sob 60 mA durante 2 horas.

3.5 Produção de cDNAs e perfis de expressão

A sequência similar a Atg4B foi obtida em um experimento de sequenciamento de transcriptoma em larga escala (NGS – next generation sequencing) a partir de larvas e pupas inteiras, impossibilitando a identificação do tecido de origem, mas maximizando as sequências identificadas.

O RNA total de larvas, pupas, operárias e operárias lixeiras de *A. sexdens rubropilosa* foi extraído utilizando-se Trizol (Thermo) de acordo com o protocolo recomendado. Alíquotas de RNA total foram utilizadas para determinação de perfis de expressão destes genes por qRT-PCR, utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir das sequências já conhecidas, presentes em nosso banco de dados.

Reações de transcrição reversa foram realizadas com transcriptase reversa Improm (Promega, EUA) foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA), conforme descrito abaixo.

Tabela 02: Parâmetros utilizados nas reações de RT-PCR

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	1	75	5'
Transcrição Reversa	1	50	60'
Inativação da enzima	1	75	15'

O cDNA produzido foi utilizado em reações de qPCR em um termociclador *RotorGene 6000 Cycler* (Corbett Life Science, Austrália) para um volume final de 25 µL. O cDNA foi amplificado sob as seguintes condições:

Tabela 03: Condições de ciclagem da RT-PCR em tempo real:

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	1	95	10'
Amplificação	40	95	20''
		53	20''
		72	20''
Curva de Melting	1	49-59	-

Os primers utilizados para a amplificação em tempo real estão listados na tabela 04. A normalização foi realizada em relação ao RNA total (Bustin, 2000; 2002). Isso foi feito devido ao fato de que genes de referência, como GAPDH, actina ou tubulina, não possuem sequências conhecidas em *A. sexdens rubropilosa*, além de estes genes tidos como *housekeeping* poderem variar expressivamente durante o desenvolvimento larval, como avaliado em Sindelka *et al.*(2006).

Tabela 04 – Primers usados no protocolo de qRT-PCR

Primer	Sequência	Tm (°C)
qATG4B-L	5'- AGGCTGTGTGGGAGATGAAG -3'	56.9
qATG4B-R	5'- AAGTGCCACAGAAGGATCCA -3'	55.6

3.5.1 Análise in silico de *Atg4b*

A história evolutiva da sequência similar a *Atg4b* foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de *Tamura-Nei*. A(s) árvore(s) inicial(is) da busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos de *Neighbor-Join* e *BioNJ* em uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem MVI (*Maximum Composite Likelihood*) e selecionando-se a topologia com valor de *log likelihood* superior. As posições de códon incluídas foram 1º + 2º + 3º + não-codificante. Esta análise envolveu 29 sequências nucleotídicas (tabela 05), coletadas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Análises evolutivas foram realizadas com o auxílio do software MEGA X.

Tabela 05: Números de acesso das sequências utilizadas para a filogenia

Número de acesso	Espécie
XM_012205178	<i>Atta cephalotes</i>
XR_001931989	<i>Atta colombica</i>
XR_847177	<i>Acromyrmex echinator</i>
XM_018512046	<i>Trachymyrmex cornetzi</i>
XM_018496510	<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>
XM_018450568	<i>Trachymyrmex zeteki</i>
XM_018545034	<i>Cyphomyrmex costatus</i>
XM_011161841	<i>Solenopsis invicta</i>
XR_975100	<i>Wasmannia auropunctata</i>
XM_025023588	<i>Temnothorax curvispinosus</i>
XM_012360180	<i>Linepithema humile</i>
XM_012005301	<i>Vollenhovia emeryi</i>
XM_012679357	<i>Monomorium pharaonis</i>
XM_025306187	<i>Harpegnathos saltator</i>
XM_011352112	<i>Ooceraea biroi</i>
XM_025414552	<i>Camponotus floridanus</i>
XM_011637864	<i>Pogonomyrmex barbatus</i>
XM_015574827	<i>Dufourea novaeangliae</i>
XR_001375070	<i>Dinoponera quadriceps</i>
NM_001276646.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
XM_624574.6	<i>Apis mellifera</i>
XM_004929171.3	<i>Bombyx mori</i>
NM_001272923.2	<i>Drosophila melanogaster</i>
NM_001276646.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
NM_001129802.2	<i>Nasonia vitripennis</i>
XM_967830.4	<i>Tribolium castaneum</i>
XM_001658209.2	<i>Aedes aegypti</i>
XM_006616056.1	<i>Apis dorsata</i>
XM_003695419.2	<i>Apis florea</i>

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica

O corpo gorduroso em *A. sexdens rubropilosa* apresentou diferentes concentrações de macromoléculas estruturais e metabólicas entre as três idades analisadas. No tecido adulto, observa-se trofócitos e enócitos de constituição bem definida. Os trofócitos geralmente são uninucleados, com núcleo de formato irregular e fortemente corado. Os enócitos são células menores que os trofócitos, de núcleo arredondado e centralizado. Também apresentam vesículas em seu citoplasma, porém a natureza do material armazenado nem sempre obedece a mesma constituição molecular. Essas células também podem apresentar formato irregular, de acordo com a sua disposição em meio aos trofócitos.

Os tecidos pupais e larvais apresentaram maior concentração de vesículas proteicas e lipídicas. Contornos da membrana plasmática são bem discretos nessas células e não se observa uma clara delimitação entre uma célula e outra, como a presença da membrana basal, nos adultos. A coloração em PAS revelou a presença, embora discreta, de lâminas basais nos trofócitos dos indivíduos juvenis (fig. 08), constituídas por material glicoconjugado.

4.2 Análise ultraestrutural

4.2.1 Larva

As células do estágio larval de *A. sexdens rubropilosa* apresentou numerosas vesículas eletrondensas, em diferentes tamanhos e graus de

consumo (fig. 09). Algumas células mostraram núcleo irregular, com regiões eucromáticas e heterocromáticas (fig.09 B e E). Também é possível observar a presença de muitas células em processo de degradação, com numerosas vesículas em seu citoplasma (fig. 09 A, C e D; fig. 10 A – D). Não foi possível distinguir claramente estruturas citoplasmáticas intactas, como organelas e elementos do citoesqueleto.

4.2.2 Pupa

Assim como no tecido larval, o tecido pupal apresentou diversas vesículas eletrondensas. Porém, nota-se neste maior grau de consumo, apresentando uma menor quantidade de vesículas intactas (fig. 11). Também foi possível observar enócito (fig. 11 A) e núcleos de trofócitos com formato irregular (fig. 11 B). Além de células em processo autofágico (fig. 11 C, E, G, H; fig 12 A, B, C, D, F, H), algumas organelas foram observadas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (fig. 12 E, G), inclusive envoltas por fagóforo de vacúolo autofágico (fig. 12 E).

4.2.3 Imago

O corpo gorduroso de operárias de *A. sexdens rubropilosa* apresentou trofócitos de formato irregular e com lâmina basal claramente destacada (fig. 13). Essas células também apresentam um complexo vesicular na periferia das células, conhecido como sistema reticular da membrana plasmática. Algumas células mostraram regiões de invaginação entre o limite celular, circundadas pela lâmina basal (fig. 13 C; fig. 14 A e A'). Os enócitos apresentaram vesículas translúcidas e vacúolos autofágicos (fig. 14 B e B'). Embora o citoplasma das células adultas exiba um conteúdo mais homogêneo quando comparado aos estágios juvenis, do mesmo modo que as células de larva e de pupa, os trofócitos adultos apresentaram vacúolos autofágicos, porém em tamanho reduzido e em menor quantidade (fig. 15).

Quanto às operárias lixeiras, da mesma forma que nas demais operárias, seu corpo gorduroso apresentou trofócitos e enócitos bem delimitados e de formato irregular (fig. 16). Entretanto, uma diferença marcante observada foi a presença de numerosas vesículas translúcidas distribuídas por todo o citoplasma das células, sobretudo nos trofócitos (fig. 16 B – H). Núcleos esferoides e de tamanho reduzido foram observados em ambos os tipos celulares (fig. 16 A, B, C e E).

4.3 Microscopia de fluorescência

4.3.1 Citoesqueleto

A marcação imunofluorescente do corpo gorduroso de operárias revelou uma complexa trama do citoesqueleto dessas células. A marcação para microfilamentos mostrou sua distribuição principalmente nas regiões periféricas das células, ao passo que os filamentos de tubulina concentraram-se em uma camada mais intermediária (fig.17). Os núcleos, evidenciados por iodeto de propídeo, apresentaram-se fortemente corados. O tecido dos indivíduos adultos apresentou uma estrutura bastante coesa e estável, com o contorno celular bem delimitado (fig.17 A – F). Nos tecidos jovens, as células mostraram um menor grau de coesão e estabilidade. As marcações para microfilamentos e tubulina apresentaram estruturas com marcações mais difusas (fig.17 H e I).

4.3.2 Vermelho do Nilo

As marcações de vermelho do Nilo destacaram a forte presença de lipídios na estrutura das células do corpo gorduroso nas três idades analisadas. A marcação de Hoescht destacou a presença de núcleos centralizados nessas células. Nos trofócitos, as vesículas lipídicas distribuíram-se difusamente por todo o citoplasma, enquanto que nos enócitos, sua distribuição aparentemente é mais discreta e pontual. O tecido pupal apresentou pontos fortemente marcados, distintamente às fases anterior e posterior do seu desenvolvimento (fig.18 D – F).

4.3.3 Imunofluorescência

A monodansylcadaverina (MDC) é um composto autofluorescente, utilizado em amostras não fixadas, capaz de evidenciar vacúolos autofágicos (BIEDERBICK et al., 1995) Tal marcação mostrou-se positiva nos três estágios analisados (fig. 19), no entanto, nos estágios juvenis ela apresentou-se de maneira mais intensa.

De modo semelhante, observou-se marcação co-localizada de MDC e Lamp1 (fig. 20). Nas larvas e pupas, os autofagossomos parecem estar concentrados na região perinuclear, enquanto nos adultos, sua maior concentração atinge o citoplasma dos enócitos (fig. 20 G - I).

A marcação conjunta com MDC e LC3 também apresentou perfil de co-localização. No tecido juvenil, essa marcação distribuiu-se por todo o citoplasma das células, enquanto que no tecido adulto, evidenciou-se o citoplasma de alguns enócitos (fig. 21).

4.3.4 Laranja de acridina

A laranja de acridina é um corante celular fluorescente que se liga ao DNA, alterando sua emissão de fluorescência quando o material genético é degradado (LIU et al., 2014). Quando o DNA está intacto, a fluorescência emitida pela acridina está na faixa de 480 a 520 nm (verde), enquanto que na presença de DNA degradado, o comprimento de onda pode chegar a 650 nm (vermelho). Neste trabalho, a sobreposição dos canais verde e vermelho não apresentou emissão significativa para apoptose no corpo gorduroso em nenhuma das três fases analisadas (fig. 22). Uma coloração laranja discreta pode ser observada em trofócitos de larva e pupa (fig. 22 C e F, respectivamente), mas não em quantidade ou intensidade significativa. No

tecido adulto, alguns enócitos apresentaram coloração levemente alaranjada (fig. 22 I).

4.4 Eletroforese de DNA

Com o intuito de tentar detectar eventuais padrões de bandas resultantes de quebras internucleossomais, associados à eventos apoptose, foram realizados experimentos de extração e eletroforese de DNA genômico de *A. sexdens rubropilosa*. As extrações foram realizadas de forma cuidadosa para evitar fragmentação mecânica, com digestão com proteinase K, e os géis foram mais densos do que o usual e corados com Sybr Green I, para facilitar a observação de eventuais fragmentos pequenos.

Os resultados mostraram degradação do material genético nas células do corpo adiposo juvenil, sem padrões de *ladder*, e em adultos o DNA mostrou-se íntegro (fig. 23).

4.5. qRT-PCR

Atg4b-Like em *A. sexdens rubropilosa* é constituída por um fragmento de mRNA ou pré-mRNA, contendo regiões codificantes e não codificantes. Através da análise das comparações fornecidas pelo Blastx, estima-se que nosso fragmento codifique 90% da proteína, sendo os 10% restantes carboxiterminal (fig.05).

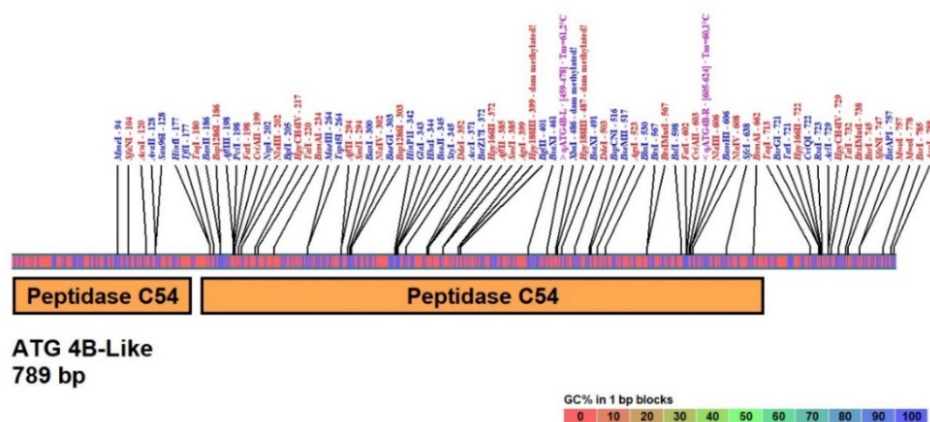


Figura 05: Sequência similar a Atg4b em *A. sexdens rubropilosa*. As regiões em púrpura correspondem às sequências dos oligos produzidos.

```

1  AGAAACAAAG AATAACACAT ATCTAAAAAT TTTAAGGCGT TTTGAGGATA
51  AAAGGGCTGC TGCTTTTTTCT ATCCATCAAA TCGCATTGAT GGGTGCATCT
101 GAAGGAAAGG AAGTTGGACA ATGGTTTGGT CCTAATACTA TTGCACAAGT
151 ATTAATAAAG TGTAATTATA TATGATGAAT CGAGCCCCCTC TCACTATACA
201 TGTTGCATTA GATAATACGT TAATAGTTAA TGATATTTTG AGACAATGTA
251 GAGTAGAAGG TGGTGTGACA GCAGAAGCAG ATGGAGAAAT TCCTTAAGG
301 GCACCTAGCC AATGGAAACC TTTGTTATTA TTAATCCCCC TGCGCCTTGG
351 ACTTAGCGAA ATTAATCCTG TATACATTAA TGGACTTAAG ACATCATTTA
401 AGATCTCACA ATCTCTTGGG GTAATTGGAG GGAAACCAAA TCTTGCTCTG
451 TATTTTATAG GCTGTGTGGG AGATGAAGTG ATCTATCTAG ATCCTCATA
501 CACTCAGAAA TCAGGTAGTA TTGAAGACAA GATAAGCGAA GAAGAAATTG
551 AGATGGATAT TTCATATCAC TGCAAATCAG CTAGTCGTAT TCCTATTACG
601 GGCATGGATC CTTCTGTGGC ACTTTGCTTC TTCTGTGCTA CAGAAAAGGA
651 ATTTAAGTCT CTATGTAAAT CAATGCAAGA GGAATTAATT TTGCCGAAA
701 AACAGCCATT GTTCGAGCTG TGTACAGAAC GTTTGGCACA CTGGTCATCA
751 GCAGATGATG CTGTTTCTGA AGCAGTAGCA GCTTCCAGT

```

Figura 06: Sequência similar a Atg4B de *Atta*. Em azul, a sequência dos oligos estão em destaque.

1 AGAAACAAAG AATAACACAT ATCTAAAAAT TTTAAGGCGT TTTGAGGATA
 Frame 1
 E T K N N T Y L K I L R R F E D K Frame 2
 Frame 3

51 AAAGGGCTGC TGCTTTTTCT ATCCATCAAA TCGCATTGAT GGGTGCATCT
 Frame 1
 R A A A F S I H Q I A L M G A S Frame 2
 Frame 3

101 GAAGGAAAGG AAGTTGGACA ATGGTTTGGT CCTAATACTA TTGCACAAGT
 Frame 1
 E G K E V G Q W F G P N T I A Q V Frame 2
 Frame 3

151 ATTAATAAAG TGTAATTATA TATGATGAAT CGAGCCCCTC TCACTATACA
 A P L T I H Frame 1
 L K K Frame 2
 Frame 3

201 TGTTGCATTA GATAATACGT TAATAGTTAA TGATATTTTG AGACAATGTA
 V A L D N T L I V N D I L R Q C R Frame 1
 Frame 2
 Frame 3

251 GAGTAGAAGG TGGTGTGACA GCAGAAGCAG ATGGAGAAAT TCCCTTAAGG
 V E G G V T A E A D G E I P L R Frame 1

301 GCACCTAGCC AATGGAAACC TTTGTTATTA TTAATCCCCC TGCGCCTTGG
 A P S Q W K P L L L L I P L R L G Frame 1

351 ACTTAGCGAA ATTAATCCTG TATACATTAA TGGACTTAAG ACATCATTCA
 L S E I N P V Y I N G L K T S F K Frame 1

Figura 07: ORF de sequência similar a Atg4b em *Atta*.

A expressão relativa de *Atg4b* foi padronizada pela idade larval e mostrou-se detectável apenas em RNAs de larvas e pupas, sendo a expressão em pupas cerca de 2,3 vezes maior do que o observado em larvas. Não foi detectada a expressão nos tecidos de operárias adultas e lixeiras (fig. 24). A reação de PCR quantitativo apresentou curva de dissociação livre de fragmentos secundários, comprovando a especificidade da reação (fig. 25).

4.5.1 Análise evolutiva

A árvore representada possui topologia que apresentou os melhores parâmetros, segundo a metodologia descrita anteriormente. Houve um total de 4604 posições no conjunto de dados final. O resultado apresentado mostrou o agrupamento de taxa evolutivamente relacionados. Incluiu-se o verme *C.elegans* no conjunto de análises como parâmetro comparativo externo (fig. 26). De acordo com a árvore gerada, nota-se o agrupamento entre espécies de ordem e gênero em clados muito próximos, com exceção de *Trachymyrmex* (ramo superior), que aparece independentemente em três ramos distintos. Já as formigas do gênero *Atta* aparecem compartilhando o mesmo ancestral comum.

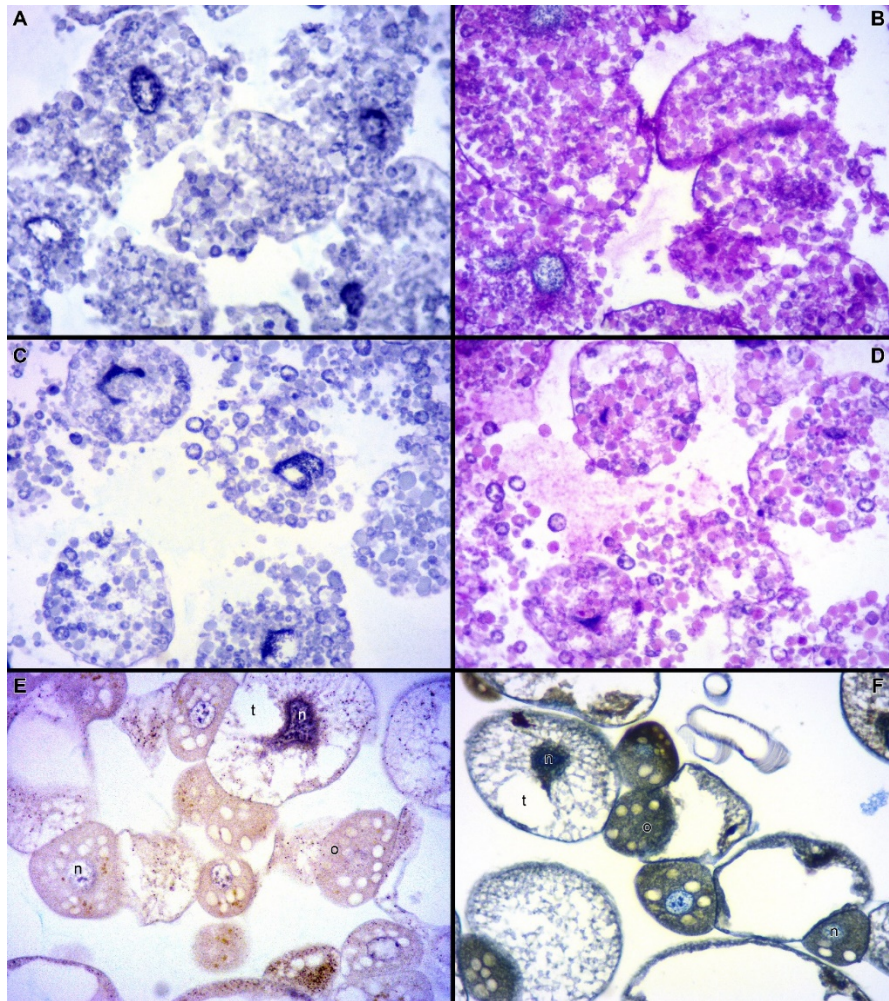


Figura 08: Histoquímica do corpo gorduroso das variedades juvenil e adulta de *A. sexdens rubropilosa*. **A e C** - trofócitos de larva e pupa, respectivamente, em alcian blue + hematoxilina; **B e D** - mesmos tipos de células em PAS + hematoxilina. Observe a aparência granular do citoplasma dos trofócitos devido a vesículas de armazenamento. **E e F** - corpo gorduroso de operárias adultas composto por trofócitos e enócitos. Observe a presença de vesículas lipídicas no citoplasma dos enócitos. E - alcian blue + hematoxylin; F- Mallory. **t** = trofócito; **o** = enócito; **n** = núcleo celular. 40x.

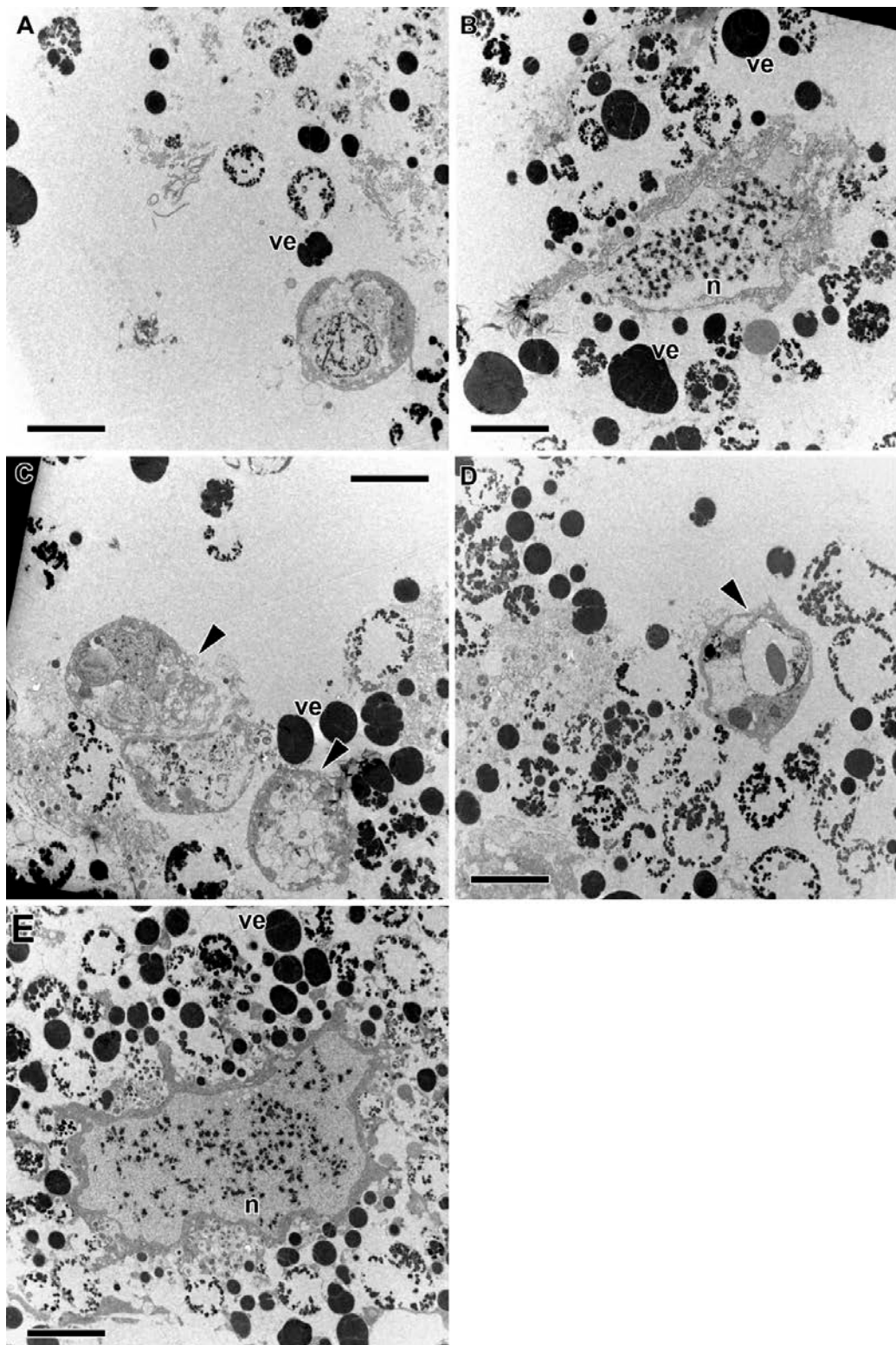


Figura 09: Micrografia de corpo gorduroso de larva de *A. sexdens rubropilosa*. Observar a presença de vesículas eletrondensas em diferentes graus de consumo. *n* – núcleo, *ve* – vesículas eletrondensas, **cabeça de seta** - célula em processo acentuado de autofagia. Barra: 10 μ m (médio aumento).

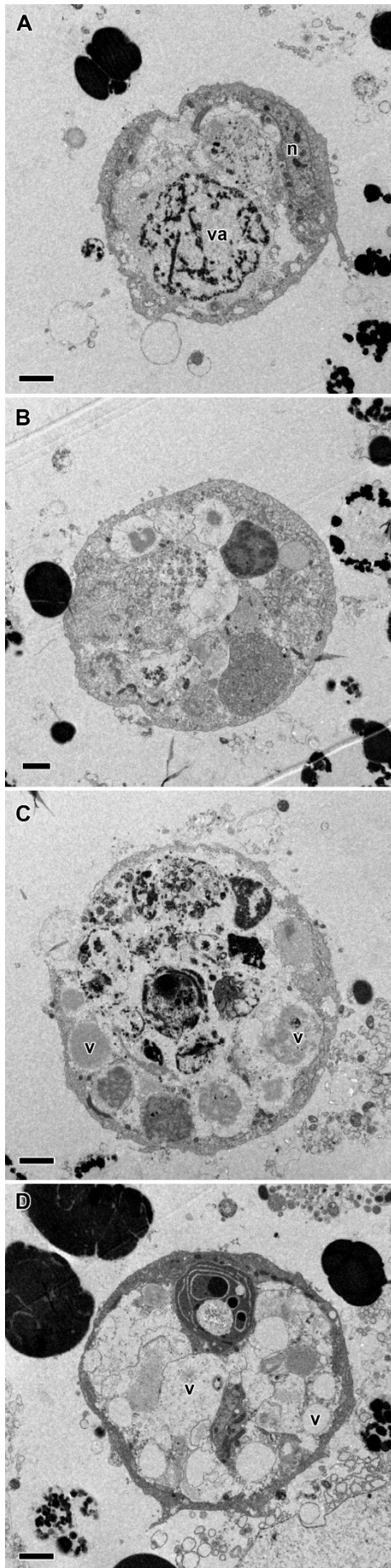


Figura 10: Micrografia de corpo gorduroso de larva de *A. sexdens rubropilosa* - detalhamento de células em processo de morte celular autofágica. Observar as numerosas vesículas e diferentes graus de consumo do conteúdo citoplasmático. *n* – núcleo, *v* – vesículas, *va* – vacúolo autofágico. Barra: 2 μ m (grande aumento).

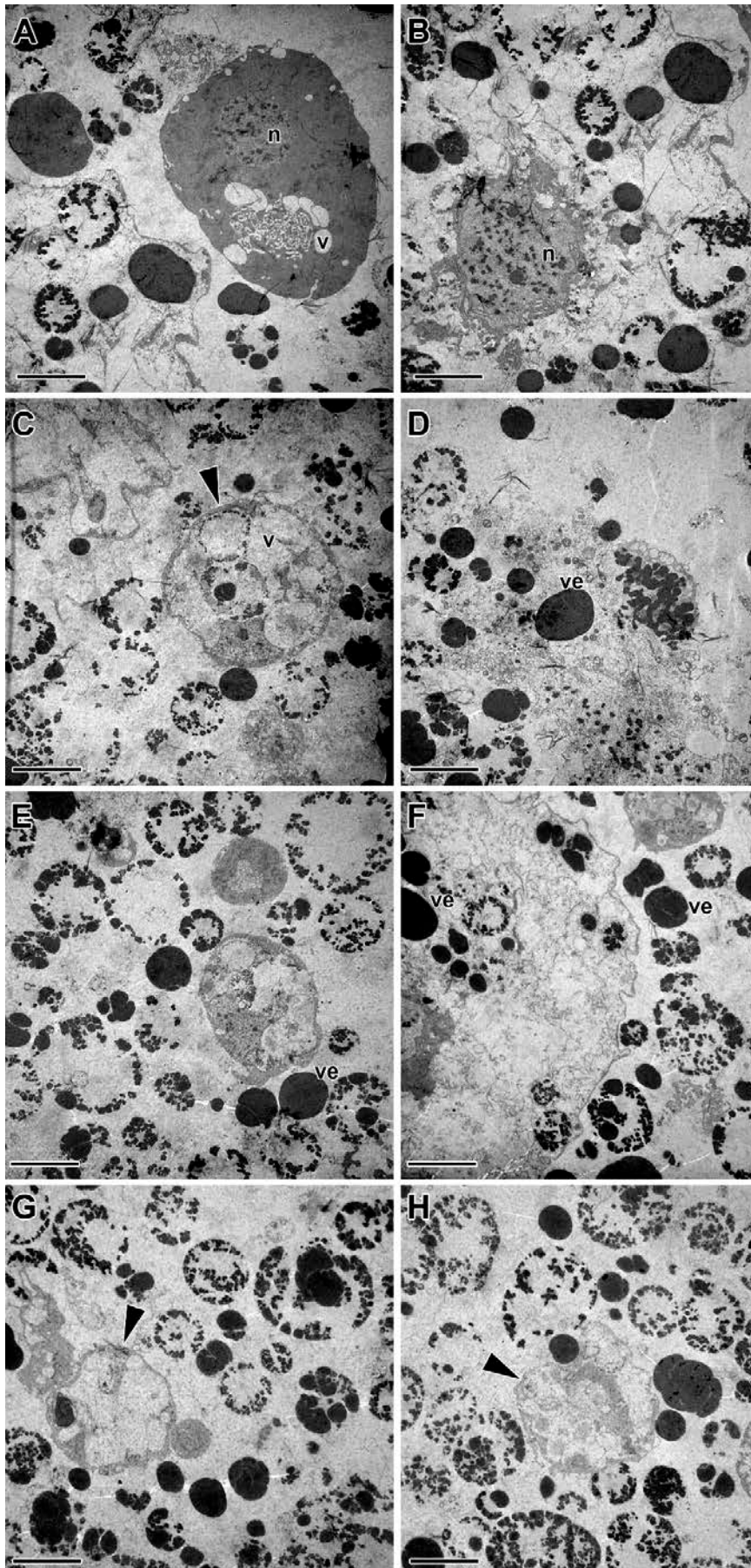


Figura 11: Micrografia de corpo gorduroso de larva de *A. sexdens rubropilosa*. Notar a presença de vesículas eletrondensas em diferentes estágios de desagregação. **n** – núcleo, **v** – vesícula, **ve** – vesícula eletrondensa, **cabeça de seta** – células em processo de degradação autofágica. Barra: 10µm.

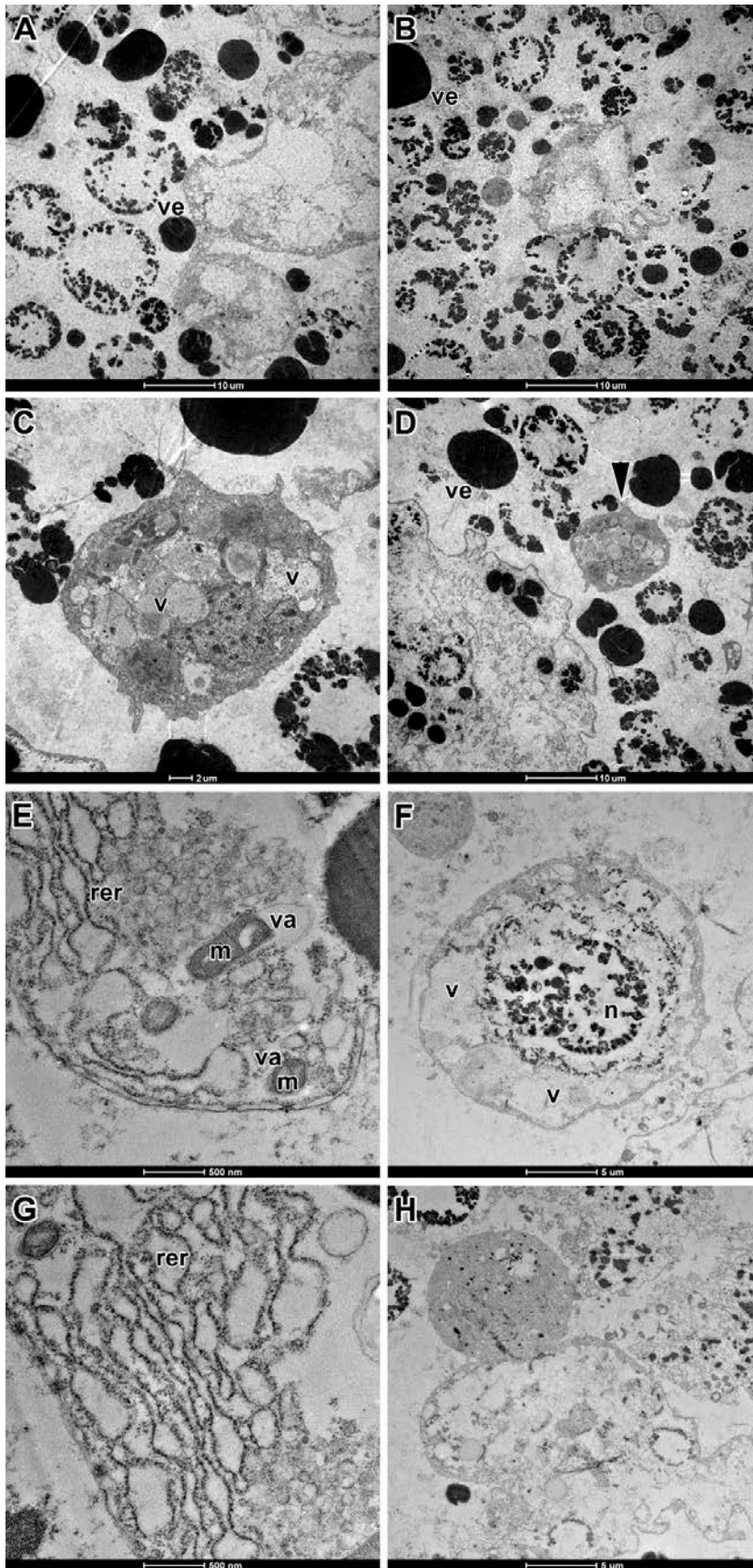


Figura 12: Micrografia de corpo gorduroso de pupa de *A. sexdens rubropilosa*. Observar a presença de vesículas em maior grau de consumo e a presença de células em morte celular autofágica. Também é possível detalhar algumas organelas em processo de autofagia (E). *m* – mitocôndria, *n* – núcleo, *rer* – retículo endoplasmático rugoso, *v* -vesículas, *va* – vacúolo autofágico, *ve* – vesícula autofágica. Barras: A, B – 10 μ m; C – 2 μ m; D – 10 μ m; E – 500nm; F – 5 μ m; G – 500nm; H – 5 μ m.

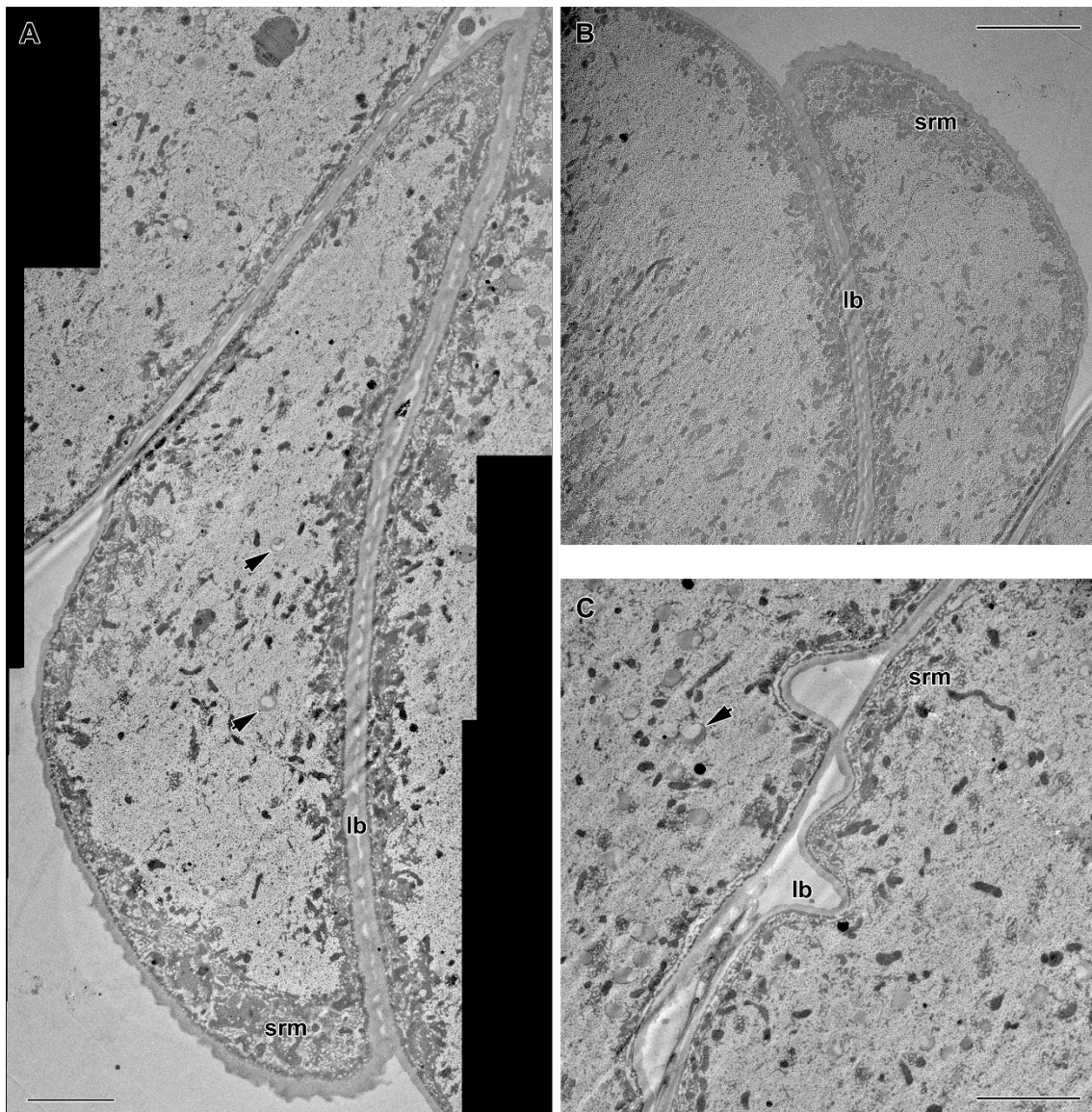


Figura 13: Micrografia de corpo gorduroso de operária adulta de *A. sexdens rubropilosa*. Trofócitos de formato irregular, com regiões de invaginação de membrana; **seta** – vacúolos autofágicos; **lb** – lâmina basal, **srm** – sistema reticular de membrana. Tamanho da barra: 50 μ m.

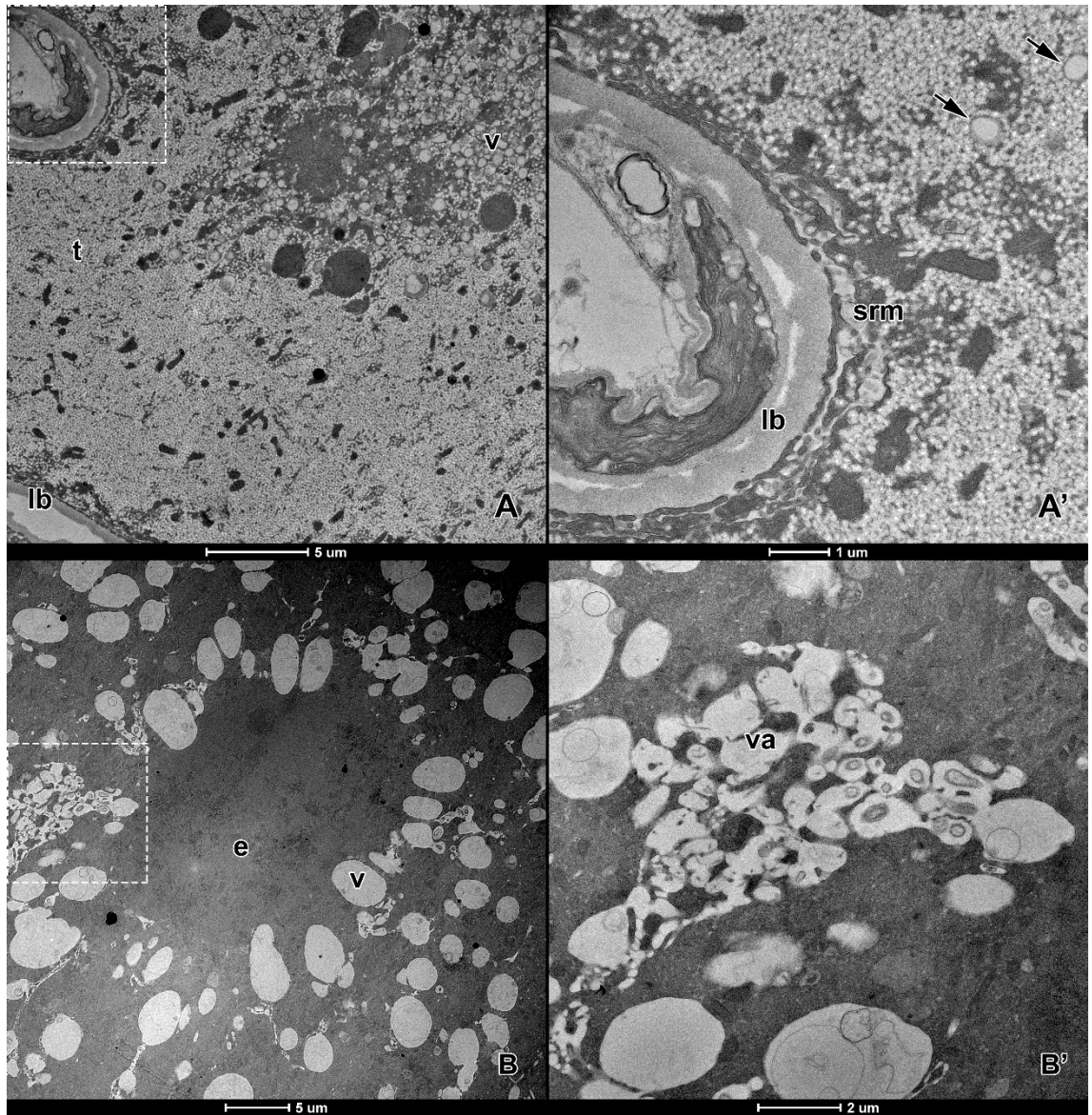


Figura 14: Micrografia de corpo gorduroso de operária adulta de *A. sexdens rubropilosa*. **A** – trofócito apresentando diversas vesículas; **A'** – detalhe da região de invaginação de membrana; **B** e **B'** – enócito apresentando diversas vesículas e detalhe de vacúolos autofágicos. **Seta** – vacúolos autofágicos; **e** – enócito, **lb** – lâmina basal, **srm** – sistema reticular de membrana, **t** – trofócito, **v** – vacúolo, **va** – vacúolo autofágico. Barras: 5, 1, 5 e 2 μm , respectivamente.

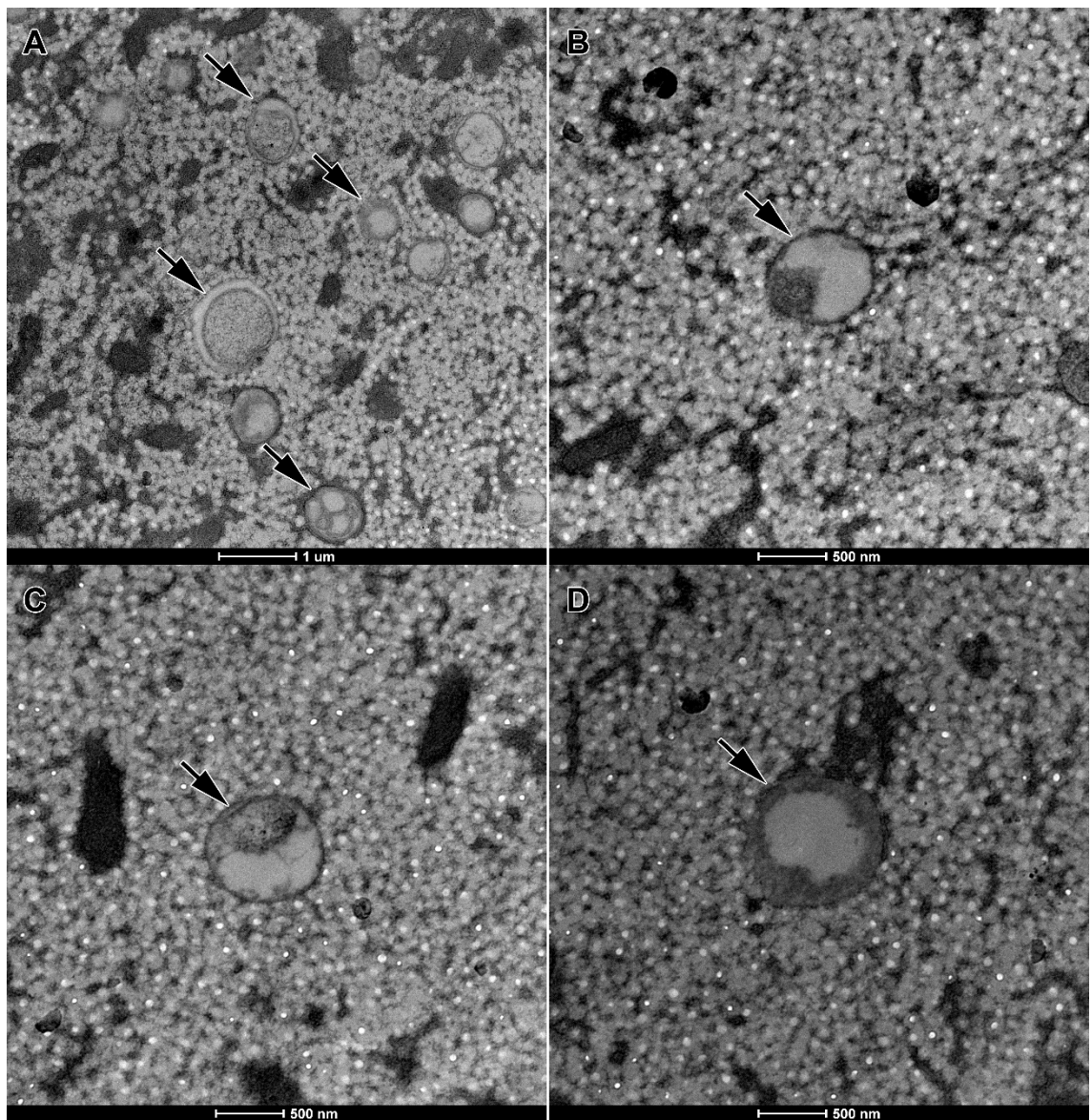


Figura 15: Micrografia de corpo gorduroso de operária adulta de *A. sexdens rubropilosa*. **A – D:** citoplasma de trofócitos apresentando vacúolos autofágicos (setas). Barras: A – 1 µm; B – D – 500 nm.

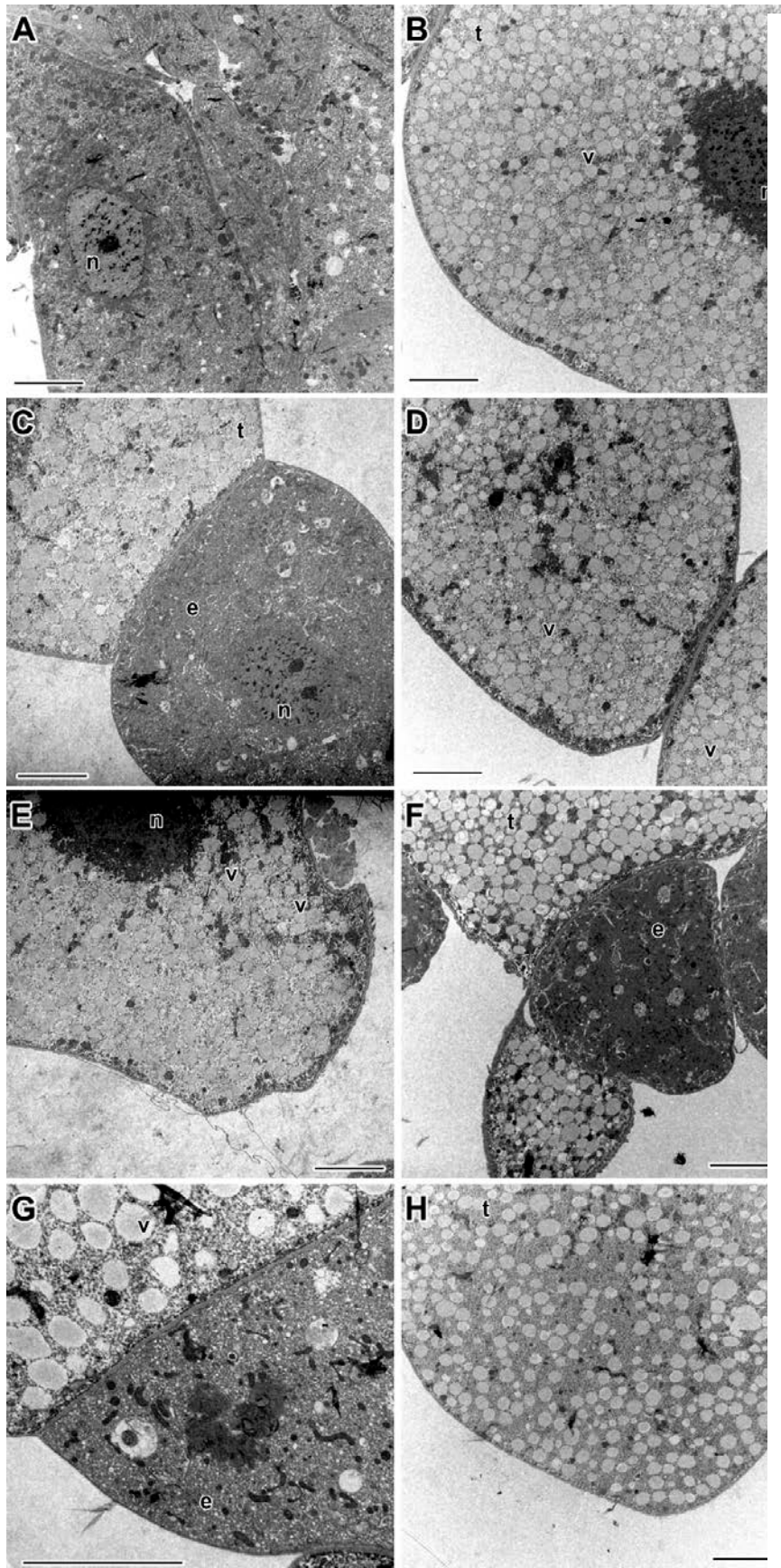


Figura 16: Micrografia de corpo gorduroso de operária lixeira adulta. Observar a presença de numerosas vesículas no citoplasma dos trofócitos. **e** – enócito, **n** – núcleo, **t** – trofócito, **v** – vesículas. Barras: 5 μm .

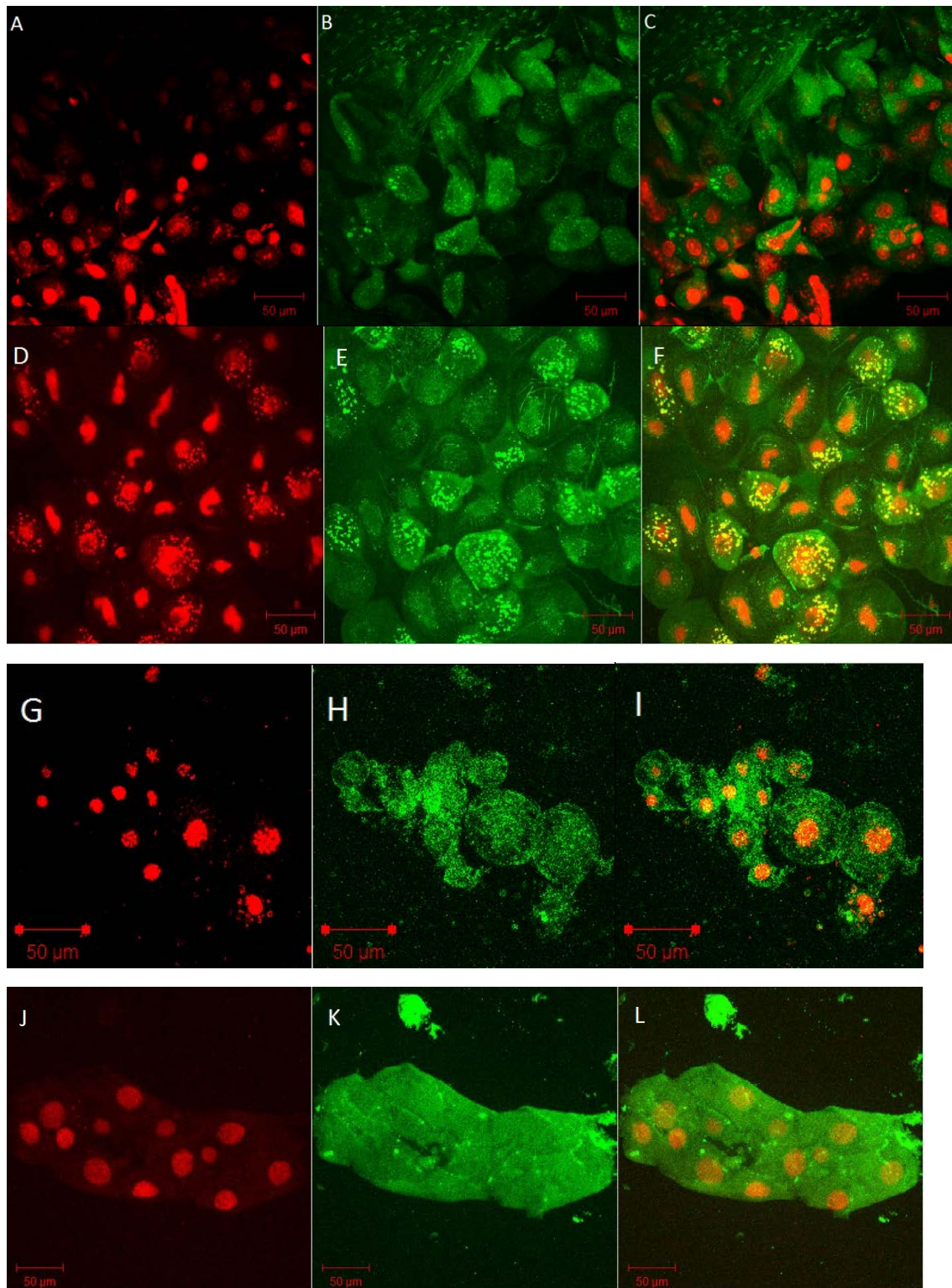


Figura 17: Microscopia Confocal de varredura a laser em corpo gorduroso de *A. sexdens rubropilosa*. Filamentos de actina, em verde, concentram-se na região cortical das células jovens. Operária: **A – C**: marcação de Faloidina – FITC – iodeto de propídeo; **D – F**: Tubulina – FITC – iodeto de propídeo. Larva: **G – I**: Faloidina – FITC – iodeto de propídeo; **J – L**: Tubulina – FITC – iodeto de propídeo.

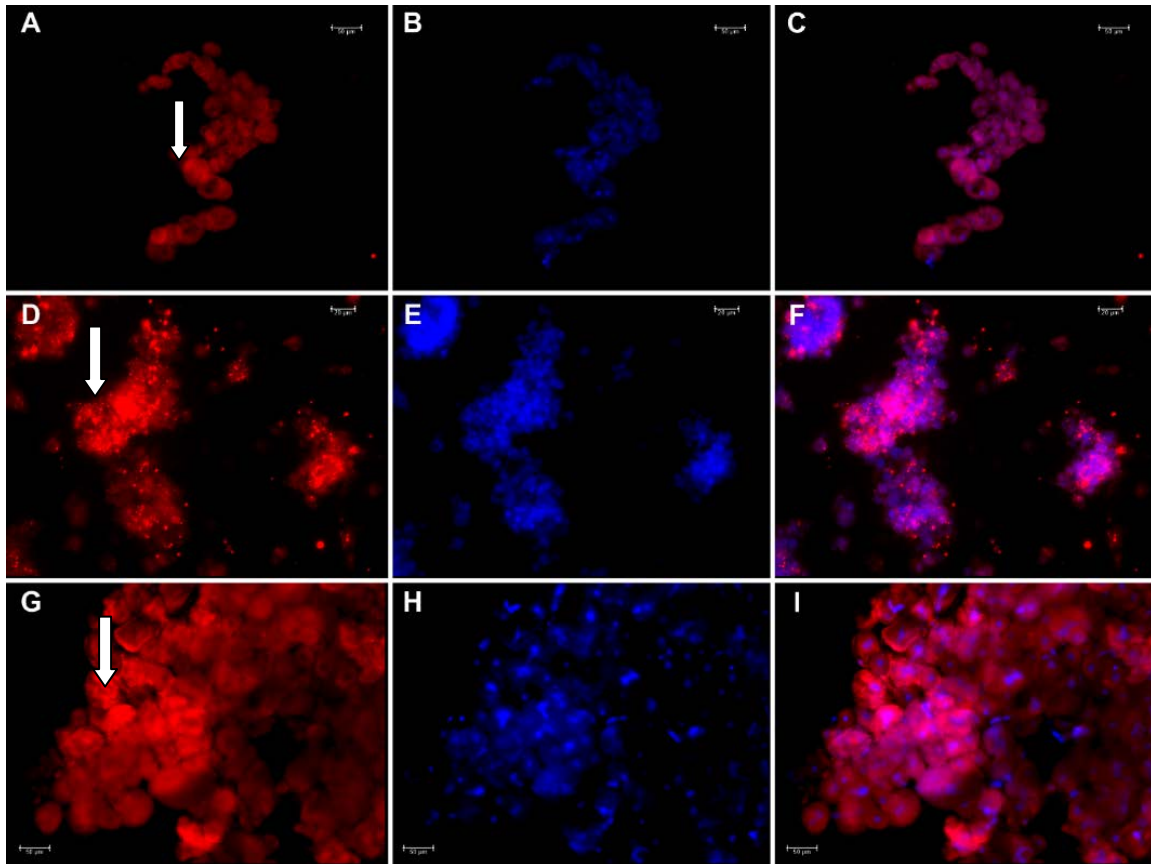


Figura 18: Marcação vermelho do Nilo (Nile Red) - Observe a disposição das gotículas lipídicas no corpo gorduroso nos três estágios de desenvolvimento (seta branca). A - C: Corpo gorduroso da larva, mostrando acúmulo de lipídios na periferia das células; D - F: Corpo gorduroso de pupa, onde se observa pontoações de vesículas lipídicas espalhadas pelo citoplasma; G - I: Corpo gorduroso de operárias adultas, apresentando concentração lipídica difusa em todo o citoplasma das células. Núcleos marcados em azul por Hoescht 33342. Comprimento da barra: 50 μm .

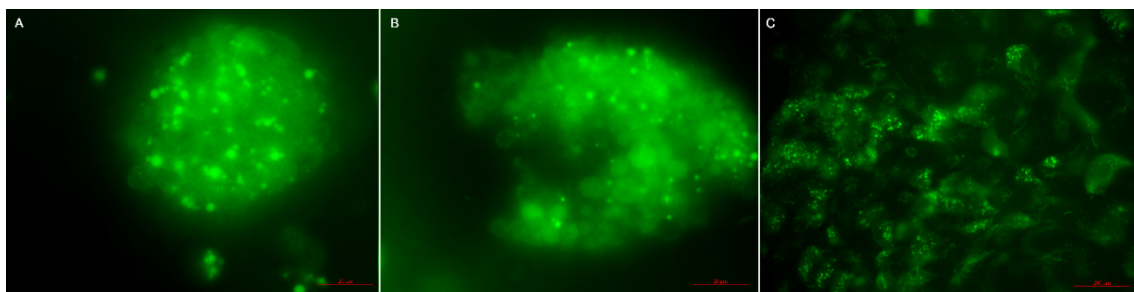


Figura 19: Amostra não fixada de corpo gorduroso de *A. sexdens rubropilosa* marcadas em MDC. As pontoações indicam marcação positiva para vacúolos autofluorescentes. A – larva, B – pupa, C – adulto. Barras: 20 μm .

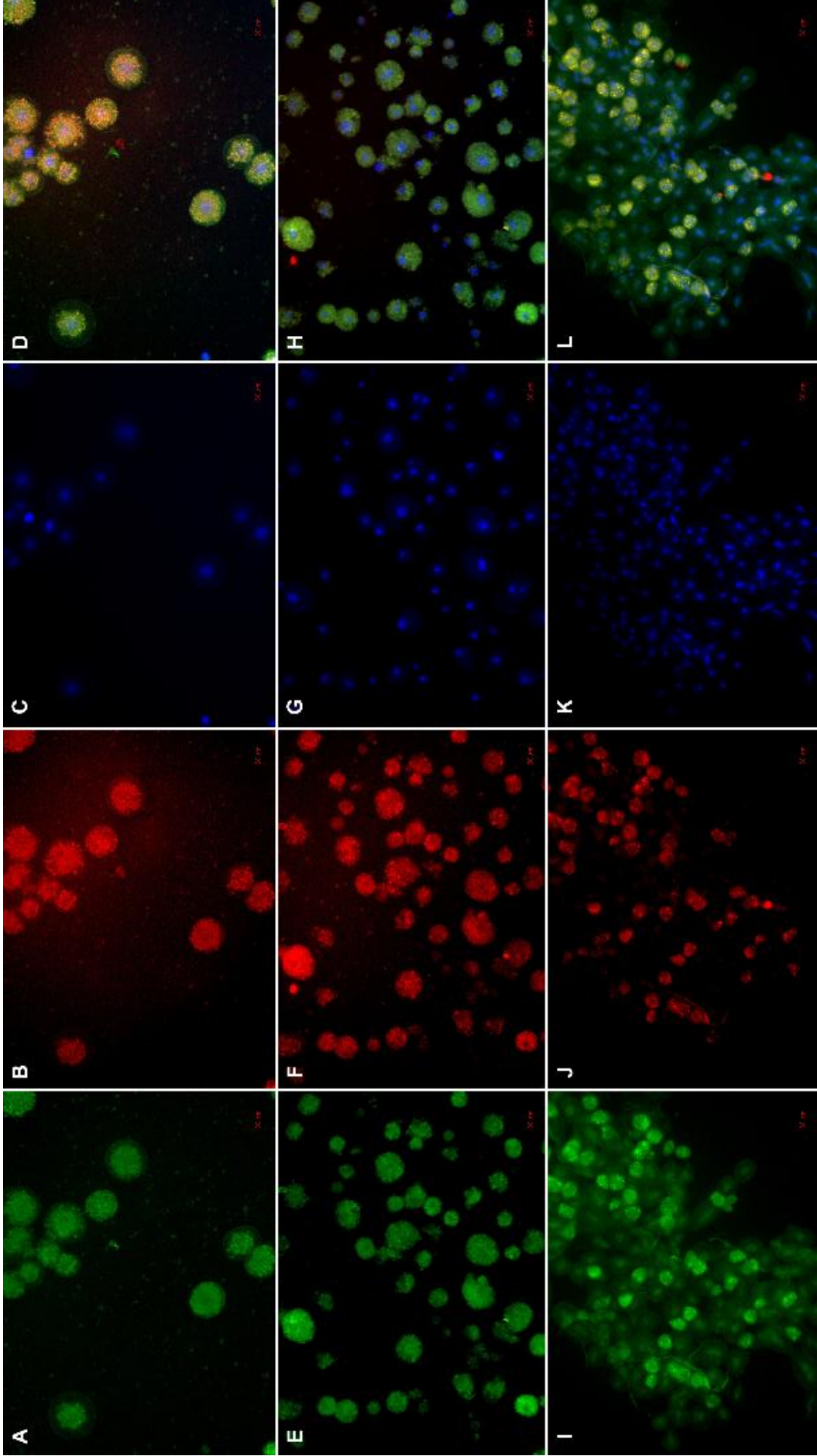


Figura 20: Imunomarcção MDC / Lamp-1. **A - D:** larva; **E - H:** pupa; **I - L:** imago. Primeira coluna - canal FITC (MDC); segunda coluna - canal Rhodamine (Alexa 568 / anti-lamp1); terceira coluna - DAPI; quarta coluna: sobreposição de canais. Barras = 50 μ m.

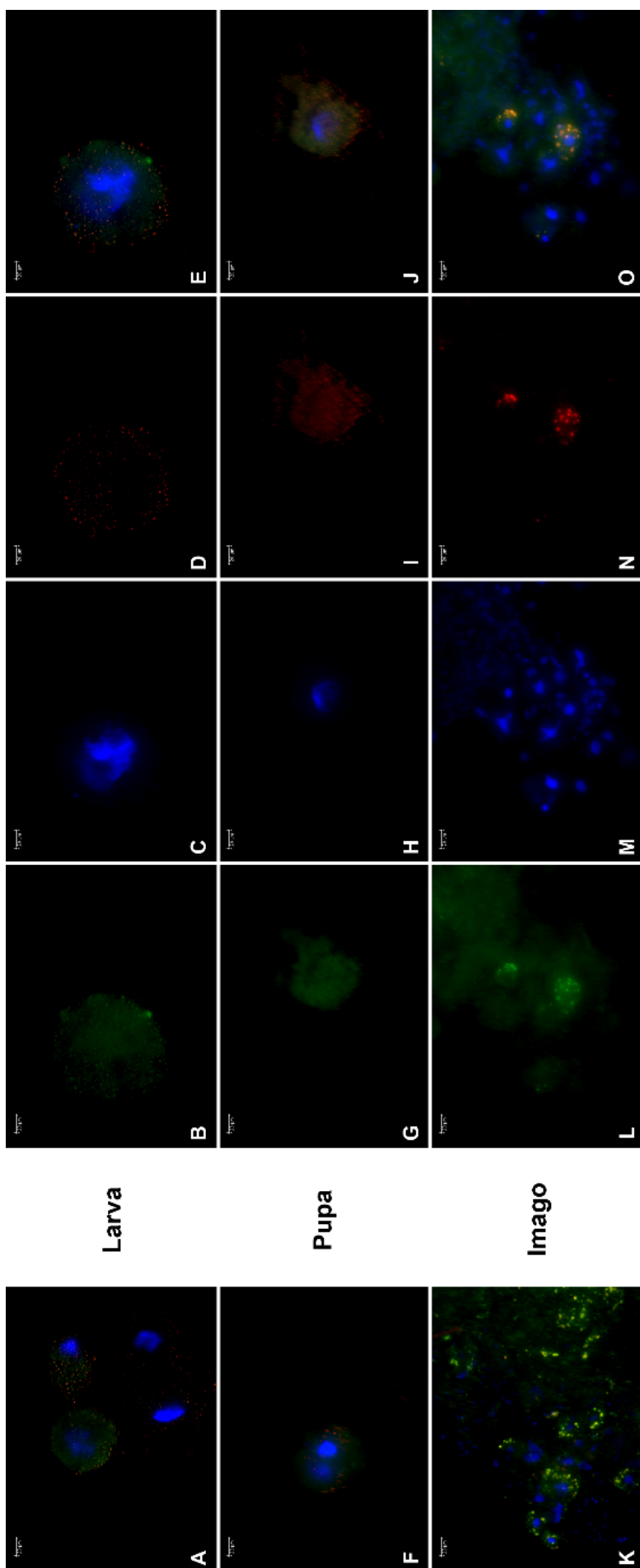


Figura 21: Imunomarcaco com MDC (em verde) e anti LC3 (em vermelho). Os tecidos juvenis apresentaram pontaces dispersas por todo o citoplasma das clulas (A, D, E; F, I, J), ao passo que o tecido adulto apresentou marcao mais localizada (K, N, O). Primeira coluna e quinta coluna – sobreposio de canais; segunda coluna :- canal FITC (MDC); terceira coluna :- canal Rhodamine (Alexa 568 / anti-LC3). Barras de escala = 50 µm.

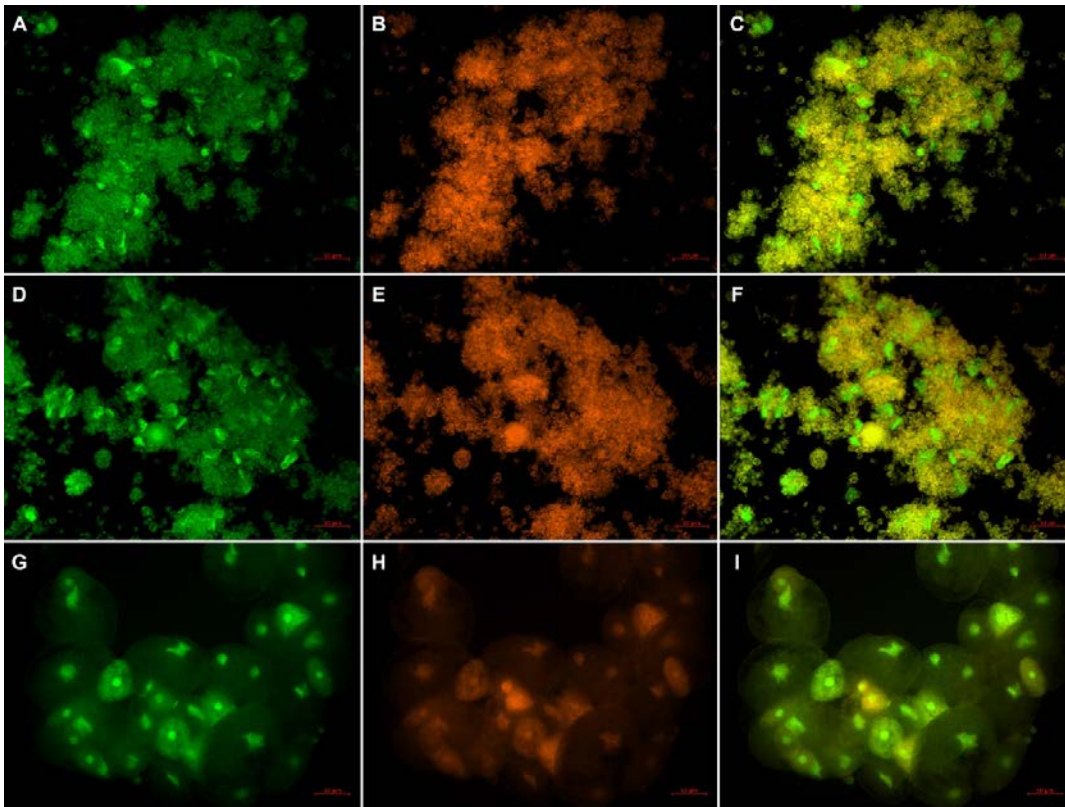


Figura 22: Coloração com laranja de acridina: **A - C:** larva; **D - F:** pupa; **G - I:** imago. Primeira coluna - canal FITC; segunda coluna - canal Rodamina; terceira coluna - sobreposição de canais. Barras = 50 μ m.

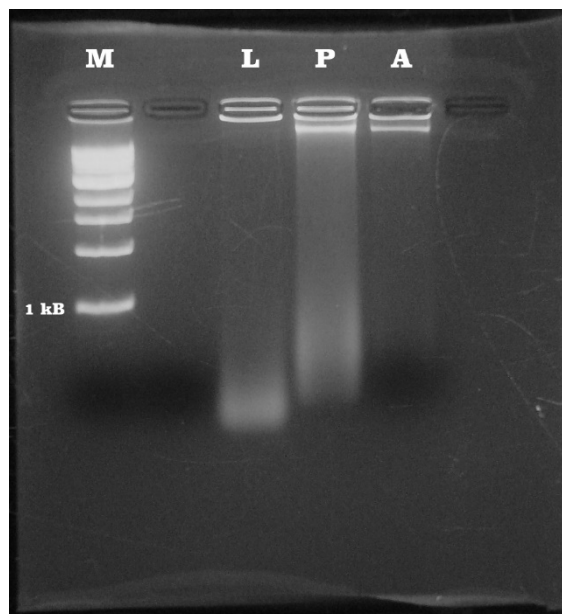


Figura 23: Eletroforese em gel: extração de DNA do corpo gorduroso. Observe que o material de larva (L) e pupa (P) apresentou notavelmente degradação, enquanto o adulto (A) mostrou a maior parte dele intacto. Nenhum padrão de degradação nucleossômica foi observado.

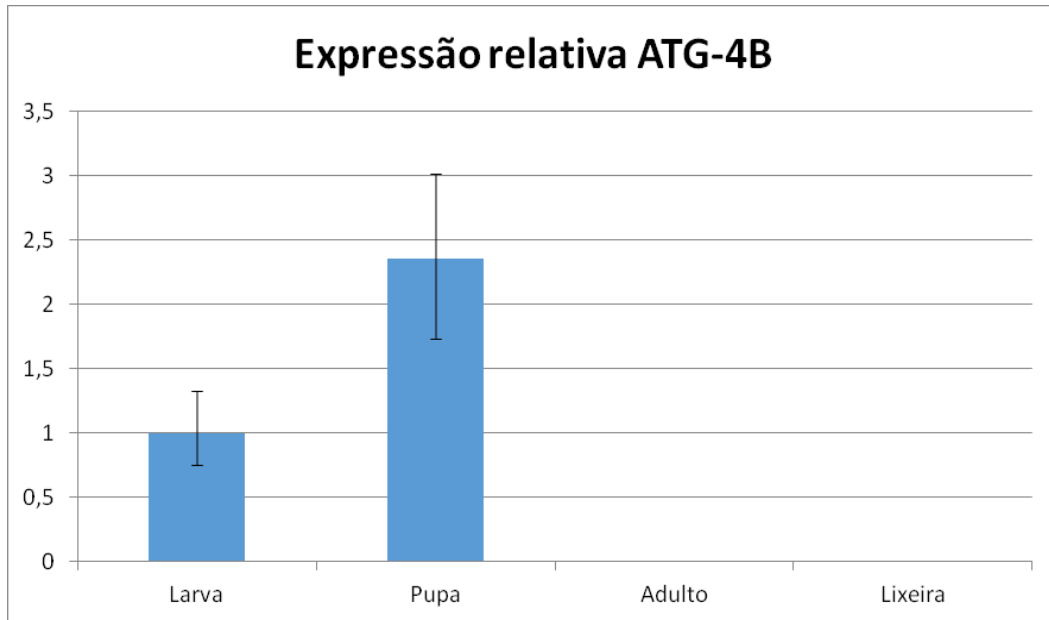


Figura 24: Quantificação de níveis de transcrição de ATG-4B por PCR em tempo real em corpo gorduroso.

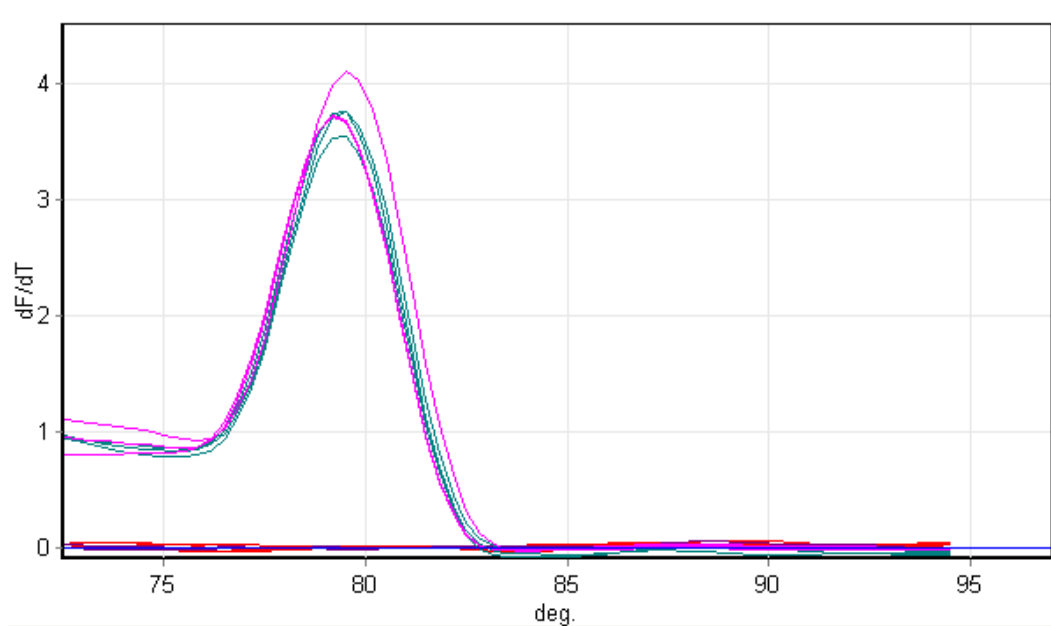


Figura 25: Curva de melting da reação de qRT-PCR, indicando a especificidade da reação e ausência de produtos de amplificação nas amostras de adulto e lixeiras.

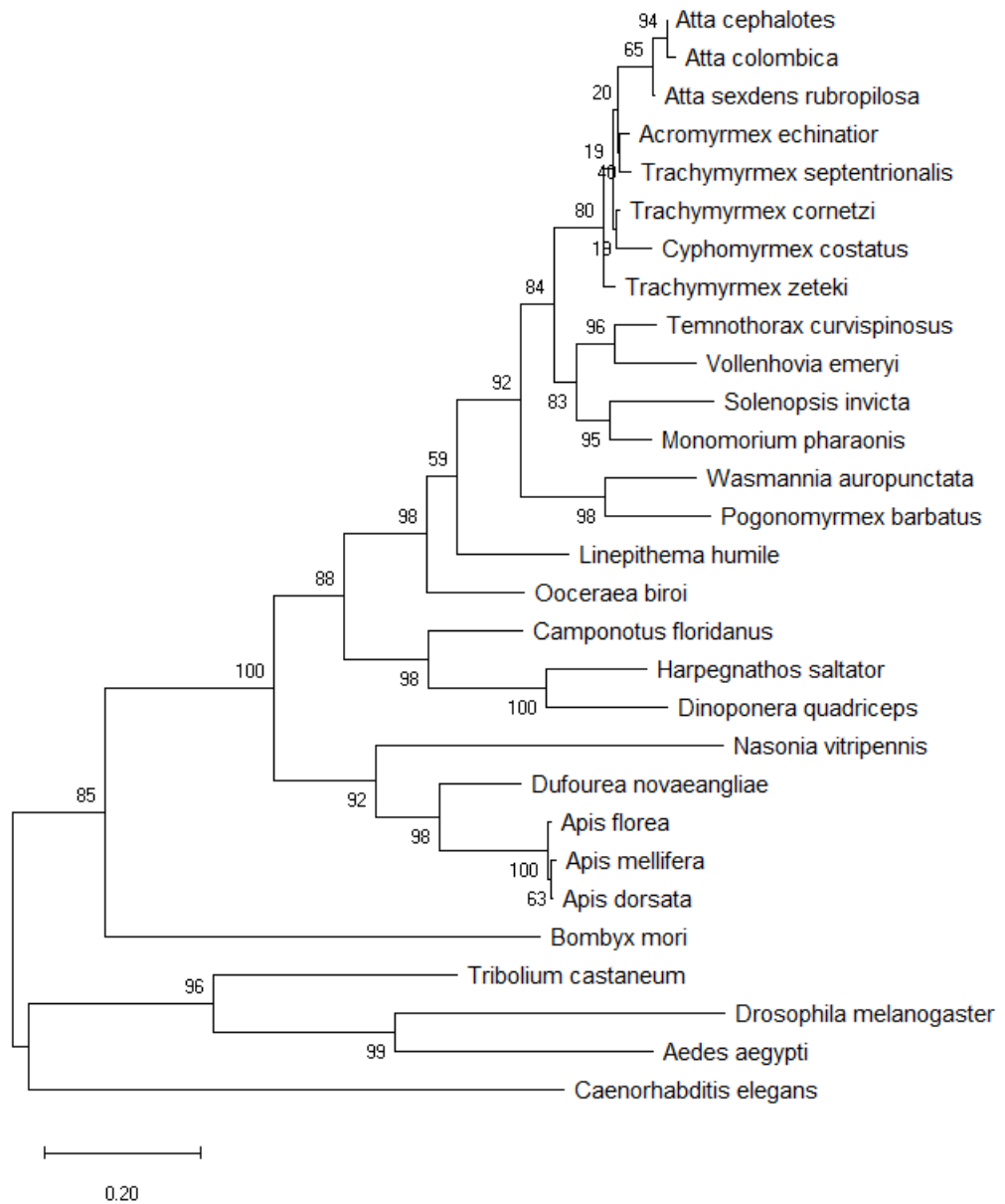


Figura 26: Análise evolutiva pelo método de máxima verossimilhança - A porcentagem de árvores nas quais o taxa associado está agrupado é mostrada ao lado das ramificações (*bootstrapping*). A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas no número de substituições por site.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O conteúdo do corpo gorduroso nos insetos concentra majoritariamente lipídios, proteínas e glicídios, representando as principais moléculas de reserva energética durante períodos de escassez e de maior demanda metabólica. Deste modo, pode-se comparar os achados desse presente trabalho com os dados apresentados na literatura referente à ocorrência de MCP no corpo gorduroso em insetos, mesmo os pertencentes a diferentes graus de distanciamento evolutivo da tribo Attini. Em *A. sexdens rubropilosa*, o acúmulo do material de reserva apresentou uma discreta predominância de vesículas lipídicas, seguidas de vesículas proteicas. De acordo com as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão, os trofócitos, sobretudo, apresentaram numerosas vesículas de diferentes eletrondensidades. Nossos achados sugerem que estas se tratam de vesículas armazenadoras, atuando como as principais supridoras de moléculas energéticas. Os estágios de larva e pupa apresentaram uma quantidade superior dessas vesículas armazenadoras, sendo que em pupas a maior parte delas apresentou avançado grau de degradação comparadas às vesículas do tecido larval.

A instância nutricional dos insetos pode variar de acordo com a espécie, o estado fisiológico e a dieta (KLOWDEN, 2007). Em *Atta laevigatta*, a presença do lipídio está associada à produção de compostos de hidrocarbonetos, como ceras e feromônios, além de representar o material de reserva (ROMA et al., 2006). As proteínas constituem a principal fonte de aminoácidos, e os polissacarídeos são considerados importantes supridores de energia aos músculos durante atividades de corte e apreensão de material vegetal, ou durante o forrageamento (ROMA et al., 2006). Em mamíferos, a

proteólise que se opera no tecido hepático fornece os aminoácidos requeridos em tempos de pausa alimentar. Tal reação catabólica se dá pela ação lisossômica sobre vesículas armazenadoras, ou mesmo sobre estruturas celulares, durante a autofagia (BLOMMART et al., 1997). Assim, de maneira análoga, o corpo gorduroso nos insetos atua como o principal armazenador de recursos metabólicos, e a mobilização dos mesmos também requer a atividade autofágica.

Já é conhecida a relação entre a autofagia e as mudanças fisiomorfológicas decorrentes da metamorfose nos insetos holometábolos. A presença de vacúolos autofágicos em diversos tecidos e órgãos da larva, como corpo gorduroso, intestino e glândulas salivares, por exemplo, denotam a importância da via de degradação lisossômica na reestruturação corporal, mediada pela liberação do hormônio 20-E, e inibido pelo JH (SASS, 2008). Uma linhagem de drosófilas transgênicas, expressando LC3 e Atg5 conjugadas à GFP, mostrou que LC3 foi expresso em diversos pontos no corpo gorduroso da larva nos instares iniciais, com marcação co-localizada para atividade lisossômica positiva, ao passo que tais marcações diminuíram no estágio de pré-pupa e pupa (RUSTEN et al., 2004). Em *Manduca sexta* (FACEY e LOCKSHIN, 2010), células da glândula labial larval apresentaram marcação positiva para MDC a partir do segundo dia de monitoramento, e alcançou cerca da metade das células analisadas a partir do quarto dia, evidenciando a formação de vacúolos autofágicos. Porém, no mesmo estudo, nenhuma atividade caspase-dependente foi notificada, mesmo em decorrência da degradação do citoesqueleto, a qual se atribuiu a despolimerização dos microfilamentos à ocorrência de atividade proteolítica.

Xu et al. (2012) estudaram o efeito de 20E sobre a expressão gênica no corpo gorduroso de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae), durante a diapausa da fase pupal. O nível de 20E estimulou a expressão de genes do metabolismo intermediário, resultando na liberação de TCA (ácido tricarbóxico) na hemolinfa. O alto nível de TCA na hemolinfa levou o cérebro a produzir PTTH, ativando a GP e consequentemente, funcionando como um

feedback positivo à liberação de 20E pela GP. Em baixas concentrações de 20E, o corpo gorduroso apresentou diminuição no nível de expressão gênica, resultando em menor quantidade de TCA, inibindo a produção de PTTH e de 20E pelo cérebro e pela GP, respectivamente. Esse episódio foi observado no inverno, quando há menor duração do dia e temperaturas mais baixas. Assim, o balanço hormonal demonstrou regular o consumo de metabólitos intermediários pelo corpo gorduroso, ativando mecanismos de latência sazonal no desenvolvimento do inseto. Além disso, em *B. mori*, 20E parece induzir à cessação do consumo alimentar, levando à lipólise do corpo gorduroso durante a muda e pupação (WANG et al., 2010).

Em *Troglophilus neglectus* (Rhaphidophoridae, Saltatoria), o corpo gorduroso apresentou um aumento de atividade autofágica durante o período de dormência invernal, provavelmente devido ao consumo de reserva para a manutenção do metabolismo basal nesses grilos (LIPOVSEK e NOVAK, 2015). O mosquito *Belgica antarctica* (Diptera, Chironomidae) mostrou-se adaptado às condições de dessecação do ambiente antártico, graças ao aumento da expressão de genes autofágicos no tecido da larva (TEETS e DENLINGER, 2013). Dessa forma, parece que a autofagia desencadeia uma série de reações catabólicas necessárias à manutenção do metabolismo, em condições desfavoráveis, seja pelo ritmo biológico da espécie, ou por adversidades do ambiente.

O corpo gorduroso de *A. sexdens rubropilosa* apresentou atividade metabólica variável conforme a idade analisada. Nas fases de larva e pupa, esse tecido mostrou intensa histólise e desagregação estrutural, bem como foi possível a observação de inúmeros vacúolos autofágicos, através da microscopia eletrônica de transmissão e da marcação positiva em experimentos de imunofluorescência. Estima-se que tal atividade seja desencadeada por controle hormonal, diante da muda e/ou privação de nutrientes, devido ao ciclo normal do desenvolvimento. Tal fato pode sugerir que a autofagia representa a principal via catabólica e de regeneração estrutural durante o desenvolvimento precedente à metamorfose. Também foi observada intensa atividade autofágica no corpo gorduroso de operárias

lixeyras. Nessas cuidadoras do lixo, acreditamos que a presença dos vacúolos autofágicos decorra da privação de nutrientes, uma vez que essas operárias não retornam às painelas de fungo para se alimentar.

Embora o mecanismo molecular da autofagia possa diferir entre diversos organismos (LEVINE e KLIONSKY, 2004), o processo autofágico em si é extremamente conservado, de modo que o seu estudo em artrópodes pode trazer muitas vantagens, como a facilidade de manejo do objeto de estudo e da obtenção de dados, somando-se a isso a importância na elucidação dos mesmos mecanismos em organismos superiores (MALAGOLI et al., 2010). Dentre a família atg, atg4 é a única protease, responsável por clivar um resíduo de glicina na porção C-terminal do atg8, que uma vez adenilado, forma um composto intermediário com atg7. Atg3 é então recrutado, transferindo atg8 ao grupo amino da fosfatidiletanolamina (PE), formando o conjugado atg8-PE. Esse conjugado pode então mediar pelo menos duas reações, (1) recrutar lipídios durante a elongação da membrana do fagóforo; (2) selar a membrana de isolamento, de maneira altamente seletiva (MARUYAMA e NODA, 2018). Atg4 é responsável então pela clivagem do complexo atg8-PE, reciclando atg8 e promovendo o término da elongação da membrana de isolamento.

Similarmente, a porção C-terminal de LC3 também é clivada por atg4, convertendo LC3-I a LC3-II, sendo então incorporada à membrana de isolamento e responsável pelo reconhecimento do lisossomo (YANG et al., 2015). Dentre os quatro subtipos de Atg4, Atg4b (autofagina-1) é a protease com maior atividade catalítica de LC3. Em células-tronco *knockdown* para Atg4b observou-se redução da autofagia, inviabilizando a sobrevivência de células tumorais de leucemia mieloide crônica humana, além de aumentar a sensibilidade das mesmas a determinados fármacos, demonstrando que Atg4b pode representar um importante alvo para o tratamento e regulação da autofagia em linhagens tumorais (ROTHER et al., 2014).

Em nossos achados, foi possível encontrar uma sequência ortóloga para Atg4b-Like em *A. sexdens rubropilosa*, com alto grau de similaridade com algumas sequências de insetos já armazenadas no GenBank. De acordo com

os resultados do qPCR, a expressão de Atg4b mostrou-se presente nas idades juvenis larva e pupa. A ausência de expressão de Atg4b em operárias adultas pode decorrer de dois importantes fatos, (1) o nível de expressão gênica desse fator não foi significativo para a detecção do mesmo pela curva de *threshold*, ou (2) a quantidade de RNA extraída do tecido adulto não foi suficiente para a detecção. Novos testes estão em curso para o cerceamento desta última hipótese. A análise *in silico* dessa sequência permitiu a elaboração de uma provável árvore filogenética entre o espécime estudado e grupos diversos, sendo a maioria pertencente à classe Hexapoda. Tal análise mostrou-se bastante parcimoniosa, agrupando gêneros supostamente bem relacionados evolutivamente, como *Atta* e *Apis* entre si, ambos da ordem Hymenoptera. No entanto, o estudo filogenético envolvendo organismos não-modelos carece de alguns cuidados, devido à falta de dados divulgados. Novas técnicas de sequenciamento, armazenamento e análise de dados podem dirimir muitas questões e permitir o avanço do estudo de espécies ainda não padronizadas (FONSECA et al., 2016).

O estudo da autofagia empregando linhagens celulares de insetos tem trazido contribuições significativas para o entendimento desse processo, sobretudo, qual o seu resultado diante a privação de um determinado nutriente. Em linhagens de *Spodoptera litura* (Lepidoptera, Noctuidae) submetidas à ausência de glicose em seu meio de cultura, após um período de suprimento do monossacarídeo, as células passaram a apresentar vacúolos autofágicos por todo o citoplasma, que desapareceram em torno de 48h, dando lugar à apoptose, após o acionamento de caspase-3 e o decréscimo dos níveis de ATP (LIU et al., 2007). Em linhagens IPLB-LdFB incubadas com oligomicina-A, um inibidor de ATP-sintetase, observou-se uma porcentagem expressiva de células em apoptose, oncose, seguida de necrose. No entanto, a medida que se passavam os dias, houve um aumento da quantidade de células em autofagia, como uma via alternativa de energia (TETTAMANTI et al., 2006).

Trabalhando com duas linhagens distintas, SL-ZSU e Bm36, Wu et al. (2011) também observaram a indução de autofagia perante períodos iniciais de privação de nutrientes. Em estágios prolongados, no entanto, houve diferenças

nos resultados apresentados, de acordo com a linhagem específica, SL-ZSU apresentou morte celular por apoptose, ao passo que em Bm36 observou-se morte celular autofágica. De acordo com o exposto, nota-se um papel importante da autofagia como tentativa de sobrevivência celular diante de situações de carência nutricional e de depleção energética em culturas celulares de insetos, embora ainda não se saiba profundamente qual a distinção entre o acionamento da via autofágica e os outros tipos de morte celular.

Alguns trabalhos, porém, contestam a importância da autofagia como fator de morte celular no desenvolvimento. Ou seja, embora ela ocorra durante a metamorfose de diversos organismos holometábolos, nem sempre ela evolui para a morte celular autofágica (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004). Em *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae), embora ocorra a expressão de Atg1 no corpo gorduroso em diferentes estágios larvais, não houve evidências de rompimento celular, sugerindo-se que os trofócitos seriam preservados para os estágios subsequentes (SANTOS, 2013). Dessa forma, a autofagia não representaria uma via de morte celular programada, mas antes seria classificada como um fator constitutivo, preservando as células do corpo gorduroso contra a degradação (SANTOS et al., 2014).

Em *B. mori*, a autofagia é induzida pelo 20E, no final do último estágio larval, concomitante ao remodelamento do intestino médio, supostamente devido à morte celular autofágica. Entretanto, ao promover-se o bloqueio de atividade das caspases, houve um atraso significativo da degeneração do epitélio intestinal, sugerindo-se que a autofagia não representa o desencadeamento da morte celular, antes, ela supostamente atuaria como ativadora da apoptose (ROMANELLI et al., 2016). Embora se saiba que a autofagia pode regular o destino celular na metamorfose do inseto, muitos genes Atg ainda permanecem desconhecidos em *B. mori* (TIAN e LI, 2015), de maneira que seriam apontados dois caminhos possíveis para a autofagia como morte celular programada: (1) como via exclusiva de morte celular, desintegrando a célula pelo acúmulo de vesículas autolisossômicas; e (2) como

precedente da apoptose, que embora acompanhe o processo de morte, a autofagia não seria a sua desencadeadora (ROMANELLI et al., 2014).

Diversos autores sugerem que a histólise das estruturas juvenis também seja promovida pela apoptose (TIAN et al., 2012; MEIER et al., 2000). Como os eventos apoptóticos nem sempre são evidenciados durante a microscopia de luz ou eletrônica (GALLUZI et al., 2009), estes foram investigados através da detecção de padrões de degradação do DNA por eletroforese em gel e pela coloração de células com laranja de acridina. Em *B. mori*, a degradação do DNA do corpo gorduroso como consequência da MCP marca a transição da fase pupal para a adulta, ocorrendo por volta do sexto dia do desenvolvimento (SUMITHRA et al., 2009). Muitos trabalhos sugerem uma associação entre autofagia e apoptose, como eventos complementares em um episódio de MCP. Em *D. melanogaster*, pelo menos dois modelos de integração são observados, a atuação em paralelo, quando durante a metamorfose a glândula salivar passa por uma desintegração autofágica e com atividade de caspases, ambas atuando no mesmo substrato celular, de forma que a inibição de qualquer uma das vias inviabilizou o processo de remodelamento tecidual; e a atuação epistática, durante a ovogênese, quando a privação de nutrientes provocou a degeneração das câmaras oóforas, acionando caspases, que induziram a autofagia, de forma que apoptose e autofagia mostraram-se complementares, uma regulando a via de atuação da outra (McPHEE e BAEHRECKE, 2009).

Em *B. mori*, 20E é responsável por acionar uma cascata de indução de apoptose, ativando uma série de genes envolvidos diretamente no processo. O silenciamento de USP (ultraespiráculo), um dos componentes do complexo receptor do hormônio, por RNA de interferência, resultou na redução de apoptose (TIAN et al., 2012). O mesmo grupo demonstrou que 20E também regula para cima genes *Atg* e reduz a atividade de TOR, induzindo a autofagia no corpo gorduroso (TIAN et al., 2013). Assim, a ativação de ambas as categorias de MCP no corpo gorduroso do inseto estariam sujeitas à liberação do pulso hormonal de 20E, coincidindo com as fases de muda e metamorfose, quando ocorre a alteração mais drástica do tecido.

Em mamíferos, a proteína Bcl-2 inibe tanto a apoptose, sequestrando o dímero Bax/Bak, responsáveis pela ativação da via intrínseca da apoptose, quanto a autofagia, sequestrando Beclin-1 e com isso, inibindo as demais vias de ativação autofágica. Na presença de um fator de estresse celular, como a falta de nutrientes, a presença de espécies reativas de oxigênio, ou patógenos, por exemplo, pode-se observar a ativação de ambas as vias, corroborando com a morte da célula (MUKHOPADHYAY et al., 2014) Além disso, parece que a expressão de BAX e BAK também ativa a via autofágica, indicando que a otimização da autofagia também depende da via intrínseca da apoptose (LALAOUI et al., 2015).

De acordo com nossos resultados, a reação de degradação do DNA de *A. sexdens rubropilosa* não apresentou um padrão oligonucleossômico em nenhuma das fases estudadas, tampouco a reação com laranja de acridina apresentou resultados positivos, sugerindo-se que a apoptose pode não colaborar significativamente na histólise durante sua metamorfose. Assim, similarmente à ocorrência em várias ordens de insetos, a autofagia durante a metamorfose em *A. sexdens rubropilosa* parece representar a principal via de morte e reconstituição das estruturas celulares do corpo gorduroso.

6 Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises histoquímica e ultraestrutural do corpo gorduroso da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* mostraram padrões distintos entre os diferentes estágios de vida. As fases juvenis, larva e pupa, apresentaram marcante degradação histolítica condizente com a morte celular do tipo autofágica.

Ensaio complementares em imunofluorescência confirmaram a presença de vacúolos autofágicos dentre as três idades analisadas, apresentando-se em maior intensidade entre os tecidos juvenis. A análise em microscopia confocal não mostrou alterações do citoesqueleto no corpo gorduroso em nenhuma fase.

A reação de qPCR para Atg4b apresentou curva de expressão nos tecidos juvenis, porém em indivíduos adultos não foi possível aferir tal detecção. Para a confirmação da expressão de atg4b no corpo gorduroso de *A. sexdens rubropilosa*, faz-se necessário o emprego de outros testes de expressão e atividade proteolítica, como por exemplo o *Western Blot* e/ou a hibridação *in situ*.

Dentre as operárias adultas, as lixeiras apresentaram um aumento no número de vacúolos autofágicos em seu corpo gorduroso quando comparadas às demais categorias, sugerindo-se que o consumo dessas células supriria as necessidades energéticas das mesmas em seu estágio final de vida.

Não se observou nenhuma evidência experimental de apoptose, seja pela análise da degradação do DNA do tecido, seja pela marcação em laranja de acridina. No entanto, não se pode afirmar que a degradação do tecido ocorra exclusivamente pela morte celular autofágica, excluindo-se a apoptose de sua importância. Demandam-se testes complementares para a comprovação da ação apoptótica, como os métodos de detecção de caspases e de degradação do DNA, como o TUNEL, por exemplo.

REFERÊNCIAS

ALMARGO, M. C.; VUCIC, D. (2015) Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, 56 – 62.

AMEISEN, J.C. (2002). On The origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell death and Diff.*, 9, 367 – 393.

ARRESE, E. L.; L. SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu.Rev. Entomol.*, [S.I.], v. 55, p. 207-225, jan. 2010.

ARYA, R.; WHITE, K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39 (2015), pp. 12 – 19.

BENTO, C.F.; RENNA, M.; GHISLAT, G.; PURI, C.; ASKHENAZI, A.; VICINANZA, M.; MENZIES, F.M.; RUBINSZTEIN, D.C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.*, 85, 685 – 713.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSOJ, B. T. (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 99 – 109.

BIEDERBICK, A.; KERN, H.F.; ELSÄSSER, H.P.(1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell. Biol.*, 66, 3 – 14.

BLOMMART, E. F. C.; LUIKEN, J. J. F. P. ; MEIJER, A. J. (1997) Autophagic proteolysis : control and specificity. *The Histochemical Journal*, 29, 365 – 385.

BUSTIN, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* 25(2): 169-193.

BUSTIN, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39.

CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect biochem. Molec. Biol.* 30 (2000), pp 1173 – 1180.

CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; ROSA, C. A. R. Selection of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates pathogenic to *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa* soldiers under laboratory conditions. *Ciência Rural*. 40 (2010), pp. 1243 – 1249.

CHANG, Y. Y.; NEUFELD, T. P. Autophagy takes flight in *Drosophila*. *FEBS Letters*. 584 (2010), pp 1342 – 1349.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge Univ. Press. 5th Ed (2012), 968p.

CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas – Morfologia e função de sistemas*. Ed. Unesp (2009), 408p.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116, 205 – 219.

DINIZ, E., & BUENO, O. (2007). Evolution of the behavior of substrates to prepare fungus cultivation in the ants of the Attini tribe. *Biológico*. Suplemento 2, 397 - 398.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 663 – 669.

ELMORE, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, pp. 495 - 516.

FACEY, C. O. B.; LOCKSHIN, R. A. (2010). The execution phase of autophagy associated PCD during insect metamorphosis. *Apoptosis*, 15, 639 – 652.

FAHRBACH, S. E.; NAMBU, J. R.; SCHWARTZ, L. M. Programmed Cell Death in Insects. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, Academic Press (2012), pp. 419 – 449.

FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

FENG, Y.; KE, C.; TANG, Q. ; DONG, H.; ZHENG, X.; LIN, W.; HUANG, J.; YEUNG, S-CJ.; ZHANG, H. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death and Disease*, 5 (2014), pp. 1 – 12.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73, 1907 – 1916.

FONSECA, R.R.; ALBRECHTSEN, A.; THEMUDO, G.E.; RAMOS-MADRIGAL, J.; SIBBESEN, J.A.; MARETTY, L.; ZEPEDA-MENDOZA, M.L.; CAMPOS, P.F.; HELLER, R.; PEREIRA, R.J. (2016). Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Marine Genomics*, 30, 3 – 13.

FORTI, L., ANDRADE, A. D., & RAMOS, V. (Março de 2000). Biology and behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae): implications for their control. *Série Técnica IPEF*, pp. 103 - 114.

FUCHS Y. ; STELLER, H. (2015) Live to die another way : modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 16, 329 – 344.

GALUZZI, L.; AARONSON, S. A.; KROEMER G.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16 (2009), pp. 1093 – 1107.

GISH, W.; STATES, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." *Nature Genet*, 3, 266-272.

GREWAL, S.S.; SAUCEDO, L.J. (2004). Chewing the Fat: Regulating Autophagy in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 7, 148 – 150.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. *Insetos - Fundamentos da Entomologia*. 5ª Ed. ed. [S.I.]: Guanabara Koogan, 2017. 460 p.

HAUNERLAND, N. H. Insect Storage Proteins: Gene Families and Receptors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26 (1996), pp 755 – 765.

HAUNERLAND, N. H.; SHIRK, P. D. Regional and Functional Differentiation in the Insect Fat Body. *Annual Review of Entomology*, [S.I.], v. 40, p. 121-145, jan. 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. (2010) *The Leafcutter Ants – Civilization by Instinct*. W. W. Norton & Company, November, 192 pp.

HONGMEI, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathway Review. *Intech*.

HOSHIZAKI, D. K. Fat body. In: CHAPMAN, R. F. *The Insects: Structure and Function*. 5ª Ed. ed. [S.I.]: Cambridge University Press, 2012. cap. 6, p. 132-145.

JOUAN-LANHOUE, S.; RIQUE, F.; DUPREZ, L.; BERGHE, T. V.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. (2014) Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 35, 2 – 13.

KLIONSKY, D. J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A.; ABEDIN, M. J.; ABELIOVICH, H.; AROZENA, A. A.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12 (2016), pp. 1 – 222.

JINDRA, M.; PALLI, S. R.; RIDDIFORD, L. M.. The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. *Annu. Rev. Entomol.* 58 (2013), pp 181 – 204.

KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D.V.(2013). Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity*, 38, 209 – 223.

KANDUC, D.; MITTELMAN, A.; SERPICO, R.; SINIGAGLIA, E.; SINHA, A. A.; NATALE, C.; SANTACROCE, R.; DI CORCIA, M. G.; LUCCHESI, A.; DINI, L.; PANI, P.; SANTACROCE, S.; SIMONE, S.; BUCCI, R.; FARBER, E. Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review) (2002). *International Journal of Oncology*, 21, 165 – 170.

KERN, J. C.; KEHRER, J. P. (2002). Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chemico-Biological interactions*, 139, 79 – 95.

KLOWDEN, M. J. (2007). *Physiological systems in insects*. San Diego, CA: Academic Press - Elsevier.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*, 16, 3 – 11.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. (2008) Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44, 205 – 221.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ C.; TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

LEAL, I. R., Wirth, R., & Tabarelli, M. (2012). Formigas-cortadeiras e a ambiguidade de suas relações com plantas . Em K. Del-Claro, & H. Torezan-Silingardi, *Ecologia das interações plantas-animais* (p. 336). Technical.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. (April de 2004). Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell*, pp. 463 - 477.

LIPOVSEK, S.; NOVAK, T. Autophagy in the fat body cells of the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss, 1878 (Rhaphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Protoplasma*. May (2015), 10 p.

LIU, K.; TANG, Q.; FU, C.; PENG, J.; YANG, H.; LI, Y.; HONG, H. Influence of glucose starvation on the pathway of death in insect cell line SI : apoptosis follows autophagy. *Cytotechnology*. 54 (2007), pp 97 – 105.

LIU, X; ZHANG, Z; RUAN, J.; PAN, Y. ; MAGUPALLI, V. G. ; WU, H. ; LIEBERMAN, J. (2016) Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535, 153 – 158.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *The Journal of Cell Biology*. 36 (1968), pp 453 – 482.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *The Journal of Cell Biology*. 26 (1965), pp 857 – 884.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochem. & Cell Biol*. 36 (2004), pp 2405 – 2419.

MAJNO, G.; JORIS, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am. J. Pathol.*, 146, 3 – 15.

MAKKI, R.; CINNAMON, E.; GOULD, A. P. The Development and Functions of Oenocytes. *Annual Review of Entomology*, [S.l.], v. 59, p. 405-425, jan. 2014.

MALAGOLI, D.; ABDALLA, F. C.; CAO, Y.; FENG, Q.; FUJISAKI, K.; GREGORC, A.; MATSUO, T.; NEZIS, I. P.; PAPASSIDERI, I. S.; SASS, M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; TETTAMANTI, G.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R. Autophagy and its physiological relevance in arthropods - Current knowledge and perspectives. *Autophagy*, 6:5, 1 -14, 2010.

MARTINS, G. F.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M. Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 139-152, dez. 2012.

MARUYAMA, T.; NODA, N. N. (2018) Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of Antibiotics*, 71, 72 – 78.

McPHEE, C. K.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1793 (2009), pp 1452 – 1460.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*, 407 (2000), pp. 796 – 801.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell*, 147, 728 – 741.

MORIN, E. (2002). *Ciência com Consciência*. Bertrand Brasil, 6ª ed, 350p.

MUHOPADHYAY, S.; PANDA, P. K.; SINHA, N.; DAS, D. N.; BHUTIA, S. K. (2014) Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 19, 555 – 566.

NEWTON, K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends in Cell Biology*, 25, 347 – 353.

NICKELE, M., PIE, M., REIS-FILHO, W., & PENTEADO, S. (janeiro - março de 2013). Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, pp. 53 - 72.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K. ; TAVERNARAKIS , N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833 (2013), pp 3448 – 3459.

ONKEL, B.; DRISCOLL, M. Metformin Induces a Dietary Restriction-Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *Plos One*, 5 (2010), pp. 1 – 13.

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

ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Chemical detection of the proteins and lipids in the fat body cells from workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae). *Cell Biology International*. 32 (2008a), pp 406 – 416.

ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Fat body cells of female reproductive castes of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae): An ultrastructural and chemical analysis. *Zoologischer Anzeiger*. 247 (2008b), pp 303 – 313.

ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*. 37 (2006), pp 234 – 242.

ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*. 41 (2010), pp 395 – 401.

ROMANELLI, D.; CASARTELLI, M.; CAPELOZZA, S.; EGULEOR, M.; TETTAMANTI, G. (2016). Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis. *Scientific Reports*, 6, 1 – 15.

ROMANELLI, D.; CASATI, B.; FRANZETTI, E.; TETTAMANTI, G. (2014) A Molecular View of Autophagy in Lepidoptera. *BioMed Research International*, 1 – 11.

ROSELL, R. C.; WHEELER, D. E. Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Buckley) (Hymenoptera: Formicidae). *Int. J. Morphol. & Embriol.* 24 (1995), pp 413 – 426.

ROTHER, K.; LIN, H.; LIN, K. B. L.; LEUNG, A.; WANG, H. M.; MALEKESMAEILI, M.; BRINKMAN, R. R.; FORREST, D. L.; GORSKI, S. M.; JIANG, X. (2014) The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells. *Blood*, 123, 3622 – 3634.

RUSTEN, T. E.; LINDMO, K.; JUHÁSZ, G.; SASS, M.; SEGLEN, P. O.; BRECH, A.; STENMARK, H. Programmed Autophagy in the *Drosophila* Fat Body Is Induced by Ecdysone through Regulation of the PI3K Pathway. *Developmental Cell*. 7 (2004), pp 179 – 192.

SANTOS, D. E. Transformações do corpo gorduroso durante a metamorfose de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SANTOS, D. E.; AZEVEDO, D. O.; CAMPOS, L. A. O.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma* 252 (2015), pp 619 – 627.

SASS, M. Autophagy research on insects. *Autophagy* 4 (2008), pp 265 – 267.

SCOTT, R. C.; SCHULDINER, O.; NEUFELD, T. P. Role and Regulation of Starvation-Induced Autophagy in the *Drosophila* Fat body. *Developmental Cell*. 7 (2004), pp 167 – 178.

SHI, W-Y; XIAO, D. ; WANG, L. ; DONG, L-H. X.; YAN, Z-X.; SHEN, Z-X.; CHEN, S-J.; ZHAO, W-L. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death and Disease*, 3 (2012), pp. 1 – 9.

SILVA, L., CAMARGO, R., FORTI, L., MATOS, C., & TRAVAGLINI, R. (December de 2015). Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology*, pp. 484 - 493.

SINDELKA, R., et al. (2006). "Developmental expression profiles of *Xenopus laevis* reference genes." *Dev Dyn* 235(3): 754-758.

SUMITHRA, P.; BRITTO, C. P.; KRISHNAN, M. Modes of cell death in the pupal perivisceral fat body tissue of the silkworm *Bombyx mori* L. *Cell Tissue Res.* 339 (2010), pp 349 – 358.

TAMURA K.; NEI M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

TEETS, N. M.; DENLINGER, D. L. (2013) Autophagy in Antarctica. *Autophagy*, 9:4, 629 - 631.

TETTAMANTI, G.; MALAGOLI, D.; MARCHESINI, E.; CONGIU, T.; EGUILEOR, M.; OTTAVIANI, E. (2006). Oligomycin A induces autophagy in the IPLB-LdFB cell line. *Cell Tissue Res.* , 326, 179 - 186.

TETTAMANTI, G.; SALÓ, E.; GONZÁLEZ-ESTÉVEZ, C.; FELIX, D. A.; GRIMALDI, A.; EGUILEOR, M. Autophagy in Invertebrates: Insights Into development, Regeneration and Body Remodeling. *Current Pharmaceutical Design.* 14 (2008), pp 116 – 125.

TIAN, L.; MA, L.; GUO, E.; DENG, X.; MA, S.; XIA, Q.; CAO, Y.; LI, S.. 20-hydroxyecdysone upregulates Atg genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9 (2013), pp. 1172 – 1187.

TIAN, L.; LIU, S.; LIU, H.; LI, S. 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the *Bombyx* fat body. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79 (2012), pp. 207 – 219.

TRACY, K.; BAEHRECKE, E. H. The Role of Autophagy in *Drosophila* Metamorphosis. *Curr. Top. Dev. Boil.* 103 (2013), pp 101 – 125.

TRUMP, B. E.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S. H.; PHELPS, P. C. (1997) The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicologic Pathology*, 25, 82 - 88.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. (2002) Morphology and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anat. Histol. Embryol.*, 31, 214 - 223.

VANDENABEELE, P.V.; GALLUZZI, L.; BERGH, T. V.; KROEMER, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 700 - 714.

WANG, S.; LIU, S.; LIU, H.; WANG, J.; ZHOU, S.; JIAG, R. J.; BENDENA, W. G.; LI, S. (2010) 20-hydroxyecdysone Reduces Insect Food Consumption Resulting in Fat Body Lipolysis During Molting and Pupation. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2, 128 - 138.

WHEELER, D. E.; MARTÍNEZ, T. Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 112 B (1995), pp 15 – 19.

WHITE, K.; GREYER, M. E.; ABRAMS, J. M.; YOUNG, L.; FARREL, K.; STELLER, H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*, 29 (1994), pp. 677 – 683.

WU, W.; WEI, W; ABLIMIT, M.; MA, Y.; FU, T.; LIU, K.; PENG, J.; LI, Y.; HONG, H. (2011). Responses of two insect cell lines to starvation: Autophagy prevents them from undergoing apoptosis and necrosis, respectively. *Journal of Insect Physiology*, 57, 723 - 734.

XU, W. H.; LU, Y. X.; DENLINGER, D. L. (2012) Cross-talk between the fat body and brain regulates insect development arrest. *PNAS*, 109, 14687 - 14692.

YANG, Z.; WILKIE-GRANTHAM, R. P.; YANAGI, T.; SHU, C. W.; MATSUZAWA, S.; REED, J. C. (2015) Autophagy protease regulation by phosphorylation. *JBC Papers in Press*, 1 - 17.

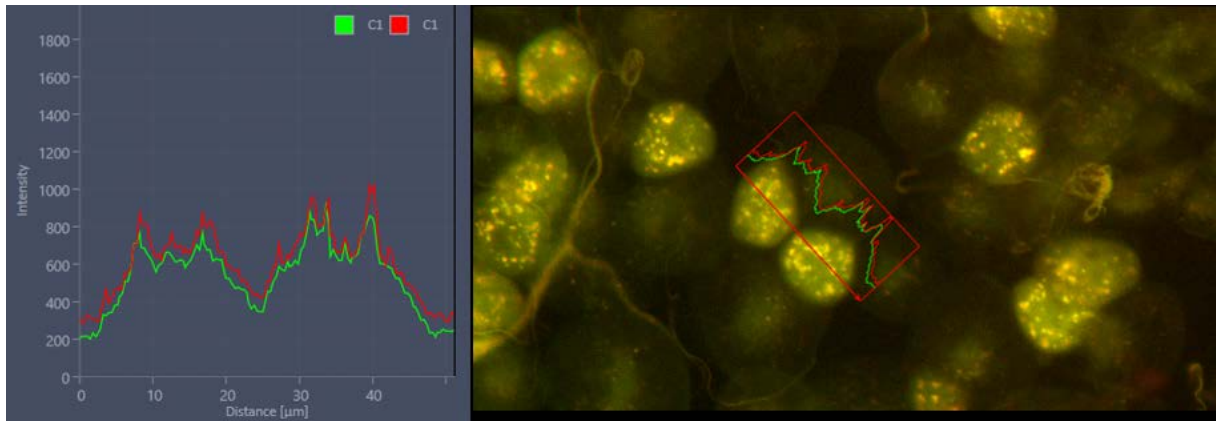
ZAFFAGNINI, G.; MARTENS, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 428, 1714 - 1724.

ZANETTI, R.; DIAS, N.; REIS, M.; SOUZA-SILVA, A.; MOURA, M. A. Efficiency of granulated baits (sulfuramid 0.3%) in the control of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *Ciênc. Agrotec.* 28 (2004), pp. 878 – 882.

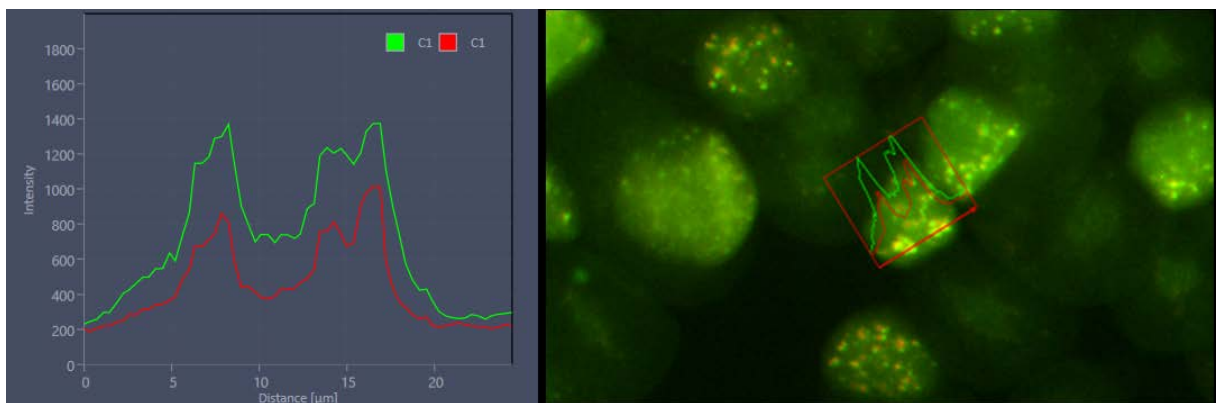
ZHANG, J. & MADDEN, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." *Genome Res.* 7:649-656.

ZHOU, W.; YUAN, J.(2014) Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 35, 14 - 23.

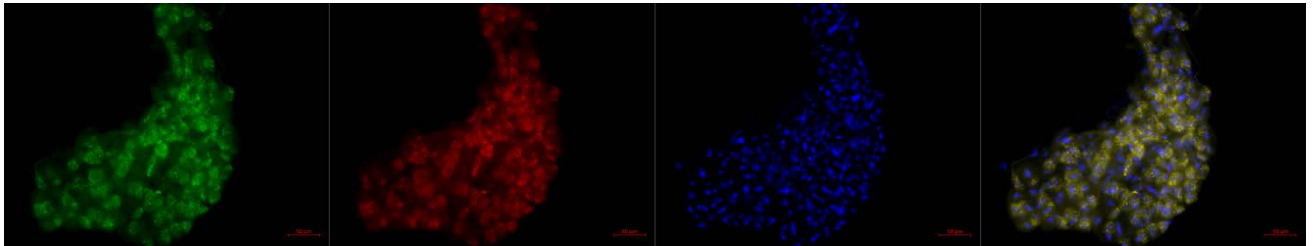
APÊNDICE



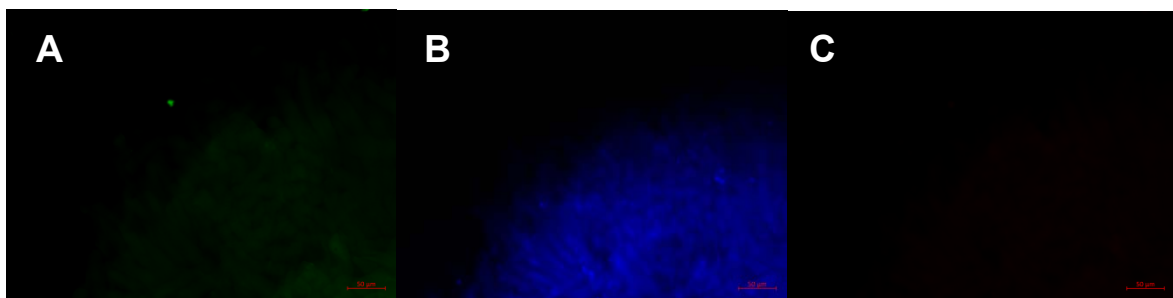
A1 – Perfil de co-localização de anti-Lamp1 com MDC em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (operária). C1 – filtro FITC (MDC); C2 – filtro Rhodamine (anti-Lamp1).



A2 - Perfil de co-localização de anti-LC3 com MDC em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (operária). C1 – filtro FITC (MDC); C2 – filtro Rhodamine (anti-LC3).



A3 – Controle positivo para LC3 em corpo gorduroso de *Atta sexdens rubropilosa* (operária). O tecido foi imerso em solução de metformina 20 mM, durante 20 minutos e lavado em PBS, pH 7,2. Da esquerda para a direita, filtro FITC; Rhodamine; DAPI; sobreposição. Barra = 50 μ m.



A4 – Controle negativo de imunofluorescência. Os anticorpos primários (anti-LC3 e anti-Lamp1) foram omitidos. A) FITC; B) DAPI; C) AlexaFluor568 conjugado com IgG anti-rabbit. Barra = 50 μ m.