

LÍDIA APARECIDA DOURADO

**CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE SUBCASTAS DE OPERÁRIAS DA
FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens rubropilosa*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira
Jamile Fernanda Silva Cossolin

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D739c
2023
Dourado, Lidia Aparecida, 1982-
Caracterização dos hemócitos de subcastas de operárias da
formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera:
Formicidae) / Lidia Aparecida Dourado. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (85 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.242>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Formigas - Morfologia. 2. Hemócitos. 3. Citometria de
fluxo. I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.796


LÍDIA APARECIDA DOURADO

**CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE SUBCASTAS DE OPERÁRIAS DA
FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens rubropilosa*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LÍDIA APARECIDA DOURADO
Data: 25/05/2023 16:35:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lídia Aparecida Dourado
Autora

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO SERRAO
Data: 26/04/2023 08:27:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Eduardo Serrão
Orientador

Aos meus pais, César e Marly, assim como minha irmã Nádia, que não mediram esforços para me ajudar. Agradeço pelo amor, compreensão da ausência, apoio e carinho de sempre. Por terem me dado o melhor presente: o incentivo ao ESTUDO.

Ao meu esposo Jacineumo, pelo sentimento verdadeiro que nos une, pelo apoio nos momentos difíceis, incentivo e companheirismo durante todo este percurso. Pela troca de conhecimentos e colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por ter me proporcionado a saúde e a esperança de dias melhores. Por permitir continuar convivendo com as pessoas que amo e finalizar esse trabalho tão importante em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), de beleza tão imponente, eu agradeço por todo ambiente inspirador e propício à evolução e crescimento. Nunca esquecerei essa linda casa!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa concedida. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) – 02367-18 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – 303243/2022-8 pelo financiamento. “O investimento em ciência e tecnologia é a porta para um futuro melhor!”

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do curso.

Ao meu orientador, professor Dr. José Eduardo Serrão, exemplo profissional e pessoal, meu sincero agradecimento pela orientação valiosa, compreensão, apoio nos momentos difíceis, pela amizade e descontração nas maravilhosas confraternizações de final de ano em sua residência.

Aos meus coorientadores, professor Dr. Leandro Licursi de Oliveira e Dr^a. Jamile Fernanda Silva Cossolin, pela grande contribuição e valiosos ensinamentos no decorrer deste trabalho. Gratidão!

Ao corpo docente do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos valiosos ensinamentos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pelo uso dos equipamentos e aos funcionários pelo grande auxílio durante os experimentos.

À secretária Beth do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela simpatia e prestatividade em resolver nossos problemas acadêmicos.

Ao pessoal do Laboratório de Formigas-cortadeiras, especialmente Karina, Lailla, Andressa pelo auxílio e prestatividade na coleta das formigas.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Ana, Daniela, Gilberto, Karina; Lailla; Leandro e Luiza por aceitaram o convite e pela contribuição com valiosos ensinamentos.

A todos os amigos do *TeamSerrão*, Laboratório de Ultraestrutura Celular, especialmente Ana Paula, Amanda, Bárbara, Jamile, Mayara, Raissa e Paulo, pelos ótimos momentos de convivência e descontração. Jamais esquecerei dos momentos que vivi nesse laboratório e nem das amizades que guardarei no coração.

Ao ensino superior público e de qualidade, pela formação profissional de vários estudantes durante todos anos.

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFV pelas solicitações de comuts e empréstimos.

As professoras Ana Maria Costa Leonardo, Cristiane Nunes e Luanda Medeiros Santana, assim como Amanda Martins da Cruz Souza, Franciane Rosa Miranda; Helena Rocha Côrrea de Araújo; Juan Diego Rios Díez; Luis Andres Arteaga Blanco; Luiz Carlos Martinez; Paulo Henrique Rezende; Samira Veiga Ravaiano e Verônica Saraiva Fialho pela gentileza no auxílio em algumas atividades, providenciarem materiais e fornecerem informações, contribuindo com desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Alex Rodrigues Borges e sua irmã Patrícia, pela indicação dessa linda universidade UFV, assim como do orientador, pela hospedagem, amizade, apoio e por fazerem parte de mais uma etapa de minha vida.

A todos professores que passaram pela minha vida, deixando algum aprendizado.

A todos colegas da república “Formigueiro” com quem convivi nesses últimos anos, em especial Luciane e Renan, Laiza, Taise, Raíra e Carla, pela amizade, pelos agradáveis momentos, assim como pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos do telegram pela amizade e momentos agradáveis, principalmente pelos encontros para cozinhar.

Aos meus avós (in memoriam), tios e primos que torceram por mim a vida toda.

As minhas amigas de infância, Dani Barbosa; Dani, Graci e Tati Bonani; e Vani pela amizade duradoura, pelos momentos de descontração e muito carinho.

A todas as pessoas, que cruzaram meu caminho no decorrer desses anos de doutorado e aquelas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo aquelas que nem cheguei a conhecer, mas que colocaram meu nome nas suas orações, emitiram pensamentos positivos, torceram pela minha recuperação. Agradeço cada apoio e gesto de carinho. Gratidão!

A todos os pesquisadores envolvidos nas pesquisas com COVID-19, principalmente no desenvolvimento das vacinas. Viva a Ciência! Viva o SUS!

Uns queriam um emprego melhor; outros, um emprego...
Uns queriam uma refeição mais farta; outros, apenas uma refeição...
Uns queriam uma vida mais amena; outros, apenas viver...
Uns queriam ter pais mais esclarecidos; outros, apenas ter pais...
Uns queriam ter olhos claros; outros, apenas enxergar...
Uns queriam ter voz bonita; outros apenas falar...
Uns queriam o silêncio; outros, ouvir...
Uns queriam um sapato novo; outros, ter pés...
Uns queriam um carro; outros, andar...
Uns queriam o supérfluo... Outros, apenas o necessário...
(Chico Xavier)

Às vezes, é preciso ter paciência e serenidade para entender que é por meio de um trabalho de formiguinha que conseguiremos o que tanto queremos. Aos poucos, com trabalho árduo e dia após dia é que você chegará ao seu objetivo." Acredite! (autor desconhecido)

BIOGRAFIA

Lídia Aparecida Dourado, filha de César Dourado e Marly Catarina da Cruz Dourado, nasceu em 10 de novembro de 1982, na cidade de Cascavel/PR.

No ano de 1996, finalizou o Ensino Fundamental, na Escola Anibal Lopes da Silva, na cidade de Cascavel/PR.

Em 1999, concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Professor Francisco Lima da Silva, na cidade de Cascavel/PR.

Diplomou-se, em agosto de 2004, em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, habilitação em Licenciatura e Bacharelado, pela Universidade Paranaense - UNIPAR, Campus Cascavel/PR.

Em agosto de 2006, recebeu o certificado de conclusão do curso de Especialização em Ciências Morfofisiológicas, com ênfase em Corpo Humano, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Cascavel/PR.

Em 2009 finalizou o curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá/PR.

Em 2012, concluiu o curso de Especialização em Microbiologia Agroindustrial, em nível de Especialização, pela Universidade Paranaense - UNIPAR, Campus Toledo/PR.

Em 2023 finalizou a Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em nível de doutorado, pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa/MG.

RESUMO

DOURADO, Lídia Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Caracterização dos hemócitos de subcastas de operárias da formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: formicidae).** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Jamile Fernanda Silva Cossolin.

As formigas são insetos sociais que possuem sistema imune inato eficiente como mecanismo de defesa, sendo constituído por componentes humorais e celulares da hemolinfa, denominados hemócitos. Diferentes hemócitos foram identificados nos insetos, no entanto, na formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae), inexistente a caracterização celular dessa natureza para a espécie em estudo. Essa formiga de importância ambiental e econômica, possui colônia organizada e a divisão de trabalho é realizada por castas, sendo as operárias divididas nas subcastas jardineiras, lixeiras, forrageiras e soldados. As jardineiras desempenham o cultivo do fungo simbiote e cuidados da prole; as lixeiras gerenciam o lixo e higienizam o ninho; as forrageiras auxiliam na construção do ninho, executando o corte e transporte de folhas para o interior do ninho; e os soldados realizam a proteção da colônia e auxiliam as forrageiras. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo caracterizar morfológica e funcionalmente os hemócitos circulantes na hemolinfa das subcastas de operárias da formiga *Atta sexdens rubropilosa* de diferentes subcastas. Foram realizadas as técnicas de medição da cápsula cefálica, microscopia de luz, fluorescência, confocal a laser, eletrônica de varredura, contagem diferencial e contagem total de hemócitos, assim como citometria de fluxo. O comportamento das formigas dentro do ninho, assim como o tamanho da cápsula cefálica confirmou as subcastas de operárias. Na hemolinfa da formiga foram identificados cinco tipos morfológicos de hemócitos, denominados como pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos, comum em todas as subcastas. Os granulócitos e os pró-hemócitos são os tipos mais abundantes circulando na hemolinfa. As maiores quantidades de hemócitos foram obtidas nas subcastas forrageiras e soldados. Os soldados e jardineiras apresentam maiores quantidades de células fagocíticas. Granulócitos e plasmatócitos fagocitaram bactérias *E. coli* em maior quantidade. Cinco subpopulações foram encontradas na hemolinfa das formigas, mas duas foram predominantes, que provavelmente sejam os granulócitos e plasmatócitos. Os soldados apresentaram células e intensidade de fluorescência maior em relação às subcastas jardineira, lixeira e forrageira, por outro lado, com complexidade interna/granulosidade estatisticamente

diferente apenas em relação às células da subcasta jardineira. Dessa maneira, esses resultados indicam que os soldados apresentam sistema imunológico mais desenvolvido. A caracterização e descrição celular dos hemócitos dessa espécie, fornece dados para estudos futuros com finalidade de melhor compreender a fisiologia deste importante inseto.

Palavras-chave: Formiga. Hemócitos. Morfologia. Microscopia. Citometria.

ABSTRACT

DOURADO, Lídia Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Characterization of hemocytes of worker subcastes of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: formicidae).** Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisors: Leandro Licursi de Oliveira and Jamile Fernanda Silva Cossolin.

Ants are social insects with an efficient innate immune system as a defense mechanism, consisting of humoral and cellular components of the hemolymph, called hemocytes. Different hemocytes were identified in the insects; however, in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae), there is no cellular characterization of this nature for the species under study. This ant of environmental and economic importance has an organized colony. The division of labor is carried out by castes, with the workers divided into the subcastes gardeners, garbage collectors, foragers, and soldiers. The planters carry out the cultivation of the symbiotic fungus and care of the offspring; the bins manage the garbage and sanitize the nest; the foragers help in the construction of the nest, performing the cutting and transport of leaves to the interior of the nest; and the soldiers carry out the protection of the colony and help the foragers. Thus, the study aims to characterize morphologically and functionally the circulating hemocytes in the hemolymph of worker ants of *Atta sexdens rubropilosa* of different sub-castes. Techniques for measuring the head capsule, light microscopy, fluorescence, laser confocal, scanning electronics, differential and total hemocyte counts, and flow cytometry were performed. The behavior of ants inside the nest and the size of the cephalic capsule confirmed the subcastes of workers. In the ant hemolymph, five morphological types of hemocytes were identified, named prohemocytes, oenocytoids, spherulocytes, plasmatocytes, and granulocytes, standard in all subcastes. Granulocytes and prohemocytes are the most abundant types circulating in the hemolymph. The highest amounts of hemocytes were obtained in the forager's and soldiers' subcastes. Soldiers and planters have higher amounts of phagocytic cells. Granulocytes and plasmatocytes phagocytosed *E. coli* bacteria in greater quantity. Five subpopulations were found in the ant hemolymph, but two were predominant, which are probably granulocytes and plasmatocytes. The soldiers showed higher cells and fluorescence intensity about the gardener, garbage, and forage subcastes. On the other hand, with statistically different internal complexity/granularity only about to the cells of the gardener subcaste. Thus, these results indicate that soldiers have a more developed immune system.

The characterization and cellular description of the hemocytes of this species provide new insight for future studies with the aim of better understanding the physiology of this important insect.

Keywords: Ants. Hemocytes. Microscopy. Morphology. Cytometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVO.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Formigas-cortadeiras	17
3.2. Ciclo de vida das formigas-cortadeiras	19
3.3. Hemócitos.....	20
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO I - MORFOLOGIA DOS HEMÓCITOS DAS SUBCASTAS DE OPERÁRIAS DA FORMIGA-CORTADEIRA <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Insetos.....	33
2.2. Medição da cápsula cefálica das formigas	33
2.3. Coleta da hemolinfa.....	33
2.4. Microscopia de luz.....	34
2.5. Microscopia de fluorescência	34
2.6. Microscopia confocal de varredura a laser	34
2.7. Microscopia eletrônica de varredura	35
3. RESULTADOS	36
3.1. Microscopia de luz.....	36
3.2. Microscopia de fluorescência	37
3.3. Microscopia confocal de varredura a laser	37
3.4. Microscopia eletrônica de varredura	37
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO II - PERFIL POPULACIONAL DOS HEMÓCITOS DAS SUBCASTAS DE OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)...	55
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	59

2.1. Insetos	59
2.2. Medição da cápsula cefálica das formigas	59
2.3. Coleta da hemolinfa.....	59
2.4. Contagem diferencial de hemócitos	60
2.5. Contagem total de hemócitos.....	60
2.6. Produção de antissoro policlonal contra hemócitos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	60
2.7. Ensaio de fagocitose e microscopia confocal de varredura a laser	61
2.8. Ensaio de fagocitose e citometria de fluxo.....	61
2.9. Citometria de fluxo da hemolinfa conjugada com FITC.....	62
2.10. Análise Estatística.....	63
3. RESULTADOS	64
3.1. Contagem diferencial dos hemócitos	64
3.2. Contagem total de hemócitos.....	64
3.3. Produção de antissoro policlonal contra hemócitos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	65
3.4. Ensaio de fagocitose por microscopia confocal de varredura a laser	65
3.5. Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo	65
3.6. Citometria de fluxo dos hemócitos conjugados com FITC.....	65
4. DISCUSSÃO.....	73
5. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
APÊNDICE	85

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos não possuem um sistema imunológico complexo como dos vertebrados, no entanto, a maioria apresentam importantes barreiras de proteção estruturais, como o exoesqueleto e a matriz peritrófica, bem como um mecanismo de defesa inato eficiente (AMARAL *et al.*, 2010; CERENIUS, SÖDERHÄLL, 2011; HILLYER, 2016) que desencadeia uma série de respostas contra patógenos invasores no momento em que entram em contato com a hemolinfa, onde circulam células de defesa denominadas hemócitos (ARAÚJO, 2011; CHAPMAN, 1998; HILLYER, 2016; WU *et al.*, 2016).

Diferentes tipos de hemócitos foram identificados em muitos Hymenopteras (COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978; GIANNOTTI, CAETANO, 1985; RICHARDSON *et al.*, 2018; VALENCIA-GIRALDO *et al.*, 2021); entretanto, a maioria dos dados descrevendo a morfologia e as características funcionais dos hemócitos estão em alguns representantes de Lepidoptera e Diptera (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARTEAGA BLANCO *et al.*, 2017; BRAYNER *et al.*, 2007; BRYANT, MICHEL, 2016; VON BREDOW *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2016). Na formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), conhecida popularmente no Brasil como saúva-limão, não existem trabalhos na literatura caracterizando os hemócitos quanto aos aspectos morfológico e funcional.

A formiga *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) é um inseto social que vive em colônia altamente organizada, constituída por conjuntos de indivíduos morfológicamente distintos, que desempenham trabalhos agrupados, especializados em determinada função, denominados de castas. Cada colônia é formada por uma rainha (casta reprodutora) e várias operárias (casta não reprodutora), sendo esta última subdividida nas subcastas jardineira, lixeira, forrageira e soldado, em função do tamanho de sua cápsula cefálica e das tarefas exercidas na colônia em um período de tempo.

O cultivo do fungo simbiote e cuidado da prole dentro do ninho está vinculada as atividades das jardineiras; já as lixeiras, desempenham atividades de higienização do ninho em câmaras específicas e gerenciamento do lixo; as forrageiras, por sua vez, executam o corte de material vegetal em ambiente externo e os transportam para o interior da colônia; e os soldados executam atividades de proteção da colônia e auxiliam as forrageiras fora do ninho (DELLA LUCIA, 1993; WILSON, 1980).

Caracterizar a população de hemócitos circulantes de um inseto é uma ferramenta essencial para melhor compreender as respostas específicas desencadeadas por esses tipos celulares, principalmente nas interações com entomopatógenos (GÁBOR *et al.*, 2020) bem

como conhecer melhor as possibilidades de respostas imunológicas em condições adversas (VILCINSKAS, 2021). Neste contexto, o presente estudo torna-se importante no processo de caracterização dos hemócitos das subcastas operárias da formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa*, assim como para esclarecer alguns aspectos da imunidade celular sob o ponto de vista funcional, sendo relevante na obtenção de informações para os estudos de controle desses insetos.

2. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo caracterizar morfológica e funcionalmente os hemócitos circulantes na hemolinfa de diferentes subcastas de operárias da formiga *A. sexdens rubropilosa*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Formigas-cortadeiras

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) estão situadas em um dos grupos mais abundantes de insetos e importantes em diversos ambientes, pois além de consideradas indicadoras de qualidade ambiental para vários ecossistemas, desempenham função relevante atuando como consumidores primários uma vez que exercem um papel essencial no fluxo de energia, cumprindo assim, uma variedade de funções ecológicas (ROCHA *et al.*, 2015; TRAVAGLINI, 2014).

Myrmicinae é a maior e mais diversificada subfamília de formigas devido ao grande número, variabilidade de espécies e por possuir as espécies com maior grau de complexidade social (CUNHA *et al.*, 2015; CHAVES; CORRÊA NETO; GOMES, 2018; DIEHL; DIEHL-FLEIG; ALBUQUERQUE, 2017; ENDRINGER, 2011; JAIME, 2010). Nessa subfamília, encontram-se as formigas do gênero *Atta* (Attini), conhecidas popularmente como cortadeiras, pois cortam e carregam partes de vegetais frescos de várias espécies para o interior dos ninhos, servindo de substrato e como fonte energética para o desenvolvimento do fungo simbionte que é utilizado como alimento pela colônia (CHAVES; CORRÊA NETO; GOMES, 2018; DIEHL; DIEHL-FLEIG; ALBUQUERQUE, 2017; JAIME, 2010).

O fungo simbionte além de constituir o principal alimento das larvas de formigas Attini, apresenta elevado potencial enzimático (RICHARD *et al.*, 2005), resultado da degradação dos polissacarídeos vegetais do substrato, a exemplo dos açúcares simples advindos dessa hidrólise que podem ser utilizados pelas operárias como alimento (SILVA *et al.*, 2003), revelando que a simbiose desses insetos também envolve uma integração metabólica (RODRIGUES, 2009). Apesar de outros insetos sociais tais como cupins e besouros também cultivarem e se alimentarem de fungos, as formigas Attini apresentam uma simbiose relativamente complexa, que inclui o desenvolvimento de defesas especializadas, uso de secreção de glândulas exócrinas e higiene geral do ninho, bem como o combate a fungos antagonistas através de ação mutualística com bactérias actinomicetos *Pseudonocardia* que produzem metabólitos secundários e inibem especificamente o crescimento do fungo patogênico *Escovopsis* (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE, STUART, 2001; FERNÁNDEZ-MARÍN *et al.*, 2009; MUELLER, GERARDO, 2002; MUELLER *et al.*, 2005).

As formigas-cortadeiras do gênero *Atta*, são nativas do continente americano e estão distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe (SILVA, ROSA, 2017). No Brasil, essas formigas podem ser encontradas em diferentes constituições ambientais, como florestas úmidas ou secas, cerrado, pampa, restinga e caatinga (BRANSTETTER *et al.*, 2017; DELLA LUCIA, 1993; ZANETTI *et al.*, 2002).

Diversas espécies e subespécies taxonômicas dentro do gênero *Atta* são encontradas no Brasil, como *Atta bisphaerica* (Forel, 1908); *Atta capiguara* (Gonçalves, 1944); *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758); *Atta goiana* (Gonçalves, 1942); *Atta laevigata* (Smith, 1858); *Atta opaciceps* (Borgmeier, 1939); *Atta robusta* (Borgmeier, 1939); *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908); *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919); *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758); *Atta silvai* (Gonçalves, 1982) e *Atta vollenweideri* (Forel, 1939) (LOECK; GRÜTZMACHER; STORCH, 2001; MARICONI, 1979; ZANETTI *et al.*, 2002).

A formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa* representa um dos insetos mais importantes sob o ponto de vista econômico, pois além de apresentar ampla ocorrência no Brasil, está entre os herbívoros mais vorazes e de maior variedade alimentar (DELLA LUCIA, 1993; SIMÕES, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2006).

A identificação dos ninhos das formigas-cortadeiras é relativamente fácil uma vez que é possível observar um amontoado de terra solta sobre o solo, que foi descartada durante a construção, assim como pela presença de aberturas denominadas olheiros que são utilizados para movimentação das formigas operárias que saem para forragear (HÖLLDOBLER, WILSON, 2011; ZANETTI, 2007), predominantemente no período noturno (TONHASCA, LIMA BRAGANÇA, 2000). A partir dos olheiros, partem as trilhas de forrageamento, marcadas pelas formigas com feromônios de trilha para guiar ao longo de toda sua extensão até área de interesse, onde elas removem material vegetal e para posterior localização do ninho em meio à vegetação (HÖLLDOBLER, WILSON, 1990).

Os ninhos das formigas-cortadeiras são encontrados no solo, podendo atingir oito metros de profundidade, sendo a maior parte da estrutura localizada abaixo da superfície, tendo a possibilidade de apresentar uma densidade de 1.5 formigueiro/há para *Atta sexdens rubropilosa* (ZANUNCIO *et al.*, 2002), abrigando milhares de indivíduos (AMARAL *et al.*, 2019). Além disso, são classificados em hipogéicos, apresentando diversas câmaras (também chamadas painéis) interligadas por túneis (AUTUORI, 1947; MOREIRA *et al.*, 2004). São por esses túneis e câmaras que as formigas circulam e cultivam seus fungos, que servem de alimento para colônia, passando pelas fases de fundação com vôo nupcial ou revoada,

crescimento onde surgem operárias e ocorre a reprodução de novas fêmeas rainhas e machos, até completar seu ciclo de vida (PAGNOCCA *et al.*, 1990; MOREIRA *et al.*, 2004).

3.2. Ciclo de vida das formigas-cortadeiras

A formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa* é considerada um inseto eussocial, uma vez que apresenta as características de constituir colônias de indivíduos que além de apresentarem cuidado com a prole de maneira cooperativa e sobreposição de gerações no mesmo ninho, apresentam divisão de trabalho entre as castas (WIRTH *et al.*, 2003). Enquanto a fêmea e o macho alados constituem as castas temporárias, a rainha e as operárias estéreis formam as castas permanentes denominadas ápteras. De acordo com as funções que exercem na colônia, as operárias são classificadas em distintas subcastas, denominadas jardineiras, responsáveis pelo cuidado do jardim de fungo e da prole dentro do ninho; lixeiras que gerenciam o lixo e realizam a limpeza do ninho em câmaras específicas; forrageiras que exploram o ambiente externo, cortam e transportam pedaços de folhas para interior do formigueiro; e auxiliam na construção do ninho e soldados, que defendem a colônia e auxiliam as forrageiras fora do ninho (AUTUORI, 1941; DELLA LUCIA, 1993; HÖLLDOBLER, WILSON, 2011; WILSON, 1980).

A divisão de trabalho ocorre de acordo com o tamanho do corpo dos indivíduos que apresentam alto grau de polimorfismo, assim como pelas funções específicas que exercem dentro da colônia e também com a idade (poliestismo etário) ou seja, enquanto as operárias jovens executam as tarefas dentro do ninho, como cuidado com prole e manutenção do ninho; as mais velhas progridem para tarefas externas e saem para forragear (DELLA LUCIA, 1993; ENDRINGER, 2015; JAIME, 2010; TRAVAGLINI, 2014; WILSON, 1980; ZANETTI *et al.*, 2002).

As formigas-cortadeiras são insetos mastigadores se desenvolvem por holometabolia, passando pela fase de ovo, larva, pupa e adultos em um período de aproximadamente 55 dias. Os ovos são elípticos, brancos, medindo aproximadamente 0,5 mm, sendo possível classificá-los como reprodutivos, que são menores e os de alimentação, sendo os maiores. A duração do estágio de ovo não é bem definida, mas pode variar em torno de 22 a 25 dias, sendo que os ovos fertilizados originam formigas fêmeas rainhas e operárias, e os não fertilizados, machos (ZANETTI *et al.*, 2002).

Segundo Jaime (2010) e Zanetti *et al.*, (2002), o ciclo larval inicia-se após a eclosão dos ovos e dura em torno de 20 dias. A larva ápoda e sem olhos como nas formigas em geral,

possui coloração branca, tegumento mole alongado e curvo, apresentando três segmentos torácicos e dez abdominais. Antes da larva se tornar pupa, existe ainda uma fase de pré-pupa, com características semelhantes da larva, no entanto o corpo apresenta-se contraído e rígido, sendo possível observar as pernas e a cabeça aderidas ao corpo quando visualizadas sob o exoesqueleto.

A pupa inicialmente de coloração branca, apresenta cabeça fortemente esculpura, principalmente na região frontal, onde existem várias protuberâncias com muitos espinhos occipitais. Sua coloração vai se tornando escura com passar dos dias, começando pelos olhos e mandíbulas, posteriormente para o resto do corpo, tornando-se adulta 10 dias após a sua formação (JAIME, 2010; ZANETTI *et al.*, 2002). Os indivíduos adultos são identificados morfológicamente pela presença de três pares de espinhos no dorso do tórax (DELLA LUCIA, 1993; ENDRINGER, 2015; JAIME, 2010; TRAVAGLINI, 2014).

Depois da revoada, a fêmea fecundada, em média por seis a oito machos, pousa no solo, remove suas asas e inicia a escavação de um túnel para fundar a nova colônia (MARICONI, 1979). Antes da revoada, a rainha retira uma amostra do fungo da colônia mãe, que é regurgitado no segundo dia depois da escavação. Após colocar os primeiros ovos chamados de tróficos em seu novo ninho, a rainha utiliza parte de suas reservas energéticas para cuidar dos ovos (MARICONI, 1979). A longevidade de uma rainha de saúva pode chegar até 22 anos, em condições de laboratório (PERES FILHO; DORVAL; BERTI FILHO, 2006).

3.3. Hemócitos

Os insetos são encontrados amplamente distribuídos em diversos ecossistemas. Um dos fatores essenciais para explicar o sucesso de sobrevivência da maioria dos insetos em distintos ambientes e até mesmo nos mais impróprios é a presença de barreiras de proteção estruturais como o exoesqueleto, que reveste todo exterior do inseto; a matriz peritrófica, caracterizada por uma membrana semipermeável e constituída por uma mistura de quitina, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos, que geralmente recobre o epitélio intestinal médio, assim como de um complexo sistema imunológico inato, responsável pela defesa imune dos insetos (CHAPMAN, 1998; HILLYER, 2016; GULLAN, CRANSTON, 2017; LEHANE, BILLINGSLEY, 1996; LEHANE, 1997; TRIPLEHORN, JOHNSON, 2015).

O sistema imunológico inato dos insetos abrange desde a resposta imune humoral, que envolve os processos de coagulação e melanização, resultantes da ação de proteínas presentes

na hemolinfa; assim como a resposta imune celular, que está relacionada diretamente com as células de defesa denominadas hemócitos, que desempenham o reconhecimento e eliminação de uma grande variedade de corpos estranhos, através dos processos fundamentais como a fagocitose, nodulação e encapsulação (CHAPMAN, 1998; GARCIA-LARA *et al.*, 2005; LAVINE, STRAND, 2002; SCHMIDT; THEOPOLD; STRAND, 2001; TRIPLEHORN, JOHNSON, 2015).

Os hemócitos são células nucleadas que surgem durante a embriogênese a partir da mesoderme, porém, nos estágios posteriores ao período embrionário, os hemócitos derivam de órgãos hematopoiéticos ou divisões celulares, havendo diferenciação destas células na hemolinfa, onde a maioria circula livremente, sendo denominados hemócitos circulantes. Um número significativo também está associado aos tecidos, como parede torácica e abdominal, superfícies de órgãos internos como o corpo gorduroso, intestino, sistema digestivo ou vaso dorsal, sendo classificados como hemócitos sésseis (CRUZ-LANDIM, 2009; HILLYER, 2015, 2016; KING, HILLYER, 2013; STRAND, 2008a).

Os hemócitos com maior frequência nos insetos são os pró-hemócitos, os quais sugerem dar origem a outros hemócitos, como plasmatócitos e granulócitos que, possivelmente, são as células responsáveis pela defesa celular (STRAND, 2008b). Em alguns grupos de insetos, como abelhas, larva de coleópteras, mosquitos dípteras, pupas e larvas de lepidópteras, foram observadas populações menores de outros hemócitos, incluindo oenocitóides, esferulócitos, adipohemócitos e coagulócitos, com funções pouco conhecidas (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO, 2011; BRYANT, MICHEL, 2016; CASTILLO *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2015; PERVEEN, AHMAD, 2017; SEZER, OZALP, 2015; WU *et al.*, 2016). Em larvas de Lepidoptera foi encontrado adicionalmente o tipo de hemócito vermiforme (NUNES, 2001; SEZER, OZALP, 2015; WU *et al.*, 2016).

Diferentes insetos estudados apresentam comportamentos de defesa, a exemplo dos adultos de formigas *Atta cephalotes*, que em respostas de encapsulamento e atividade antimicrobiana da hemolinfa na presença ou ausência de microbiota bacteriana (VALENCIA-GIRALDO *et al.*, 2021); abelhas *Apis mellifera* que contêm uma alta concentração de hemócitos nas pupas ao longo do seu desenvolvimento (GÄTSCHENBERGER *et al.*, 2013); larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) que produzem hemócitos capazes de liberar conteúdo de cromatina e grânulos tóxicos que, juntamente com a coagulação da hemolinfa e a melanização, provavelmente contribuem para a imobilização e morte das bactérias (CHEN, KEDDIE, 2021).

A função de cada hemócito ainda não está totalmente esclarecida, mas de maneira geral, são responsáveis pelos processos fundamentais de defesa imunológica, como a fagocitose, nodulação e encapsulação (DUDZIC *et al.*, 2015; HONTI *et al.*, 2014) no momento em que alguns patógenos como bactérias, vírus e protozoários conseguem invadir a hemocele (cavidade do corpo) dos insetos (LAVINE, STRAND, 2002). Essa perspectiva se torna mais importante a ser avaliada se considerado a possibilidade dos impactos da alta variação térmica global em decorrência das mudanças climáticas com variações significativas de temperatura, sobre o número de hemócitos circulantes em diferentes espécies (BUTOLO *et al.*, 2021; HANSEN *et al.*, 2006).

A fagocitose é um processo de resposta celular primária na defesa, que ocorre quando os hemócitos livres na hemolinfa migram para o local da infecção (MEYER-FERNANDES *et al.*, 2000), reconhecem os invasores por receptores presentes nesses agentes e formam pseudópodos, seguidos pela ingestão dessas partículas estranhas para dentro de um fagossomo ligado a membrana, que posteriormente se funde com o lisossomo para degradação enzimática (KLOWDEN, PALLI, 2022). Quando a concentração de patógenos é elevada, não sendo possível o processo de fagocitose, muitos hemócitos se agrupam e formam nódulos com finalidade de imobilizar e remover os invasores da circulação (FERNANDES, 2010; KLOWDEN, PALLI, 2022; LAVINE, STRAND, 2002). Em casos específicos, pode ocorrer o encapsulamento de grandes patógenos não susceptíveis a ação fagocítica e nem serem isolados em nódulos, a exemplo de ovos e larvas de endoparasitóides, que são depositados na hemocele, podendo formar cápsulas ao redor do invasor, constituídas por múltiplas camadas de hemócitos, que previnem contato desses agentes com outras células do inseto e inibem o acesso a fontes de oxigênio assim como de nutrição (ARAÚJO, 2011; HILLYER, 2016).

Nesse contexto, a nodulação e a encapsulação caracterizam-se como dois mecanismos de defesa muito semelhantes e, nestas concepções, muitas vezes são difíceis de serem distinguidos, pois enquanto na encapsulação celular ocorre sobreposição de diversas camadas de hemócitos circundando o agente invasor e originando uma cápsula multicelular hemocítica; nos nódulos observa-se apenas um agrupamento de hemócitos ao redor do agente invasor, podendo evoluir naturalmente na encapsulação (ARAÚJO, 2011; DE NEGREIRO; DE ANDRADE; FALLEIROS, 2004; DUBOVSKIY *et al.*, 2016; FARALDO, LELLO, 2003; NUNES, 2001).

REFERÊNCIAS

- AMARAL, I. M.; MOREIRA NETO, J. F.; PEREIRA, G. B.; FRANCO, M. B.; BELETTI, M. E.; KERR, W. E.; BONETTI, A. M.; UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. **Micron**, v. 41, n. 2, p. 123 - 129, 2010.
- AMARAL, K. D.; GANDRA, L. C.; DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, D. J.; DELLA LUCIA, T. M. Effect of azadirachtin on mortality and immune response of leaf-cutting ants. **Ecotoxicology**, v. 28, p. 1190 - 1197, 2019.
- ARAÚJO H. R. C.; CAVALCANTI M. G. S.; SANTOS S. S.; ALVES L. C. BRAYNER F. A. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**, v. 39, p. 184 - 189, 2008.
- ARAÚJO, H. R. C. **Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos de *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue vírus**. 2011. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Área de concentração em Biologia Celular e Molecular; Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, 2011.
- ARTEAGA BLANCO, L. A.; CRISPIM, J. S.; FERNANDES, K. M.; DE OLIVEIRA, L. L.; PEREIRA, M. F.; BAZZOLLI, D. M. S.; MARTINS, G. F. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell Tissue Res**, v. 370, p. 153 - 168, 2017.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. Hymenoptera, Formicidae). I - Evolução do saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197 - 228, 1941.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera: Formicidae): IV – O saúveiro depois da primeira revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 18, p. 39 - 70, 1947.
- BRANSTETTER, M. G.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD; M. W.; FAIRCLOTH; B. C.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society Biological**, v. 284, n. 1852, 2017.
- BRAYNER, F. A.; ARAÚJO, H. R.; SANTOS, S. S.; CAVALCANTI, M. G.; ALVES, L. C.; SOUZA, J. R.; PEIXOTO, C. A. Hemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 112 - 120, 2007.
- BRYANT, W. B.; MICHEL, K. *Anopheles gambiae* hemocytes exhibit transient states of activation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 119 - 129, 2016.
- BUTOLO, N. P.; AZEVEDO; P.; ALENCAR, L. D.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Impact of low temperatures on the immune system of honeybees. **Journal of Thermal Biology**, v. 101, p. 103082, 2021.

CASTILLO, J. C.; FERREIRA, A. B. B.; TRISNADI, N.; BARILLAS-MURY, C. Activation of mosquito complement antiplasmodial response requires cellular immunity. **Science Immunology**, v. 2, n. 7, 2017.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Coagulation in invertebrates. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 1, p. 3 - 8, 2011.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4^a ed. Cambridge Harvard University Press, Cambridge, 1998. 788 p.

CHAVES, E.; CORRÊA NETO, J. J.; GOMES, L. Ocorrência de formigas do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) na região norte do Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 19, n. 1, 2018.

CHEN, R. Y.; KEDDIE, B. A. *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) hemocytes release extracellular traps that confer protection against bacterial infection in the hemocoel. **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 6, p. 17, 2021.

COSTA LEONARDO, A. M.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo das células do sangue de *Camponotus rufipes* (Fabricius) (Hymenoptera Formicidae). **Studia Ent.**, v. 20, p. 235 - 251, 1978.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p.

CUNHA, D. A. DA S.; SILVA, R. DE S.; ANTONIO, D. S.; MICHELUTTI, K. B.; BARBOSA, V. DE M.; JUNIOR, W. F. A. Análise cladística de dez gêneros da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). **Anais do Enic**, n. 6, 2015. Disponível em: <https://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/2242>. Acesso em: 21 nov. 2022.

CURRIE C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7998 - 8002, 1999.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1471, p. 1033 - 1039, 2001.

DE NEGREIRO, M. C. C. DE; DE ANDRADE, F. G.; FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, 299 - 313, 2004.

DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas-cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. 262 p.

DIEHL, E.; DIEHL-FLEIG, E.; ALBUQUERQUE, E. Z. Occurrence of Attini (Formicidae) in two geomorphological provinces of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura**, v. 92, n. 1, p. 66 - 74, 2017.

DUBOVSKIY, I. M.; KRYUKOVA, N. A.; GLUPOV, V. V.; RATCLIFFE, N. A. Encapsulation and nodulation in insects. **Invertebrate Survival Journal**, v. 13, p. 229 - 246, 2016.

DUDZIC, J. P.; KONDO, S.; UEDA, R.; BERGMAN, C. M.; LEMAITRE, B. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. **BMC Biol.**, v. 13, p. 1 - 16, 2015.

ENDRINGER, F. B. **Comportamento de forrageamento da formiga *Atta robusta* Borgmeier 1939 (Hymenoptera:Formicidae).** 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Curso de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Departamento de Proteção de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2011.

ENDRINGER, F. B. **Ecologia e forrageamento da formiga-cortadeira *Atta robusta* (Borgmeier, 1939).** 2015. 102 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

FARALDO, A. C.; LELLO, E. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera, Cuterebridae) larval hemocytes. **Biocell**, v.27, n.2, p.197 - 203, 2003.

FERNANDES, E. G. **Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): imunologia, interação patógenos-hospedeiro, fisiologia e controle biológico.** 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; NASH, D. R.; BOOMSMA, J. J.; WCISLO, W. T. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1665, p. 2263 - 2269, 2009.

GÁBOR, E.; CINEGE, G.; CSORDÁS, G.; RUSVAI, M.; HONTI, V.; KOLICS, B.; TÖRÖK, T.; WILLIAMS, M. J.; KURUCZ, É.; ANDÓ, I. Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 109, p. 103701, 2020.

GARCIA-LARA, J.; NEEDHAM, A. J.; FOSTER, S. J. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 311 - 323, 2005.

GÄTSCHENBERGER, H; AZZAMI, K.; TAUTZ, J.; BEIER, H.. Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and environmental risks. **PLoS ONE**, v.8, n. 6, p. e66415, 2013.

GIANNOTTI, E.; CAETANO, F. H. A comparative study of the hemocytes of *Atta laevigata* adults (Formicidae: Myrmicinae). **Revista Brasileira de Genética**. v. 8, n. 1, p. 37 - 45, 1985.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: Fundamentos da entomologia**. 5ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2017.

HANSEN, J.; SATO, M.; RUEDY, R.; LO, K.; LEA, D. W.; MEDINA-ELIZADE, M. Global temperature change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14288 - 14293, 2006.

HILLYER, J. F. Integrated immune and cardiovascular function in Pancrustacea: lessons from the insects. **Integrative and Comparative Biology**, v. 55, n. 5, p. 843-855, 2015.

HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, p. 102 - 118, 2016.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON E. O. **The Ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. p. 596 - 608.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Leafcutter Ants: Civilization by Instinct**. New York: W.W. Norton and Company, 2011.

HONTI, V.; CSORDÁS, G.; KURUCZ, É.; MÁRKUS, R.; ANDÓ, I. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n.1, p. 47 - 56, 2014.

HWANG, S.; BANG, K.; LEE, J.; CHO, S. Circulating hemocytes from larvae of the japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128519, 2015.

JAIME, N. G. **Levantamentos mirmecofaunísticos em três ambientes antrópicos nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Área de concentração em Produção Vegetal. Goiânia, 2010.

KING, J. G.; HILLYER, J. F. Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. **BMC Biology**, v. 11, p. 1 - 15, 2013.

KLOWDEN, M. J.; PALLI, S. R. Chapter 7 - Circulatory systems. In: **Physiological systems in insects**. 4ª ed. San Diego, California: Academic Press, 2022. p. 359 - 407.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1295 - 1309, 2002.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1ª ed., 1996, p. 86 - 114.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n.1, p. 525-550, 1997.

LOECK, A. E.; GRÜTZMACHER, D.; STORCH, G. Distribuição geográfica de *Atta sexdens piriventris* Santschi, 1919, nas principais regiões agropecuárias do Estado do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 1, 2001.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. Circular Técnica, nº. 77. Piracicaba: IPEF, 1979. 7 p.

MEYER-FERNANDES, J. R.; LANZ-MENDOZA, H.; GONDIM, K. C.; WILLOTT, E.; WELLS, M. A. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larvae *Manduca sexta*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n.1, p.152 - 159, 2000.

MOREIRA, A. A.; FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C.; ANDRADE, A. P. P.; LOPES, J. F. S.; RAMOS, V. M. External and internal structure of *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera, Formicidae) nests. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n.3, p. 204 - 2011, 2004.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. M. Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 99, n. 24, p. 15247-15249, 2002.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. M.; AANEN, D. K.; SIX, D. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 36, p. 563-595, 2005.

NUNES, C. C. C. **Caracterização citoquímica e ultraestrutural dos hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitada pela vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

PAGNOCCA, F. C.; DA SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, n. 3, p.349 - 352, 1990.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. **A entomofauna associada à Teca, *Tectona grandis* L. f. (Verbenaceae), no Estado de Mato Grosso**. Piracicaba: IPEF, 2006. 58 p.

PERVEEN, N.; AHMAD, M. Toxicity of some insecticides to the haemocytes of giant honeybee, *Apis dorsata* F. under laboratory conditions. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 5, p. 1016 - 1022, 2017.

RICHARD, F. J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. Digestive capabilities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B.**, v. 175, p. 297 - 303, 2005.

RICHARDSON, R.; BALLINGER, M. N.; QIAN, F.; CHRISTMAN, J. W.; JOHNSON, R. M. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. **Apidologie**, v. 49, p. 397 - 410, 2018.

ROCHA, W. D. O.; DORVAL, A.; PERES FILHO, O.; VAEZ, C. D. A.; RIBEIRO, E. S. Ants (Hymenoptera: Formicidae) as Bioindicators of Environmental Degradation in Poxoréu, Mato Grosso, Brazil. **Floresta e Ambiente**, v. 22, p. 88 - 98, 2015.

RODRIGUES, A. **O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas Attini (hymenoptera: formicidae)**. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Área de concentração em Microbiologia Aplicada., Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Rio Claro, 2009.

SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U.; STRAND, M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. **BioEssays**, v. 23, n. 4, p. 344 - 351, 2001.

SEZER, B.; OZALP, P. Effects of pyriproxyfen on hemocyte count and morphology of *Galleria mellonella*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 2a, p. 621 - 625, 2015.

SILVA, A.; BACCI JUNIOR, M.; DE SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307 - 313, 2003.

SILVA, B. L. **Controle da formiga-cortadeira (*Atta sexdens rubropilosa*) em agricultura orgânica no bioma Cerrado**. 2017. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SIMÕES, M. F. S. **Validação de sistema de amostragem para monitoramento de formigas-cortadeiras *Atta spp.* (Hymenoptera: formicidae) em plantações de eucalipto**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014.

STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Immunology**, v. 32, p. 25 - 47, 2008a.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1 - 14, 2008b.

TONHASCA, A.; LIMA BRAGANÇA, M. A. Forager size of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) in a mature eucalyptus forest in Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 48, n. 4, p. 983 - 988, 2000.

TRAVAGLINI, R. V. **Determinação das estratégias coletivas de forrageamento em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração em Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 2014.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos Insetos**. 2ª ed. brasileira. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 766 p.

VALENCIA-GIRALDO, S. M.; NIÑO-CASTRO, A.; LÓPEZ-PEÑA, A.; TREJOS-VIDAL, D.; CORREA-BUENO, O.; MONTOYA-LERMA, J. Immunity and survival response of *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers to *Metarhizium anisopliae* infection: Potential role of their associated microbiota. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0247545, 2021.

VASCONCELOS, H. L.; VIEIRA-NETO, E. H.; MUNDIM, F. M.; BRUNA, E. M. Roads alter the colonization dynamics of a keystone herbivore in neotropical savannas. **Biotropica**, v. 38, n.5, p. 661 - 665, 2006.

VILCINSKAS, A. Mechanisms of transgenerational immune priming in insects. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 124, p.104205, 2021.

VON BREDOW, Y. M.; MÜLLER, A.; POPP, P. F.; ILIASOV, D.; VON BREDOW, C. R. Characterization and mode of action analysis of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larva-derived hemocytes. **Insect Science**, v. 29, n. 4, p. 1071 - 1095, 2022.

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

WIRTH, R.; HERZ, H.; RYEL, R. J.; BEYSCHLAG, W.; HÖLLDOBLER, B. **Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta collombica* in the tropical rainforest of Panamá.** Ecological Studies Series, Springer-Verlag, New York-Heidelberg, v. 164, 2003. 230 p.

WU, G.; LIU, Y.; DING, Y.; YI, Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue and Cell**, v. 48, n. 4, p. 297 - 304, 2016.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, A.; SOUZA-SILVA, A.; GODOY, M. S. **Manejo integrado de formigas-cortadeiras.** Lavras, Minas Gerais: Ed. UFLA, 2002. 16 p.

ZANETTI, R. **Manejo integrado de formigas-cortadeiras e cupins em áreas de eucalipto da Cenibra.** Laudo Técnico FSC - Cenibra, Lavras - Minas Gerais, 2007. 74 p.

ZANUNCIO, J. C. ; LOPES, E. T.; ZANETTI, R.; PRATISSOLI, D.; COUTO, L. Spatial distribution of nests of the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in plantations of *Eucalyptus urophylla* in Brazil. **Sociobiology**, v. 39, n. 2, p. 231 - 242, 2002.

**CAPÍTULO I - MORFOLOGIA DOS HEMÓCITOS DAS SUBCASTAS DE
OPERÁRIAS DA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens rubropilosa*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

RESUMO

Os hemócitos são células presentes na hemolinfa das formigas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), que atuam no combate de patógenos invasores, garantindo a defesa do sistema imune desses insetos sociais. As formigas do gênero *Atta* apresentam importância ambiental e econômica, formando colônias altamente organizadas, constituídas pelas castas rainha e operárias, sendo esta última subdividida nas subcastas jardineira, que desempenham o cultivo do fungo simbiote e cuidados da prole; as lixeiras que gerenciam o lixo e higienizam o ninho; as forrageiras que auxiliam na construção do ninho e executam o corte e transporte de folhas para o interior do ninho; e os soldados que realizam a proteção da colônia e auxiliam as forrageiras. O presente trabalho tem como objetivo, caracterizar a morfologia dos hemócitos das subcastas de operárias da formiga saúva-limão. Foram realizadas medição da cápsula cefálica, microscopia de luz e fluorescência, confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura. De acordo com o comportamento observado no ninho e o tamanho da cápsula cefálica, as quatro subcastas da formiga foram confirmadas. Dois tipos de cromatina foram evidenciadas, a eucromatina e heterocromatina, sendo a primeira predominante na amostra. Cinco tipos morfológicos de hemócitos foram identificados na hemolinfa de cada subcasta da formiga, incluindo pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e predominantemente os granulócitos. Provavelmente esse fator pode estar envolvido com a renovação tecidual, transporte de diversas substâncias como hormônios ou principalmente com a imunidade, através da função de defesa, que essas células exercem contra patógenos.

Palavras-chave: Formiga. Soldado. Hemolinfa. Granulócito. Microscopia.

1. INTRODUÇÃO

Os hemócitos são as principais células de defesa dos insetos, sendo os pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e esferulócitos os tipos celulares encontrados com maior frequência na hemolinfa desses invertebrados (CASTILLO; ROBERTSON; STRAND, 2006; LAVINE, STRAND, 2002; RIBEIRO, BREHÉLIN, 2006; STRAND, 2008). Essas células de defesa podem apresentar variações em relação ao tipo, a função e densidade entre as diferentes classes de insetos (LAVINE, STRAND, 2002; STRAND, 2008), assim como dentro da mesma espécie, onde a densidade pode variar em razão do estágio de desenvolvimento, sexo, casta (insetos sociais) ou em resposta a estresse, lesão ou infecção (BRAYNER *et al.*, 2007; SHARMA; SAXENA, SHARMA, 2008).

Na literatura existe diversidade de informações sobre os hemócitos de insetos, como Blattaria, Coleoptera e Hemiptera (ARTEAGA BLANCO *et al.*, 2017; BRAYNER *et al.*, 2005; BRAYNER *et al.*, 2007; BRYANT, MICHEL, 2016; CASTILLO; ROBERTSON; STRAND, 2006; GIGLIO *et al.*, 2008; SEZER, OZALP, 2015; WU *et al.*, 2016), destacando alguns importantes, como o mosquito *Aedes aegypti* (ARAÚJO *et al.*, 2008) e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Diptera) (EVANS; HARTENSTEIN; BANERJEE, 2003; LANOT *et al.*, 2001) e o bicho da seda *Bombyx mori* (Lepidoptera) (LING *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2013), considerados modelos de estudo. No entanto, ainda são limitados os dados disponíveis sobre hemócitos de Hymenoptera, principalmente dos sociais, a exemplo das formigas *Atta cephalotes* (VALENCIA-GIRALDO *et al.*, 2021); das abelhas (CRUZ-LANDIM, 2001; GÁBOR *et al.*, 2020) e vespas (MANFREDINI; DALLAI; OTTAVIANI, 2008).

A formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) é um inseto social que apresenta duas castas permanentes: a casta reprodutiva (a rainha) e a casta estéril (operárias). As operárias apresentam subcastas de acordo com o tamanho e a tarefa que exercem na colônia, sendo denominadas como jardineira, lixeira, forrageira e soldado. As jardineiras cultivam o fungo e cuidam da prole dentro do ninho; lixeiras gerenciam o lixo e realizam a limpeza do ninho em câmaras específicas; forrageiras exploram o ambiente externo, cortam e transportam pedaços de folhas para interior do formigueiro, assim como constroem o ninho; soldados defendem a colônia e auxiliam as forrageiras fora do ninho (DELLA LUCIA, 1993; WILSON, 1980).

Embora exista estudo recente sobre hemócitos da formiga *Atta cephalotes* (VALENCIA-GIRALDO *et al.*, 2021), no caso da formiga *A. sexdens rubropilosa* são ainda

mais escassas as informações de trabalhos que caracterizam os hemócitos sob aspectos morfológico e funcional, dificultando o entendimento sobre a concepção de defesa e de atuação desses organismos, uma vez que estão envolvidos em processos ecológicos significativos, como regeneração de florestas e também associados aos danos que causam à agricultura e silvicultura, apresentando, assim, elevada importância ecológica e econômica (COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978; ENDRINGER, 2011; GIANNOTTI, CAETANO, 1985; JAIME, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008; TRAVAGLINI, 2014).

A morfologia e função dos hemócitos em formigas podem apresentar diferenciação de acordo com a subcasta, condição que foi observada no interior dos ovariolos das rainhas e operárias de abelhas, onde os hemócitos são morfológicamente diferentes em ambas as castas, sugerindo uma ação na produção da túnica própria nos ovários das rainhas, enquanto nas operárias desempenham atividade fagocítica. No entanto, em ambas as castas, os hemócitos presentes no tecido intersticial das gônadas possuem atividade fagocítica e podem ser responsáveis pela formação do ovário durante a metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2001).

O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização da morfologia dos hemócitos circulantes na hemolinfa das diferentes subcastas de operárias da formiga *A. sexdens rubropilosa*, com a finalidade de esclarecer aspectos da imunidade celular desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Operárias da formiga *A. sexdens rubropilosa*, como as jardineiras, lixeiras e forrageiras, foram obtidas em ninhos mantidos em laboratório no Insetário/Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e os soldados foram coletados sobre as trilhas de ninhos situados no campus da UFV, Viçosa – MG. As formigas foram transferidas para recipientes plásticos apropriados, esterilizados e identificados por subcasta, sendo encaminhados para o Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento da Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram realizados os experimentos.

2.2. Medição da cápsula cefálica das formigas

As informações morfológicas para identificar e confirmar às subcastas, foram realizadas por meio das medidas de cápsulas cefálicas (n = 10 de cada subcasta), caracterizada pela maior largura da cabeça em face ventral e em ângulo reto com o eixo longitudinal da cabeça, conforme destacado por Wilson (1980). A medida foi realizada através de uma ocular micrométrica acoplada ao microscópio estereoscópico STEMI 2000 C722 ZEISS, no Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento da Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

De acordo com a medida da largura da cápsula cefálica, as jardineiras, que cultivavam o fungo e cuidavam da prole, possuem cápsula cefálica no intervalo de 3,6 a 4,5mm; lixeiras, que gerenciavam o lixo e realizavam a limpeza do ninho, medem 4,7 a 5,8mm; forrageiras, que exploravam, cortavam e transportavam folhas para o interior do ninho, de 5,9 a 6,5 mm; e os soldados que defendiam a colônia e auxiliavam as forrageiras fora do ninho, entre 6,6 a 6,85 mm.

2.3. Coleta da hemolinfa

As formigas operárias (n = 10 de cada subcasta) foram anestesiadas com Clorofórmio - PA (98%, CAS 67-66-3, Dinâmica, São Paulo) até cessarem seus movimentos (IBRAHIM, 2020), sendo a hemolinfa extravasada de ambas as partes, da cabeça, assim como do corpo, coletadas com auxílio de microcapilar de vidro Drumond Microcaps[®] (Merck, São Paulo).

2.4. Microscopia de luz

Em lâminas de vidro, previamente identificadas, contendo uma gota de anticoagulante tampão citrato de sódio 98mM NaOH; 186 mM NaCl; 17 mM EDTA e 41 mM ácido cítrico, pH 4,5 (SÖDERHÄLL, SMITH,1983), foi adicionada a hemolinfa das formigas operárias de cada subcasta, sendo posteriormente mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para aderência das células e secagem das lâminas.

O processo de coloração do material coletado foi realizado pelo método de Giemsa (KIERNAN, 2008) por 10 minutos, sendo depois rapidamente lavadas com água destilada. Além da coloração por Giemsa, algumas amostras foram coradas com azul de toluidina 1% em tampão borato de sódio durante 1 minuto e, posteriormente, lavadas com água corrente com fluxo suave para remoção do resíduo (AMARAL *et al.*, 2010). Posteriormente, o material foi seco à temperatura ambiente por 30 minutos, montadas sob uma lamínula com sacarose 50%, sendo analisadas em microscópio de luz de campo claro (Olympus BX-60) e fotografadas usando uma câmera Olympus QColor3.

Para cada subcasta de formigas, foram analisadas cinco lâminas com um pool de hemolinfa de 10 indivíduos.

2.5. Microscopia de fluorescência

A solução tampão citrato anticoagulante junto com a hemolinfa das formigas operárias de cada subcasta foi adicionada em lâminas de vidro, previamente identificadas e, posteriormente, mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para secagem. As amostras foram coradas com 10 µg/mL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), protegidas da luz e, após 20 minutos, foram lavadas rapidamente em água corrente e dispostas em um recipiente protegido da luz para secagem. Em seguida, foram montadas com sacarose 50% e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX60, equipado com câmera colorida e monocromática) com filtro para DAPI.

2.6. Microscopia confocal de varredura a laser

As lâminas de vidro, previamente identificadas de acordo com a subcasta, contendo uma gota de fixador paraformaldeído 4%, receberam a hemolinfa das formigas operárias de cada subcasta e, posteriormente, procedeu-se a secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,4 e, na sequência,

foram incubadas em Faloidina-FITC (Sigma Aldrich, Brasil) 1:500 por 30 minutos, ao abrigo da luz, sendo lavadas por três vezes em PBS, por cinco minutos cada. O material foi montado entre lâmina e lamínula com Mowiol e as imagens foram obtidas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss LSM510 META, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.7. Microscopia eletrônica de varredura

A hemolinfa das formigas operárias de cada subcasta foi depositada diretamente em lamínulas de vidro redondas com tampão citrato anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 30 minutos, sendo lavadas em seguida no mesmo tampão duas vezes por 10 minutos cada, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, à temperatura ambiente e protegidos da luminosidade por 1 hora, lavadas novamente no tampão por três vezes durante 10 minutos cada. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 99%) e levadas ao secador de ponto crítico, sendo posteriormente as lamínulas montadas sobre suporte de alumínio, metalizadas com ouro (20 nm) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS

3.1. Microscopia de luz

Não foram observadas diferenças dos tipos de hemócitos entre as subcastas. Cinco tipos morfológicos de hemócitos foram evidenciados na hemolinfa de cada subcasta de operárias da formiga *A. sexdens rubropilosa*, identificados como pró-hemócitos (Figura 1A), oenocitóides (Figura 1B), esferulócitos (Figura 1C), granulócitos (Figura 1D) e plasmatócitos (Figura 1E), sendo encontrados em todas as amostras analisadas., com predomínio dos granulócitos.

Os pró-hemócitos foram as células que apresentaram menor tamanho na hemolinfa da formiga, medindo de 6 a 7 μm de diâmetro, apresentando geralmente perfil esférico, com núcleo grande, localizado centralmente, ocupando praticamente maior parte da célula, cuja superfície é lisa e homogênea, não exibindo granulações ou projeções. Após coloração com Giemsa, o citoplasma evidenciou coloração levemente basofílica, que foi mais intensa no núcleo (Figura 1A).

Os oenocitóides encontrados na hemolinfa de todas as subcastas da formiga *A. sexdens rubropilosa* apresentaram formato oval, com tamanhos médios a grandes, de 14 a 16 μm de diâmetro, com núcleo pequeno, geralmente excêntrico (Figura 1B).

Os esferulócitos são células grandes com 13 a 17 μm de diâmetro, ovais, sem ou com presença de alguns vacúolos e esférulas, que podem apresentar diferentes colorações e até mesmo encobrir o núcleo que se mostra arredondado, deslocado do centro (excêntrico) e pequeno em relação ao tamanho celular (Figura 1C).

Os granulócitos apresentaram-se redondos, medindo em torno de 12 a 14 μm de diâmetro, assim como seu núcleo, geralmente excêntrico. Muitos granulócitos apresentaram o citoplasma repleto de grânulos densos de tamanhos variados, muitas vezes mascarando o núcleo e a superfície celular irregular, devido a presença de pseudópodes (Figura 1D).

Os plasmatócitos mediram cerca de 6 a 10 μm de comprimento, sendo bastante polimórficos, observados geralmente no formato fusiforme (lua crescente) (Figura 1E); alguns apresentando a superfície irregular em função da presença de filopódios (Figuras 1F). O núcleo geralmente acompanha o formato da célula, localizado centralmente e seu citoplasma pode apresentar poucos grânulos, sendo pouco basófilo.

3.2. Microscopia de fluorescência

Todas as subcastas apresentaram núcleos interfásicos, com distintos tamanhos e aspectos da cromatina, apresentando regiões predominantemente eucromáticas (Figura 2A), assim como heterocromáticas (Figura 2B).

A microscopia de fluorescência revelou hemócitos com características morfológicas de apoptose. Estas células exibiram condensação e retração do citoplasma (Figura 2 C).

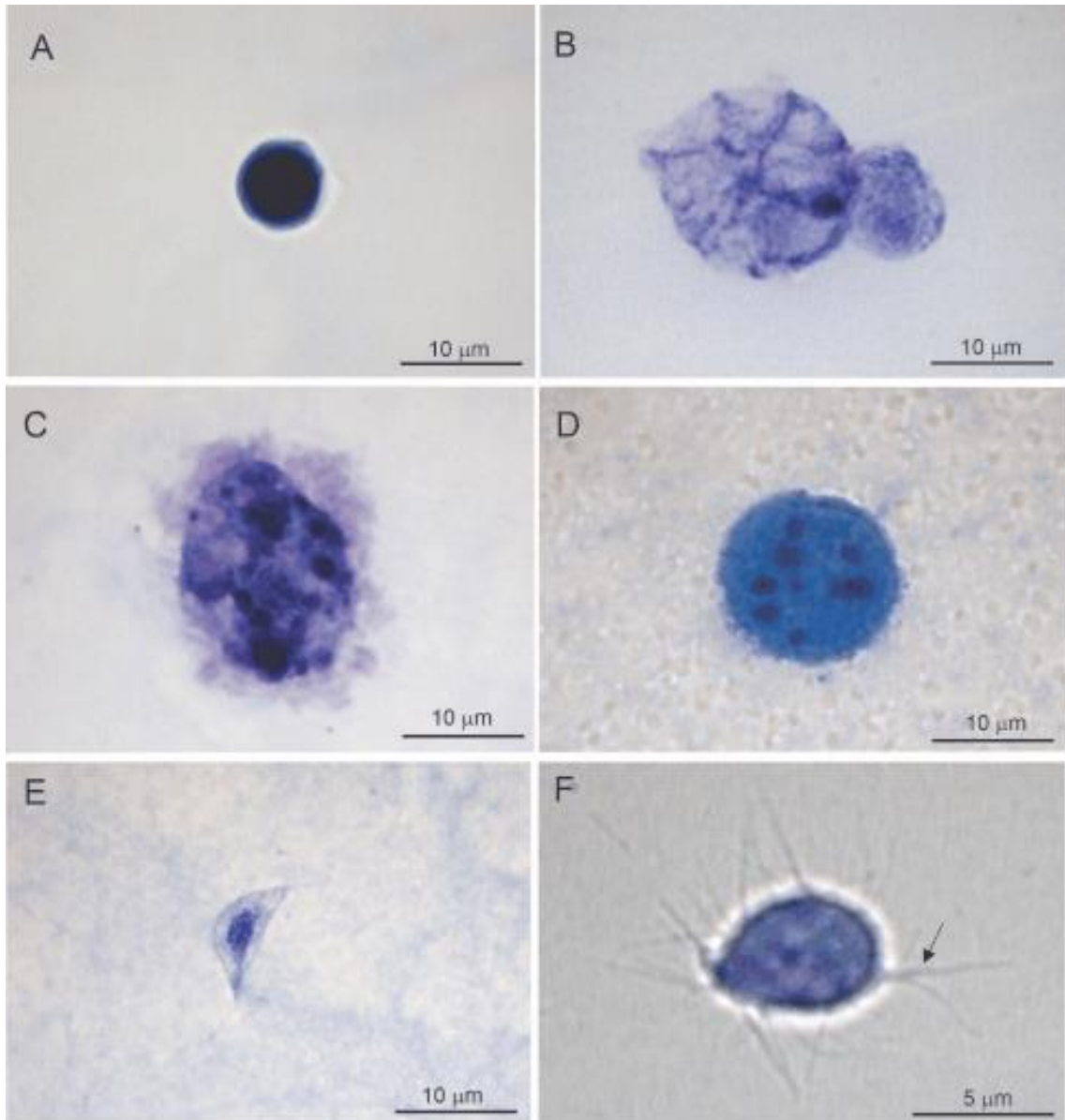
3.3. Microscopia confocal de varredura a laser

Os pró-hemócitos são células esféricas (Figura 3A); os oenocitóides são de tamanho entre médio, geralmente de formatos ovais (Figura 3B); os esferulócitos são células médias/grandes, ovais (Figura 3C); os plasmatócitos apresentaram morfologia característica, sendo de formato fusiforme (Figura 3D) e os granulócitos são células grandes e arredondadas (Figura 3E).

3.4. Microscopia eletrônica de varredura

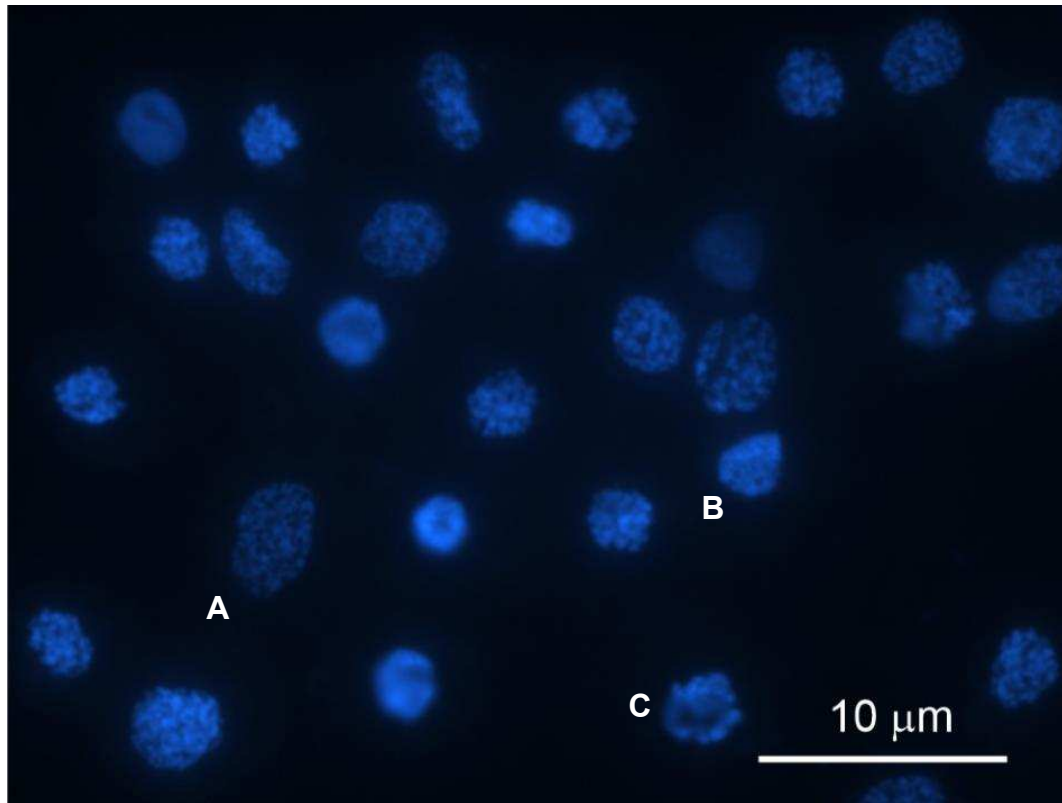
Os pró-hemócitos são células esféricas que podem ser identificadas pelo pequeno tamanho, com superfície uniforme (Figura 4A); os oenocitóides são células de tamanho médio/grande, ovais e com superfície lisa (Figura 4B); os esferulócitos são geralmente células médias/grandes, ovais e apresentam superfície irregular devido à presença de esférulas (Figura 4C); os plasmatócitos possuem características típicas, em formato fusiforme, apresentam pequenos grânulos aderidos na superfície (Figura 4D); e os granulócitos de formato arredondado, evidenciaram superfície repleta de protuberâncias semelhantes a grânulos (Figura 4E).

Figura 1 - Micrografia de luz de hemócitos circulantes na hemolinfa das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* corados com Giemsa (A, D e F) e azul de toluidina (B, C e E). (A) pró-hemócito; (B) oenocitóide; (C) esferulócito; (D) granulócito; (E) plasmatócito; (F) filopódios dos plasmatócitos (seta).



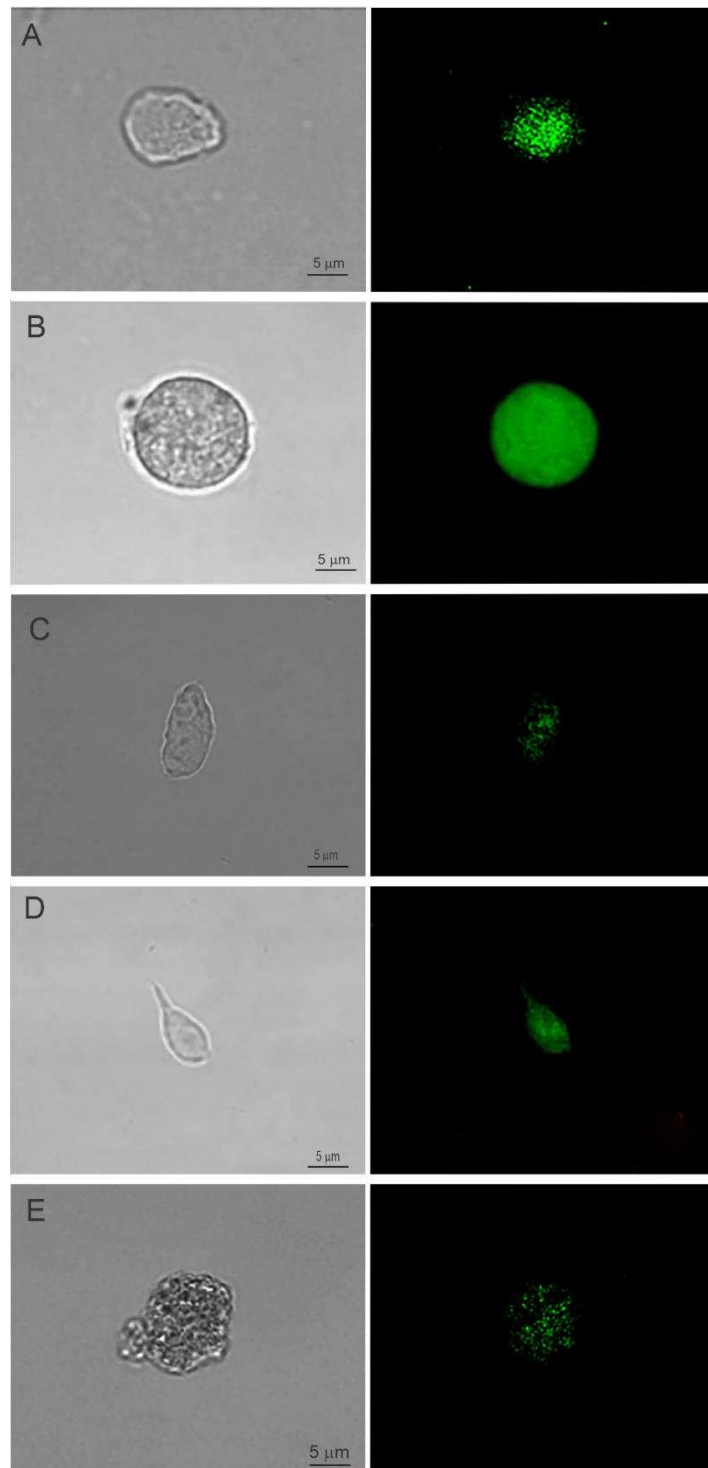
Fonte: A autora.

Figura 2 - Micrografia de fluorescência de hemócitos de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, evidenciando núcleos com diferentes aspectos de condensação da cromatina. A) Eucromatina; B) Heterocromatina; C) Apoptose de hemócito. Coloração com DAPI.



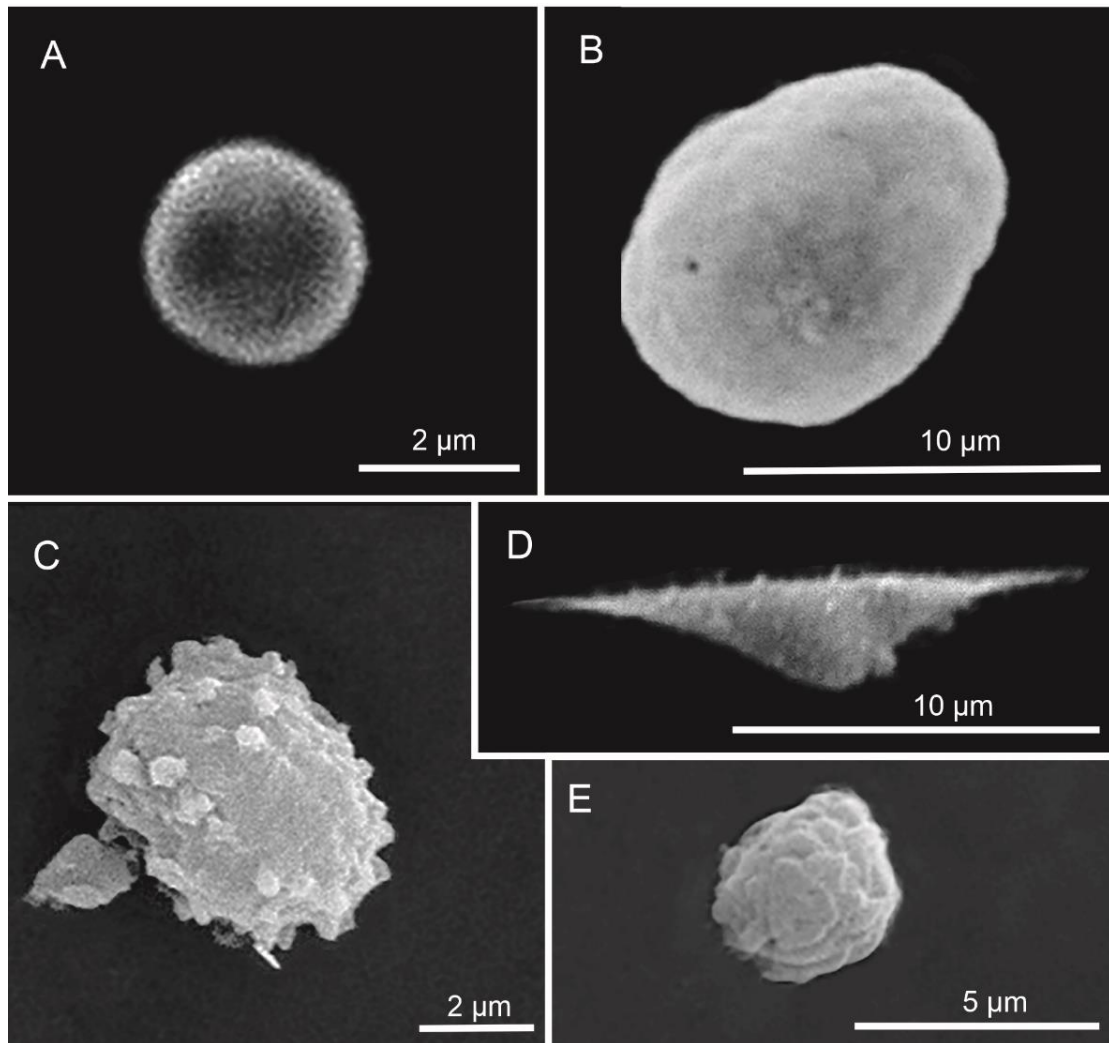
Fonte: A autora.

Figura 3 - Microscopia confocal de varredura a laser de hemócitos de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Marcação com Faloidina-FITC para visualização do citoesqueleto de actina. (A) Pró-hemócito; (B) Oenocitóide; (C) Esferulócito; (D) Plasmatócito; (E) Granulócito.



Fonte: A autora.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de hemócitos de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. (A) Pró-hemócito; (B) Oenocitóide; (C) Esferulócito; (D) Plasmatócito e (E) Granulócito.



Fonte: A autora.

4. DISCUSSÃO

Morfologicamente, as quatro subcastas de *A. sexdens rubropilosa* denominadas como jardineiras, lixeiras, forrageiras e soldados, foram classificadas pelo comportamento no ninho no momento da coleta e tamanho da cápsula cefálica, que variou entre 3,60 mm a 6,85 mm, apresentando alto padrão de polietismo, condição também observada nas colônias adultas de *Atta cephalotes* (ROCES, HÖLLDOBLER, 1994). Além disso, as colônias do gênero *Atta* têm menor número de indivíduos grandes forrageando, sendo a maioria das operárias de tamanho médio (WILSON, 1985). Esse dado também foi observado em *Acromyrmex landolti* onde as forrageiras apresentaram essa distribuição em relação as subcastas, onde ficou demonstrado pela grande quantidade de operárias forrageiras nas trilhas ao longo de um ano de amostragem (SILVA JUNIOR, 2012).

A identificação e classificação dos hemócitos foram realizadas de acordo com as características estruturais e morfológicas, observando-se semelhanças e as diferenças entre as células da hemolinfa das subcastas, com base na literatura de trabalhos realizados com outras formigas e insetos, principalmente de Hymenoptera (AMARAL *et al.*, 2009; COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978; GIANNOTTI, CAETANO, 1985; RAVAIANO *et al.*, 2018).

Os pró-hemócitos encontrados na hemolinfa das subcastas de operárias da formiga *A. sexdens rubropilosa* são células com características morfológicas semelhantes com as encontradas na formiga *A. laevigata* (GIANNOTTI, CAETANO, 1985); nas abelhas *Melipona quadrifasciata* (RAVAIANO *et al.*, 2018); *Melipona scutellaris* (AMARAL *et al.*, 2009); nos mosquitos *Aedes aegypti* (ARAÚJO *et al.*, 2008) e *Culex quinquefasciatus* (BRAYNER *et al.*, 2005); no lepidoptera *Papilio demoleus* (JALALI, SALEHI, 2008); no besouro *Allomyrina dichotoma* (HWANG *et al.*, 2015) e na mosca rosa *Arge ochropus* (KHOSRAVI *et al.*, 2016). Os pró-hemócitos são reconhecidos como células precursoras de outros tipos de hemócitos, pois se diferenciam em plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos, sendo consideradas pluripotentes, com características de células-tronco (GUPTA, 1991; YAMASHITA, IWABUCHI, 2001). Nesse sentido, os pró-hemócitos de todas as subcastas de operárias da formiga *A. sexdens rubropilosa* apresentam características morfológicas semelhantes àqueles de outros insetos, a exemplo da formiga *A. laevigata* (GIANNOTTI, CAETANO, 1985). Dessa maneira, pode-se sugerir que também teriam função de originar os demais tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa desta formiga e, conseqüentemente,

atuar como mecanismo de defesa no sistema imunológico dos insetos (RIBEIRO, BREHÉLIN, 2006; WOOD, JACINTO, 2007).

Os oenocitóides observados nas subcastas das operárias de *A. sexdens rubropilosa* apresentam características semelhantes as descritas na formiga *A. laevigata* (GIANNOTTI, CAETANO, 1985) e outros insetos como nos mosquitos *A. aegypti* (HILLYER, CHRISTENSEN, 2002) e *Culex pipiens* (WANG *et al.*, 2011), os oenocitóides tem atividade de fenoloxidase, sugerindo que este tipo celular esteja envolvido no processo de melanização de patógenos (HILLYER, CHRISTENSEN, 2002). Por apresentarem características semelhantes aos oenocitóides encontrados no mosquito *A. aegypti*, essas células presentes em *A. sexdens rubropilosa* também podem estar envolvidas no processo de melanização.

Os esferulócitos encontrados nas subcastas de operárias da *A. sexdens rubropilosa* em pequena quantidade, são células grandes, arredondadas ou ovais e apresentam inclusões em forma de esférulas, por vezes chegando a mascarar o núcleo, caracterizado como pequeno e excêntrico, sendo semelhantes aos encontrados nas formigas de *A. laevigata* (GIANNOTTI, CAETANO, 1985) e *C. rufipes* (COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978) e em abelhas *A. mellifera* (CRUZ-LANDIM, 2009). Os esferulócitos são caracterizados pela presença de esférulas e muitas vezes podem ser confundidos com granulócitos devido aos grânulos, resultando em variações de nomenclatura (CRUZ-LANDIM, 2009). Essas células estariam envolvidas na renovação tecidual, transporte de substâncias como hormônios, produção de algumas proteínas da hemolinfa, participação na defesa contra bactérias, na nutrição e transporte de componentes cuticulares (SASS; KISS; LOCKE, 1994).

A aparente menor abundância observada dos esferulócitos e oenocitóides na hemolinfa de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, pode estar associada ao fato de que essas células não possuem função específica na defesa celular e, por consequência, são susceptíveis e vulneráveis as ações de patógenos (LANOT *et al.*, 2001; LAVINE, STRAND, 2002).

Os plasmatócitos das subcastas de operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram as células que apresentaram maior variação morfológica, semelhante ao encontrado nas formigas *A. laevigata* (GIANNOTTI, CAETANO, 1985) e *C. rufipes* (COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978); nas abelhas *A. mellifera* (RICHARDSON *et al.*, 2018); *M. quadrifasciata* (RAVAIANO *et al.*, 2018); *M. scutellaris* (AMARAL *et al.*, 2010) e no mosquito *A. aegypti* (ARAÚJO *et al.*, 2008). Essa variação morfológica observada nos plasmatócitos das formigas operárias e em outros insetos, se deve pela presença de pseudópodes e/ou filopódios (ARAÚJO, 2011; GUPTA, 2009). Em *Panstrongylus megistus* (Hemiptera), Barraco e Loch (1989) destacam que os plasmatócitos possuem o citoplasma rico em lisossomos, confirmado

pela presença da fosfatase ácida. Em abelhas, os plasmatócitos são as principais células envolvidas no processo de fagocitose (AMARAL *et al.*, 2010; EL MOHANDES; NAFFEA; FAWZY, 2010), desempenhando funções que podem ser comparadas com os macrófagos de vertebrados, onde são reconhecidas como células fagocitárias envolvidas no processo de ingestão ou encapsulamento de patógenos, assim como na remoção de células apoptóticas durante o desenvolvimento (EVANS; HARTENSTEIN; BANERJEE, 2003; HARTENSTEIN, 2006). A variação morfológica observada pelos plasmatócitos e à formação de filopódios que pode ser resultado da função que esses hemócitos exercem na imunidade dessas formigas, principalmente pelo envolvimento no processo de fagocitose como evidenciado por diversos estudos com outros insetos.

Os granulócitos das subcastas de *A. sexdens rubropilosa* são células arredondadas, encontradas em grande quantidade na hemolinfa e apresentam morfologia semelhante aos encontrados nas formigas *A. laevigata* (GIANNOTTI, CAETANO, 1985) e *C. rufipes* (COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978) e na mariposa *A. gemmatalis* (DE NEGREIRO *et al.*, 2009). Em *Aedes albopictus* foi observada a presença de diversos lisossomos nos granulócitos através da utilização de anticorpos específicos e verificaram que essas células apresentam atividade fagocítica contra as partículas de látex (ARAÚJO, 2011). Na abelha *A. mellifera* (RICHARDSON *et al.*, 2018); no bicho da seda *B. mori* (LING *et al.*, 2003; WAGO, 1983; WU *et al.*, 2016; YAMASHITA, IWABUCHI, 2001) e nos mosquitos *A. gambiae* e *A. aegypti* (CASTILLO; ROBERTSON; STRAND, 2006; HILLYER, CHRISTENSEN, 2002), os granulócitos desempenham atividade fagocítica de patógenos, enquanto no grilo *Gryllus bimaculatus*, além da fagocitose, também promovem a nodulação e encapsulamento de patógenos (CHO, CHO, 2019).

Em complemento, nos estudos com larvas do besouro *Protaetia brevitarsis seulensis*, a fagocitose por granulócitos está associada com a ativação da autofagia, estabelecendo um sistema eficiente para eliminar patógenos (KWON; BANG; CHO, 2014). Em larvas de *M. scutellaris*, os granulócitos, juntamente com os plasmatócitos, são responsáveis pela resposta fagocitária de partículas estranhas nesses insetos (AMARAL *et al.*, 2010). Além disso, ao entrar em contato com as partículas estranhas, essas células produzem ou secretam proteínas antimicrobianas para matar esses invasores (STEINER *et al.*, 1981), podendo a membrana plasmática sofrer alterações visíveis pela presença de filopódios e/ou pseudópodes (HWANG *et al.*, 2015; KWON; BANG; CHO, 2014; LAVINE, STRAND, 2002). Contudo, em abelhas operárias *A. mellifera*, a imunidade fornecida por essas células diminui com a idade (RICHARDSON *et al.*, 2018). Na formiga *A. sexdens rubropilosa*, os granulócitos foram as

células encontradas em maiores quantidades na hemolinfa desses insetos. Devido a presença de características semelhantes observadas nos granulócitos de outros insetos assim como na função que exercem no sistema imune, os granulócitos dessa formiga também podem estar envolvidos no processo fagocítico de agentes invasores.

Esses resultados diferem em relação aqueles para a formiga *Atta laevigata*, onde os pró-hemócitos, plasmatócitos e células esférulas estavam presentes nas subcastas de soldados, operárias médias e mínimas, no entanto, nos soldados também foram encontradas oenocitóides, células vermiformes, células granulares e adipohemócitos; nas formigas operárias médias foram encontrados com exclusividade os tipos oenocitóides e células vermiformes (GIANNOTTI, CAETANO, 1985).

Alguns fatores podem influenciar na distribuição e ocorrência morfológica dos hemócitos, como o método de coleta de hemolinfa empregado (ARAÚJO, 2011), assim como as reações de defesa celular, fatores genéticos e fisiológicos do hospedeiro e do patógeno (RUSSO; BREHÉLIN; CARTON, 2001). De acordo com os autores Costa Leonardo e Cruz-Landim (1978), ao remover as células da hemolinfa, essas sofrem rápidas transformações, sendo assim, não teria como determinar se os diversos tipos morfológicos representam diferentes tipos de hemócitos ou se seriam um único tipo em estado fisiológico diferente. Além disso, fatores bióticos como ácaros, bactérias e fungos, também podem causar alterações no número de hemócitos, na atividade humoral, promover suscetibilidade a outras doenças, alterar a expressão de genes da imunidade e reduzir a concentração de proteínas relacionadas ao sistema imune (BURRITT *et al.*, 2016; KOLEOGLU *et al.*, 2018; LÓPEZ *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2017).

Diversos tamanhos e morfologias dos núcleos foram evidenciados pela técnica de microscopia de fluorescência, sugerindo a existência de variabilidade da população dos hemócitos como identificadas pela microscopia de luz (Thermo Scientific, 2009). Os dois tipos de cromatina, distinguidas no interior dos núcleos, são separadas por regiões altamente condensadas, chamadas de heterocromatina, onde contêm poucos genes, sendo inativa transcricionalmente e, por regiões descondensadas, denominadas eucromatina, rica em genes, correspondendo a área ativa do genoma, sendo, portanto, mais acessível aos meios necessários para a expressão gênica. Os mecanismos que estabelecem essa distribuição ainda são pouco compreendidos, mas praticamente, todos os tipos de células eucarióticas seguem esse padrão de organização do genoma (FALK *et al.*, 2019). Como os núcleos dos hemócitos de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram predomínio de regiões eucromáticas, pode-se sugerir que

existam regiões mais ativas transcricionalmente do que inativas no interior do núcleo dessas células, orientando a síntese de RNA e de proteínas.

A morte programada das células por apoptose desempenha papel importante na homeostase e no sistema imunitário, realizando a defesa contra corpos estranhos e eliminando células criticamente danificadas (LOWE, LIN, 2000; SOKOLOVA; EVANS; HUGHES, 2004). Fatores como radiação, temperatura, hipóxia, xenobióticos e entre outros, podem induzir a apoptose (ELMORE, 2007; SOKOLOVA; EVANS; HUGHES, 2004). No entanto, em algumas situações, o processo de apoptose pode ser considerado um processo natural para contribuir com a reposição celular, uma vez que essas células programam a sua morte para que ocorra uma renovação tecidual, como observado nos hemócitos circulantes do molusco *Pomacea canaliculata*, que apresentam altas taxas de apoptose (OLIVEIRA, 2017; SOKOLOVA; EVANS; HUGHES, 2004).

O citoesqueleto de actina nos hemócitos de todas subcastas foram encontrados na cor verde, evidenciando diferentes morfologias, como encontrados na microscopia confocal de varredura a laser com Faloidina-FITC e descritos nas técnicas anteriores. A actina celular, constituinte mais abundante do citoesqueleto é importante porque fornece suporte mecânico interno, força e direção para os movimentos celulares (ALBERTS *et al.*, 2017; DRAMSI, COSSART, 1998), principalmente quando o organismo é invadido por patógenos, influenciando nos rearranjos da actina que resultam na formação de filopódios (SWANSON, BAER, 1995).

5. CONCLUSÃO

Nas operárias da formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* foram encontradas quatro subcastas, denominadas jardineira, lixeira, forrageira e soldado. Na hemolinfa de cada subcasta ocorrem cinco tipos morfológicos de hemócitos, denominados pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos.

Os hemócitos predominantes na hemolinfa das operárias da formiga foram os granulócitos, provavelmente por desempenharem a principal atividade de defesa no sistema imune inato da formiga.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia Molecular da Célula**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464 p.
- AMARAL, I. M. R. **Sistema imune inato em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica. Área de concentração em Genética). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG. 2009.
- AMARAL, I. M. R.; NETO, J. F. M.; PEREIRA, G. B.; FRANCO, M. B.; BELETTI, M. E.; KERR, W. E.; UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini); cell types and their role in phagocytosis. **Micron**, v. 41, n. 2, p. 123 - 129, 2010.
- ARAÚJO, H. C. R.; CAVALCANTI, M. G. S.; SANTOS, S. S.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**, v. 39, n. 2, p. 184 - 189, 2008.
- ARAÚJO, H. R. C. **Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue vírus**. 2011. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração em Biologia Celular e Molecular). Belo Horizonte, 2011.
- ARTEAGA BLANCO, L. A.; CRISPIM, J. S.; FERNANDES, K. M.; DE OLIVEIRA, L. L.; PEREIRA, M. F.; BAZZOLLI, D. M. S.; MARTINS, G. F. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell Tissue Res**, v. 370, p. 153 - 168, 2017.
- BARRACO, M. A.; LOCH, C. T. Ultrastructural studies of the hemocytes of *Panstrongylus Megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 84, n. 2, p 171 - 188, 1989.
- BRAYNER, F. A.; ARAÚJO, H. R. C.; CAVALCANTI, M. G. S.; ALVES, L. C.; PEIXOTO, C. A. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Micron**, v. 36, n. 4, p. 359 - 367, 2005.
- BRAYNER, F. A.; ARAÚJO, H. R. C.; SANTOS, S. S.; CAVALCANTI, M. G. S.; ALVES, L. C.; SOUZA, J. R. B.; PEIXOTO, C. A. Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, n. 1, p. 112 - 120, 2007.
- BRYANT, W. B.; MICHEL, K. *Anopheles gambiae* hemocytes exhibit transient states of activation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 119 - 129, 2016.
- BURRITT, N. L.; FOSS, N. J.; NEENO-ECKWALL, E. C.; CHURCH, J. O.; HILGER, A. M.; HILDEBRAND, J. A.; BURRITT, J. B. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167752, 2016.

CASTILLO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 12, p. 891 - 903, 2006.

CHO, Y.; CHO, S. Hemocyte-hemocyte adhesion by granulocytes is associated with cellular immunity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p. 18066, 2019.

COSTA LEONARDO, A. M.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo das células do sangue de *Camponotus rufipes* (Fabricius) (Hymenoptera Formicidae). **Studia Ent.**, v. 20, p. 235 - 251, 1978.

CRUZ-LANDIM, C. Differential morphology of the hemocytes present in pupal ovaries of the queen and worker honeybee. **Cytologia**, v. 66, n. 4, p. 357 - 363, 2001.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408p.

DE NEGREIRO, M. C.; CARVALHO, R. B.; ANDRADE, F. G. D.; LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, Â. M. Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. Iheringia, **Série Zoologia**, v. 99, p. 66 - 70, 2009.

DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas-cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. 262p.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and actin cytoskeleton. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 14, n. 1, p. 137 - 166, 1998.

EL MOHANDES, S. S.; NAFEA, E. A.; FAWZY, A. M. Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences (A. Entomology)**, v. 3, n. 1, p. 113 - 220, 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n.4, p. 495 - 516, 2007.

ENDRINGER, F. B. **Comportamento de forrageamento da formiga *Atta robusta* Borgmeier 1939 (Hymenoptera: Formicidae)**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Curso de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Departamento de Proteção de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.

EVANS, C. J.; HARTENSTEIN, V.; BANERJEE, U. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. **Developmental cell**, v. 5, n. 5, p. 673 - 690, 2003.

FALK, M.; FEODOROVA, Y.; NAUMOVA, N.; IMAKAEV, M.; LAJOIE, B. R.; LEONHARDT, H.; JOFFE, B.; DEKKER, J.; FUDENBERG, G.; SOLOVEI, I.; MIRNY, L. A. Heterochromatin drives compartmentalization of inverted and conventional nuclei. **Nature**, v. 570, n. 7761, p. 395 - 399, 2019.

GÁBOR, E.; CINEGE, G.; CSORDÁS, G.; RUSVAI, M.; HONTI, V.; KOLICS, B.; TÖRÖK, T.; WILLIAMS, M. J.; KURUCZ, E.; ANDÓ, I. Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 109, p. 103701, 2020.

GIANNOTTI, E.; CAETANO, F. H. A comparative study of the hemocytes of *Atta laevigata* adults (Formicidae: Myrmicinae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 8, n. 1, p. 37 - 45, 1985.

GIGLIO, A.; BATTISTELLA, S.; TALARICO, F. F.; BRANDMAYR, T. Z.; GIULIANINI, P. G. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. **Micron**, v. 39, n. 5, p.552 - 558, 2008.

GUPTA, A. P. Immunology of insects and other arthropods. **Comparative arthropod morphology, physiology, and development**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 19 – 118, 1991.

GUPTA, A. P. **Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 628p.

HARTENSTEIN, V. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 677 - 712, 2006.

HILLYER, J. F.; CHRISTENSEN, B. M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochemistry and cell biology**, v. 117, p. 431 - 440, 2002.

HWANG, S.; BANG, K.; LEE, J.; CHO, S. Circulating hemocytes from larvae of the japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128519, 2015.

HYSTAD, E. M.; SALMELA, H.; AMDAM, G. V.; MÜNCH, D. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184108, 2017.

IBRAHIM, A. SH. Predation activity of ants (Hymenoptera: Formicidae) on sugar beet insect pests. **The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)**, v. 16, n. 1, p. 7 - 13, 2020.

JAIME, N. G. **Levantamentos mirmecofaunísticos em três ambientes antrópicos nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil**. 2010. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração em Produção vegetal), Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, 2010.

JALALI, J.; SALEHI, R. The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* l. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. **Munis Entomology & Zoology**, v. 3, n.1, p. 199 - 216, 2008.

KHOSRAVI, R.; SENDI, J. J.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; FEITOSA, A. P. S. Hemocytes of the Rose Sawfly *Arge ochropus* (Gmelin) (Hymenoptera: Argidae). **Neotropical Entomology**, v. 45, p. 58 - 65, 2016.

KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods**. Oxford: Scion Publishing Ltd, 2008. 606 p.

KOLEOGLU, G.; GOODWIN, P. H.; REYES-QUINTANA, M.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; GUZMAN-NOVOA, E. Varroa destructor parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. **Parasitology research**, v. 117, p. 1175 - 1183, 2018.

KWON, H.; BANG, K.; CHO, S. Characterization of the hemocytes in larvae of *Protoetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103620, 2014.

LANOT, R.; ZACHARY, D.; HOLDER, F.; MEISTER, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. **Developmental biology**, v. 230, n. 2, p. 243 - 257, 2001.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1237 - 1242, 2002.

LING, E.; SHIRAI, K.; KANEKATSU, R.; KIGUCHI, K. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. **Histochemistry and cell biology**, v. 120, p. 505 - 511, 2003.

LIU, F.; XU, Q.; ZHANG, Q.; LU, A.; BEERNTSEN, B. T.; LING, E. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 10, n. 1, p. 102 - 109, 2013.

LÓPEZ, J. H.; KRAINER, S.; ENGERT, A.; SCHUEHLY, W.; RIESSBERGER-GALLÉ, U.; CRAILSHEIM, K. Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 40853, 2017.

LOWE, S. W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485 - 495, 2000.

MANFREDINI, F.; DALLAI, R.; OTTAVIANI, E. Circulating haemocytes from larvae of the paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). **Tissue and Cell**, v. 40, n. 2, p. 103 - 112, 2008.

MARRINGA, W. J.; KRUEGER, M. J.; BURRITT, N. L.; BURRITT, J. B. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e108486, 2014.

OLIVEIRA, R. P. **Toxicidade do chumbo, em diferentes temperaturas, sobre hemócitos da *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda)**. 2017, 53 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.**

RATCLIFFE, N. A. Invertebrate immunity-a primer for the non-specialist. **Immunology Letters**, v. 10, n. 5, p. 253 - 270, 1985.

RAVAIANO, S. V.; BARBOSA, W. F.; CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. Variations in circulating hemocytes are affected by age and caste in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **The Science of Nature**, v. 105, p. 1 - 8, 2018.

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: what type of cell is what? **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 5, p. 417 - 429, 2006.

RICHARDSON, R. T.; BALLINGER, M. N.; QIAN, F.; CHRISTMAN, J. W.; JOHNSON, R. M. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. **Apidologie**, v. 49, p. 397 - 410, 2018.

ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Leaf density and a trade-off between load-size selection and recruitment behavior in the ant *Atta cephalotes*. **Oecologia**, v. 97, n. 1, p. 1 - 8, 1994.

RODRIGUES, A.; BACCI, M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal weeds in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 604 - 614, 2008.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 2, p. 167 - 172, 2001.

SASS, M.; KISS, A.; LOCKE, M. Integument and hemocyte peptides. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, n. 5, p. 407 - 421, 1994.

SEZER, B.; OZALP, P. Effects of Pyriproxyfen on hemocyte count and morphology of *Galleria mellonella*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 2a, p. 621 - 625, 2015.

SHARMA, P. R.; SHARMA, O. P.; SAXENA, B. P. Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Micron**, v. 39, n. 5, p. 544 - 551, 2008.

SILVA JUNIOR, M. R. **Biologia e controle de *Acromyrmex landolti* FOREL, 1885 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Vitória da Conquista, Vitória da Conquista, 2012.

SÖDERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 2, p. 229 - 239, 1983.

SOKOLOVA, I. M.; EVANS, S.; HUGHES, F. M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 19, 3369 - 3380, 2004.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, Å.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246 - 248, 1981.

STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Immunology**, v. 32, p. 25 - 47, 2008.

SWANSON, J. A.; BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 3, p. 89 - 93, 1995.

TAN, J.; XU, M.; ZHANG, K.; WANG, X.; CHEN, S.; LI, T.; XIANG, Z.; CUI, H. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n.6, p. 595 - 603, 2013.

TAVARES, D. A.; DUSSAUBAT, C.; KRETZSCHMAR, A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O.; BÉRAIL, G.; BRUNET, J-L.; BELZUNCES, L. P. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental pollution**, v. 229, p. 386 - 393, 2017.

THERMO SCIENTIFIC. **DAPI Nuclear Counterstain**: a blue nuclear counterstain for fluorescence microscopy and cellular imaging. Rockford: Thermo Fisher Scientific Inc., 2009. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>. Acesso em: 20 fev. 2022.

TRAVAGLINI, R. V. **Determinação das estratégias coletivas de forrageamento em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração em Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

VALENCIA-GIRALDO, S. M.; NIÑO-CASTRO, A.; LÓPEZ-PEÑA, A.; TREJOS-VIDAL, D. CORREA-BUENO, O.; MONTOYA-LERMA, J. Immunity and survival response of *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers to *Metarhizium anisopliae* infection: Potential role of their associated microbiota. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0247545, 2021.

WAGO, H. The important significance of filopodial elongation of phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*, in recognition of foreignness. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 3, p. 445 - 453, 1983.

WANG, Z.; LU, A.; LI, X.; SHAO, Q.; BEERNTSEN, B. T.; LIU, C.; MA, Y.; HUANG, Y.; ZHU, H.; LING, E. A systematic study on hemocyte identification and plasma prophenoloxidase from *Culex pipiens quinquefasciatus* at different developmental stages. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 135 - 141, 2011.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) I. The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, n.2, p. 143 - 156, 1980.

WILSON, E. O. The sociogenesis of insect colonies. **Science**, v. 228, n. 4707, p. 1489 - 1495, 1985.

WOOD, W.; JACINTO, A. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 542 - 551, 2007.

WU, G.; LIU, Y.; DING, Y.; YI, Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue and Cell**, v. 48, n. 4, p. 297 - 304, 2016.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 4 - 5, p. 325 - 331, 2001.

CAPÍTULO II - PERFIL POPULACIONAL DOS HEMÓCITOS DAS SUBCASTAS DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

A formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* apresenta grande importância ecológica e econômica, pois além de proporcionar aumento da permeabilidade do solo e acúmulo da matéria orgânica, causa enorme prejuízo à agricultura por desfolhar várias culturas agrícolas e florestais para manter o cultivo do fungo, alimento para esses insetos. Assim como em outros insetos, essa formiga apresenta hemócitos na composição celular de sua hemolinfa, responsáveis pela defesa do sistema imunológico inato. O presente estudo teve como objetivo analisar o perfil populacional dos hemócitos da hemolinfa de subcastas de operárias da formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* através da medição da cápsula cefálica, contagem diferencial e total de hemócitos, ensaios de fagocitose por microscopia confocal, assim como pela citometria de fluxo. A casta de operárias é altamente polimórfica e, de acordo com as diferentes funções que exercem dentro do ninho e ao tamanho da cápsula cefálica, são classificadas nas subcastas jardineiras, responsáveis pelo cuidado do fungo e com as formas imaturas no interior do ninho; lixeiras que atuam na manutenção e no descarte do lixo; forrageiras, exploram ambientes externos para coletar e transportar a vegetação para dentro do ninho, auxiliando na construção do mesmo, os soldados que defendem a colônia e auxiliam as forrageiras. Na hemolinfa da formiga foram identificados cinco tipos morfológicos de hemócitos, representando pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos, comum em todas as subcastas. Os granulócitos e os pró-hemócitos são os tipos mais abundantes circulando na hemolinfa. As maiores quantidades de hemócitos foram observadas nas subcastas forrageiras seguidas dos soldados. O antissoro policlonal de *Atta sexdens rubropilosa* foi eficiente, uma vez que separou a população de hemócitos dos fragmentos celulares. Os granulócitos e plasmatócitos realizaram a fagocitose das bactérias *E. coli*. As subcastas soldados, assim como as lixeiras, possuem predominantemente maiores quantidades de células fagocíticas. Uma única população de hemócitos na hemolinfa das formigas, comum para cada subcasta foram encontradas. No entanto, análise de dispersão 3D evidenciou cinco subpopulações distintas de hemócitos, onde duas apresentaram valores superiores às demais subcastas. A subcasta de soldados apresentou células e intensidade de fluorescência por FITC maiores que as subcastas jardineira, lixeira e forrageira, assim como granulosidade/complexidade externa maior, em relação à subcasta jardineira. Essas células

podem corresponder aos granulócitos e plasmatócitos, responsáveis pela defesa imune em diversos insetos.

Palavras-chave: Granulócitos. Soldados. Morfologia. Anticorpo. Citometria.

1. INTRODUÇÃO

Diferente dos vertebrados, os insetos não possuem um mecanismo imunológico adaptativo e de defesa mediada por anticorpos que conferem respostas específicas para cada patógeno. Nessa concepção, esses invertebrados apresentam uma resposta imune inata, composta por elementos humorais, que é mediada por várias moléculas efetoras, incluindo peptídeos antimicrobianos, e por elementos celulares imunes responsáveis pelo desenvolvimento de mecanismos no combate de patógenos invasores (DOUBLET *et al.*, 2017; HONTI *et al.*, 2014; LAVINE, STRAND, 2002; VIVIER, MALISSEN, 2005).

Enquanto uma ampla variedade de peptídeos antimicrobianos são produzidos em decorrência da resposta imune humoral (HULTMARK, 2003; LOWENBERGER, 2001; MEISTER; HETRU; HOFFMANN, 2000), processos como fagocitose, nodulação e encapsulamento são realizados pelos hemócitos, caracterizados como as principais células presentes na hemolinfa e responsáveis pela resposta imune celular (DUDZIC *et al.*, 2015; HONTI *et al.*, 2014; LAVINE, STRAND, 2002).

Diante da variabilidade morfológica e quantitativa de hemócitos circulantes observada na hemolinfa dos insetos, além da microscopia de luz, torna-se necessária a combinação de diferentes técnicas, como a citometria de fluxo utilizada para caracterizar adequadamente estas células, evitando assim denominações divergentes na literatura (LAVINE, STRAND, 2002; NUNES, 2001).

O uso da técnica de citometria de fluxo vem sendo utilizada por vários autores como uma importante estratégia para caracterização dos hemócitos de invertebrados (DU *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2022; HONG; DONAGHY; CHOI, 2019; KLADCHENKO *et al.*, 2020; OLIVER *et al.*, 2011; PARRINO *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2017), principalmente insetos (ARTEAGA BLANCO *et al.*, 2017; BALOG *et al.*, 2021; DE GRAAF *et al.*, 2002; GÁBOR *et al.*, 2020; HYSTAD *et al.*, 2017; MARRINGA *et al.*, 2014; NAKAHARA *et al.*, 2009), uma vez que possibilita a identificação de populações de células funcional e morfológicamente distintas em uma determinada amostra, através do tamanho e granulosidade/complexidade interna (BRYANT, MICHEL, 2016; CÁRDENAS; DANKERT; JENKINS, 2004; SEQUEIRA *et al.*, 1995).

Essa técnica consiste num método automático e rápido que permite a contagem individual de um número expressivo de células em curto período de tempo (CÁRDENAS; DANKERT; JENKINS, 2004; SEQUEIRA *et al.*, 1995), resultando na obtenção de dados estatísticos mais precisos, confiáveis e menos trabalhosos do que a microscopia convencional

(DOSOGNE *et al.*, 2003; KOESS, HAMMAN, 2008; PIEPERS *et al.*, 2009; RIVAS *et al.*, 2001). Atualmente muitos trabalhos realizados para caracterizar populações de hemócitos de insetos através da citometria de fluxo, também envolvem produção de anticorpos e marcadores específicos (BRYANT, MICHEL, 2016; GÁBOR *et al.*, 2020; MARRINGA *et al.*, 2014; SIMONET *et al.*, 2016).

A formiga-cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), conhecida popularmente no Brasil como saúva-limão, é inseto social que vive em colônias altamente organizadas, com as operárias divididas em quatro subcastas, conhecidas por jardineira, lixeira, forrageira e soldado. As jardineiras cultivam o fungo e cuidam da prole dentro do ninho; lixeiras que gerenciam o lixo e realizam a limpeza do ninho em câmaras específicas; forrageiras que exploram o ambiente externo, cortam e transportam pedaços de folhas para interior do formigueiro, assim como constroem o ninho e soldados que defendem a colônia e auxiliam as forrageiras fora do ninho (DELLA LUCIA, 1993; GALLO *et al.*, 2002; WILSON, 1980).

De acordo com aspecto ecológico e econômico, o inseto é considerado importante, pois além de auxiliar na regeneração de florestas e apresentar ampla ocorrência no Brasil, estão situados entre herbívoros mais vorazes e de maior variedade alimentar, sendo dessa maneira, considerados pragas potenciais para as atividades agrícolas e florestais (DELLA LUCIA, 1993; JACCOUD, 2000; FRANCO *et al.*, 2013).

A formiga saúva-limão apresenta ausência de evidências sobre o perfil populacional dos hemócitos e mais restritivo ainda quando comparado entre as formigas operárias, que são classificadas de acordo com função que exercem no ninho. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil populacional dos hemócitos circulantes na hemolinfa de diferentes subcastas de operárias da formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa*, através da citometria de fluxo, contribuindo para a compreensão de aspectos da imunidade celular desta formiga.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Operárias de *A. sexdens rubropilosa* atuando como jardineiras, lixeiras e forrageiras foram obtidas em ninhos mantidos em laboratório no Insetário do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e soldados sobre as trilhas de ninhos situados no *campus* da UFV, Viçosa – MG. Cada subcasta foi transferida para recipientes plásticos apropriados, esterilizados e identificados, sendo encaminhados para o Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento da Biologia Geral da UFV, onde foram realizados os experimentos.

2.2. Medição da cápsula cefálica das formigas

A medida da cápsula cefálica foi realizada através de uma ocular micrométrica acoplada ao microscópio estereoscópico STEMI 2000 C ZEISS, no Laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento da Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). De acordo com o tamanho das cápsulas cefálicas ($n = 10$ de cada subcasta), caracterizadas pela maior largura da cabeça em face ventral, as operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram identificadas morfológicamente por subcastas (WILSON, 1980).

As jardineiras, que cultivavam o fungo e cuidavam da prole, possuem cápsula cefálica no intervalo de 3,6 a 4,5 mm; lixeiras, que gerenciavam o lixo e realizavam a limpeza do ninho, medem 4,7 a 5,8 mm; forrageiras, que exploravam, cortavam e transportavam folhas para o interior do ninho, de 5,9 a 6,5 mm; e os soldados que defendiam a colônia e auxiliavam as forrageiras fora do ninho, entre 6,6 a 6,85 mm.

2.3. Coleta da hemolinfa

As formigas operárias de cada subcasta ($n = 10$) foram anestesiadas com Clorofórmio - PA (98%, CAS 67-66-3, Dinâmica, São Paulo) até cessarem seus movimentos (IBRAHIM, 2020), sendo a hemolinfa extravasada da cabeça e do restante do corpo, coletadas com auxílio de microcapilar de vidro Drumond Microcaps[®] (Merck, São Paulo).

2.4. Contagem diferencial de hemócitos

As lâminas de vidro que receberam a hemolinfa das diferentes subcastas da formiga, permaneceram em repouso por no mínimo 20 minutos à temperatura ambiente para secagem e aderência das células. As lâminas foram coradas pelo método de Giemsa (KIERNAN, 2008) por 10 minutos, sendo depois rapidamente lavadas com água destilada, para remoção do resíduo (AMARAL *et al.*, 2010). O material foi seco à temperatura ambiente por 30 minutos, montadas sob uma lamínula com sacarose 50%, sendo, posteriormente, analisadas. Cinco lâminas contendo hemolinfa foram analisadas para cada subcasta, considerando 200 células em cada lâmina para se identificar os valores médios dos tipos de hemócitos por indivíduo de cada subcasta. As células foram identificadas em microscópio de luz (Olympus BX-60), com aumento de 40x e fotografadas com câmera digital acoplada Olympus QColor3.

2.5. Contagem total de hemócitos

A hemolinfa foi dispensada diretamente nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer melhorada, sem diluição. A contagem foi realizada em microscópio óptico (trinocular Primo Star, Zeiss), com aumento de 400x, sendo consideradas cinco repetições por cada subcasta.

2.6. Produção de antissoro policlonal contra hemócitos de *Atta sexdens rubropilosa*

As formigas operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram anestesiadas com clorofórmio e com auxílio de microcapilar de vidro de 1 µL, as amostras de hemolinfa foram coletadas sob a forma de *pool*, padronizando o número de formigas (total de 100 formigas, sendo 25 de cada subcasta) e depositadas posteriormente em microtubo de 1,5 mL, contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4 10 mM. As amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos à 4°C para obtenção de sedimento de hemócitos.

Para produção do soro anti-hemócitos, foram realizadas três imunizações em um camundongo adulto macho, sendo uma imunização inicial e dois reforços (boost), em intervalos de 15 dias. Na primeira imunização foram realizadas injeções subcutâneas num total de 1 mg do antígeno com adjuvante de Freund completo (v/v) e após 15 e 30 dias, a segunda e terceira imunizações foram realizadas, utilizando um total de 0,25 mg do antígeno cada em adjuvante de Freund incompleto (v/v) (AZEVEDO, 2011). Finalmente, 45 dias após a primeira imunização, o animal foi eutanasiado e o sangue coletado em um tubo Falcon, mantido por 30 minutos em temperatura ambiente para coagulação e então centrifugado

1500g por 15 minutos a 4°C para obtenção do soro. Posteriormente, o soro foi aquecido em banho-maria a 60°C por 30 minutos para diminuir a concentração dos componentes que possam causar reações inespecíficas (REIS *et al.*, 1997). Por fim, foi acrescentada solução saturada de sulfato de amônio 45% sob agitação por 20 minutos para purificação do soro (BÁLICO, 2014).

A conjugação dos anticorpos com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, Brasil), com adição de FITC ao antissoro na diluição de 1:50 por 1 hora, protegido no escuro, seguido de centrifugação a 1500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (PBS). O antissoro foi aliqotado em frascos de 1,5mL ao abrigo da luz e armazenados a -20°C.

2.7. Ensaio de fagocitose e microscopia confocal de varredura a laser

A solução de *Escherichia coli* foi centrifugada a 3000g para concentrar as bactérias e descartar o sobrenadante. Esse procedimento foi realizado três vezes, sendo adicionado PBS em cada etapa, por 5 minutos cada.

A hemolinfa foi incubada com a solução de *E. coli*, em tubos de 1 mL, seguido de vórtex. Após 30 minutos, 10 µL das amostras de hemolinfa de cada subcasta misturadas em solução de *E. coli* foram transferidas para lâminas histológicas, secadas ao ar, coradas com Faloidina-FITC (Sigma Aldrich, Sigma-Aldrich Brasil) na proporção 1:500 por uma hora na ausência de luz e lavadas três vezes em PBS, por cinco minutos cada. Posteriormente, foram incubadas em iodeto de propídeo em proporção 1:900 por 30 minutos na ausência de luz, sendo lavadas por três vezes em PBS, durante 10 minutos cada lâmina. Após as incubações, as amostras foram montadas em lâminas histológicas, sendo posteriormente, analisadas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss, LSM510 META, em objetiva de 10x, diferenciando as bactérias fagocitadas das bactérias somente ligadas a moléculas de superfície dos hemócitos. O teste foi realizado a fim de se verificar quais células de cada casta apresentavam atividades fagocíticas sobre as bactérias gram-negativa *E. coli*.

2.8. Ensaio de fagocitose e citometria de fluxo

No presente estudo foram utilizadas bactérias *E. coli* fixadas com paraformaldeído e incubadas com 50 µL de iodeto de propídeo (PI) por uma hora. Posteriormente, as bactérias foram lavadas três

vezes com PBS a fim de remover o excesso de PI para serem utilizadas no experimento. A solução contendo *E. coli* foi adicionada em microtubos de 1,5 mL e centrifugada a 3000g para concentrar as bactérias e descartar o sobrenadante. O experimento foi conduzido em triplicata, sendo adicionado PBS, por 5 minutos cada.

O anticorpo anti-hemócitos conjugado com FITC foi adicionada à solução de *E. coli* com a hemolinfa de cada subcasta, preparada anteriormente, com iodeto de propídeo, mantidas em repouso por uma hora e enviados para o citômetro de fluxo. Os ensaios de fagocitose foram realizados para investigar se os hemócitos de *A. sexdens rubropilosa* possuíam a capacidade de reconhecer e fagocitar as bactérias *E. coli*.

O teste de fagocitose foi determinado usando um citômetro BD FACS Verse (BD Bioscience, Calif., EUA) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e os resultados foram obtidos a partir de 5000 eventos por amostra, com o software FACSuite (BD Bioscience) e FlowJo versão 10.

A aquisição dos dados referentes à fagocitose foi realizada em gráficos (*density plot*) considerando os parâmetros: LF1, que mede a fluorescência do anticorpo anti-hemócito marcado com FITC, *versus* FL3, que mede a fluorescência das bactérias marcadas com PI, sendo utilizado a escala exponencial para aquisição das populações. A fluorescência das células emitida pelo fluorocromo FITC foi obtida pelo canal FL1 (527/532 nm) e analisada em gráficos *dot plot*, assim como em dispersão em 3D, avaliando a sua intensidade.

2.9. Citometria de fluxo da hemolinfa conjugada com FITC

A quantidade máxima de hemolinfa de três formigas operárias de cada subcasta (lixeira, forrageira e soldado) e seis jardineiras de *A. sexdens rubropilosa* foram utilizadas.

A hemolinfa foi depositada em microtubos de 1,5 mL, embalados em papel alumínio, contendo 100 µL de PBS, conduzindo o experimento em triplicata, com amostras biológicas independentes e considerando 5000 eventos (células) para cada formiga. As amostras foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e adicionado 100 µL do antissoro conjugado com FITC em cada microtubo, sendo incubados por 30 minutos a 28°C, no escuro.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 100 µL em PBS. Este procedimento foi repetido três vezes para remover os anticorpos conjugados com FITC que

não se ligaram e posteriormente foi acrescentado PBS até completar 300 μ L para volume suficiente de leitura no citômetro de fluxo.

A aquisição dos dados referentes à população de hemócitos foi realizada em gráficos (*dot plot*) considerando os parâmetros: dispersão frontal que mede o tamanho celular (*forward scatter - FSC*) versus a dispersão lateral que mede a granulosidade/complexidade interna (*side scatter - SSC*), sendo utilizado Log_{10} para aquisição das populações.

A fluorescência das células emitida pelo fluorocromo FITC foi obtida pelo canal FL1 (527/532 nm) e analisada em gráficos *dot plot*, assim como em dispersão em 3D, avaliando a sua intensidade. As populações de hemócitos foram determinadas usando um citômetro BD FACS Verse (BD Bioscience, Calif., EUA) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e os resultados foram obtidos a partir de 5000 eventos por amostra, com o software FACSuite (BD Bioscience) e FlowJo versão 10.

2.10. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por estatística univariada (Análise de variância - ANOVA), sendo os dados significativos avaliados com comparações de médias pelo teste de Tukey em nível de significância de 0,05 no programador estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2011). Os resultados são apresentados como médias e desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Contagem diferencial dos hemócitos

Cinco tipos de hemócitos foram encontrados na hemolinfa das formigas operárias, através da contagem diferencial de cada subcasta jardineira, lixeira, forrageira e soldado, sendo denominados como pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos. As maiores abundâncias de granulócitos foram observadas em quase todas as subcastas das formigas, sendo predominantes nas jardineiras, forrageiras e lixeiras, com $616 \pm 9,1$; $611 \pm 8,2$ e $571 \pm 6,9$ células, respectivamente. Por outro lado, a menor quantidade deste hemócito está associada à subcasta soldado, com $245 \pm 11,1$ células. Os plasmatócitos estavam presentes em número variado de células, sendo constatados valores de $538 \pm 9,1$ células nos soldados; $136 \pm 7,6$ células nas lixeiras; $101 \pm 4,6$ células nas jardineiras e $34 \pm 4,6$ células nas forrageiras. Os pró-hemócitos se apresentaram em maior quantidade nas forrageiras ($329 \pm 10,1$), menor nos soldados ($144 \pm 4,1$); com valores intermediários nas jardineiras ($241 \pm 7,6$) e lixeiras ($231 \pm 2,9$). As células oenocitóides apresentaram quantitativos de $54 \pm 2,3$ e $31 \pm 2,7$ células para as subcastas soldado e lixeira, respectivamente. Por outro lado, as subcastas jardineira e forrageira apresentaram, quantitativo de $21 \pm 1,6$ e $21 \pm 1,9$ células na hemolinfa, respectivamente. Diferentemente das células de granulócitos, plasmatócitos, prohemócitos e oenocitóides, foi constatado que os esferulócitos apresentaram células em menor quantidade na hemolinfa de todas as subcastas analisadas, com valores observados de $31 \pm 1,6$; $21 \pm 1,3$; $19 \pm 2,2$ e $5 \pm 0,7$ células nas subcastas lixeira, jardineira, soldados e forrageira, respectivamente. Assim, em todas as subcastas das formigas operárias de *A. sexdens rubropilosa*, os granulócitos e pró-hemócitos são os tipos mais abundantes circulando na hemolinfa, seguido pelos plasmatócitos e em menor número pelos oenocitóides, assim como pelos esferulócitos.

3.2. Contagem total de hemócitos

As maiores quantidades de hemócitos foram obtidas nas subcastas forrageira ($74 \pm 7,0$) seguidas dos soldados ($62 \pm 5,7$). Por outro lado, as menores quantidades de hemócitos ocorreram nas jardineiras e lixeiras, com $21 \pm 4,2$ e $40 \pm 8,3$ hemócitos, respectivamente.

3.3. Produção de antissoro policlonal contra hemócitos de *Atta sexdens rubropilosa*

O antissoro desenvolvido contra hemócitos de subcastas de *A. sexdens rubropilosa* conjugado com FITC, considerando os parâmetros de granulosidade/complexidade interna (SSC-A), tamanho celular (FSC-A) e a intensidade de fluorescência por FITC permitiu a separação das células de interesse dos fragmentos celulares contidos nas amostras (Figura 1A) com 65,45% negativas para FITC, representando fragmentos celulares (Figura 1B), e 34,6% positiva para FITC, representando a população de hemócitos (Figura 1C). A figura 1D representa as duas populações, sem a eliminação dos fragmentos celulares negativos para FITC.

Assim, o antissoro policlonal foi eficiente para separar somente a população de hemócitos da formiga.

3.4. Ensaio de fagocitose por microscopia confocal de varredura a laser

Estudos evidenciaram que hemócitos semelhantes aos granulócitos e plasmatócitos realizaram fagocitose das bactérias *E. coli* (Figuras 2A, 2B). Por outro lado os pró-hemócitos (Figura 2C), oenocitóides (Figura 2D) e esferulócitos, não fagocitaram as bactérias.

3.5. Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo

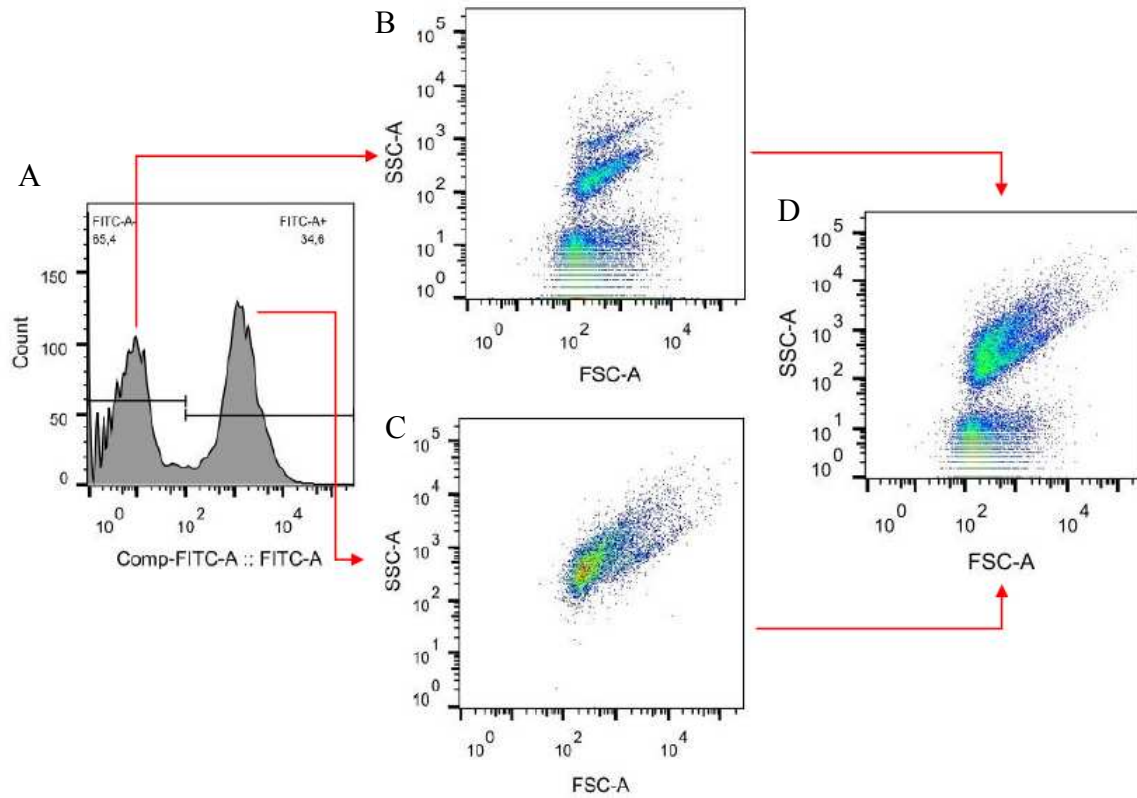
As subcastas soldados possuem maiores quantidades de células fagocíticas (74,2%), seguidas pelas lixeiras (73,0%). No entanto, foi possível observar também que as forrageiras possuem 64,4% e as jardineiras 69,4% de células fagocíticas (Figura 3).

3.6. Citometria de fluxo dos hemócitos conjugados com FITC

Após exclusão de grande parte dos fragmentos celulares, uma única população de hemócitos na hemolinfa de cada subcasta de operárias da formiga *Atta sexdens rubropilosa* foram analisadas (Figura 4). No entanto, a análise gráfica de dispersão 3D evidenciou cinco subpopulações distintas de hemócitos em cada operária da formiga. Duas subpopulações de hemócitos tiveram os parâmetros de granulosidade/complexidade interna (SSC), tamanho celular (FSC) e intensidade de fluorescência por FITC maiores em relação às outras subpopulações, que se apresentaram sobrepostas, com padrões semelhantes, evidenciando FSC e SSC inferiores (Figura 5).

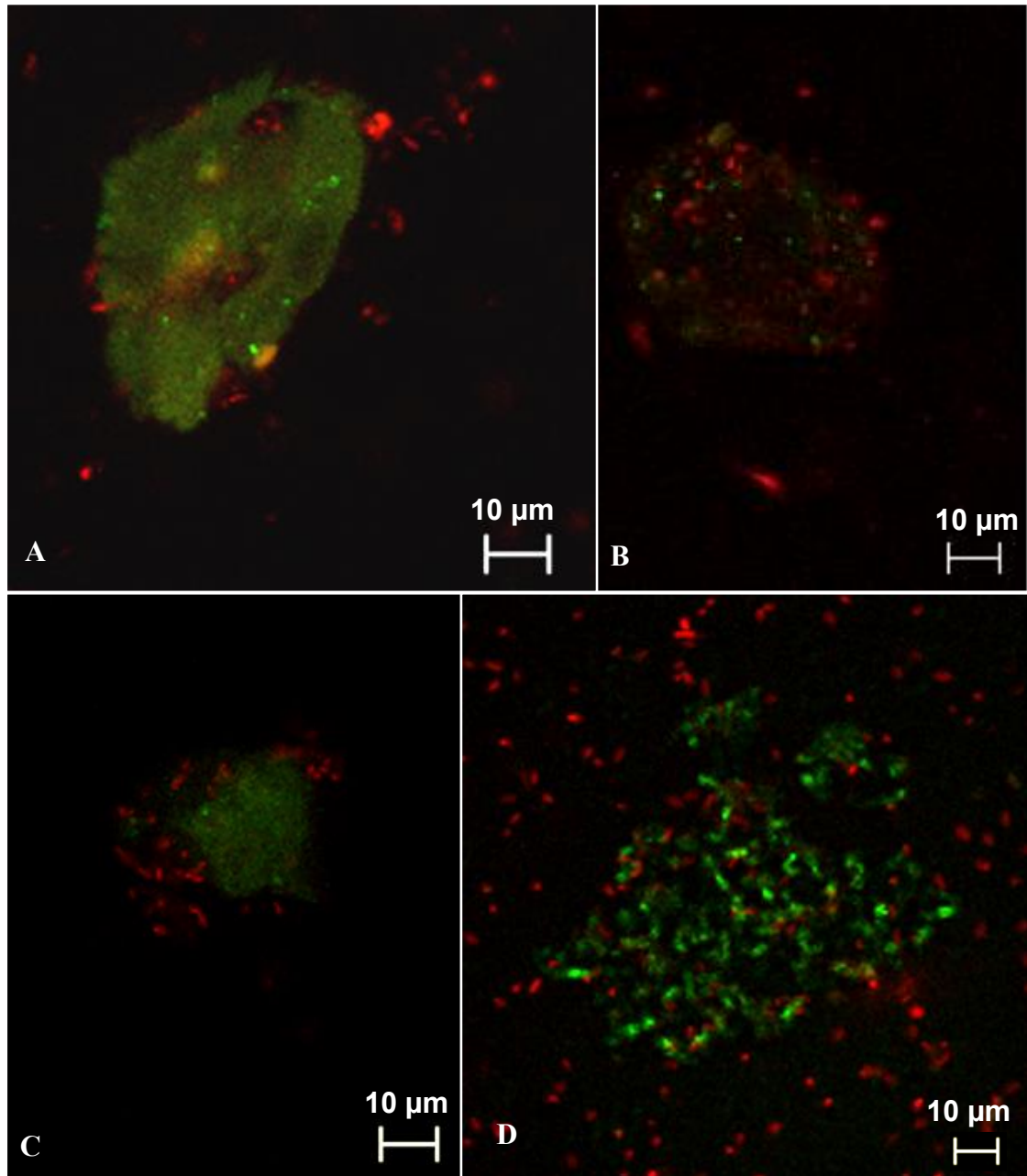
A partir da intensidade média de fluorescência (MFI), foi possível observar que a subcasta soldado apresentou células com tamanho (1673,3 - Figura 6A) e intensidade de fluorescência por FITC (5149,3 - Figura 6C) maiores e estatisticamente significativas em relação subcastas jardineira, lixeira e forrageira, por outro lado, embora o máximo valor de granulosidade/complexidade interna tenha sido observada para a subcasta soldado (1558,0 - Figura 6B), a diferença estatística só ocorreu em relação a jardineira. Não foram observadas diferenças em relação a quantidade de hemócitos entre as subcastas (Figura 6 D).

Figura 1 - Citometria de fluxo representativa de hemócitos de operárias da subcasta forrageira de *Atta sexdens rubropilosa*, utilizando antissoro conjugado com FITC. (A) Histograma evidenciando população de fragmentos celulares, negativos para FITC (65,4%) e população de hemócitos positivos para FITC (34,6%). (B) Gráfico *dot plot* da população de fragmentos celulares. (C) Gráfico *dot plot* da população de hemócitos. (D) Perfil populacional dos hemócitos, sem eliminação dos fragmentos celulares. (FSC – tamanho das células e SSC - granulidade/complexidade interna das células).



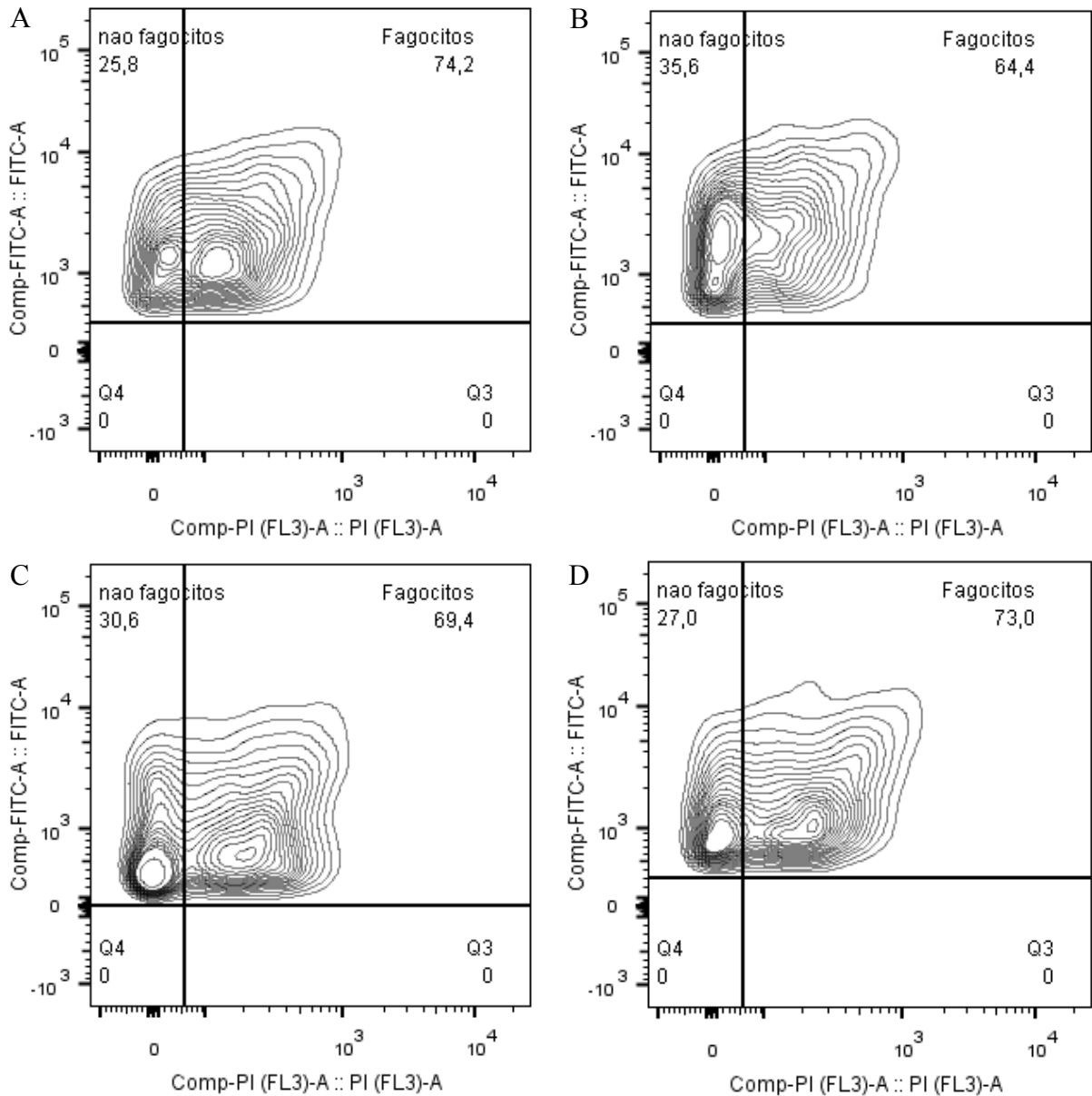
Fonte: A autora.

Figura 2 - Ensaio de fagocitose por microscopia confocal de varredura a laser dos hemócitos da subcasta soldado de *Atta sexdens rubropilosa*. Hemócitos e antissoro conjugado com FITC (verde) e bactérias *E. coli* com iodeto de propídeo (vermelho). (A) Plasmatócito fagocitando bactérias; (B) Granulócito fagocitando bactérias; (C) Ausência em pró-hemócito e (D) Ausência em oenocitóide.



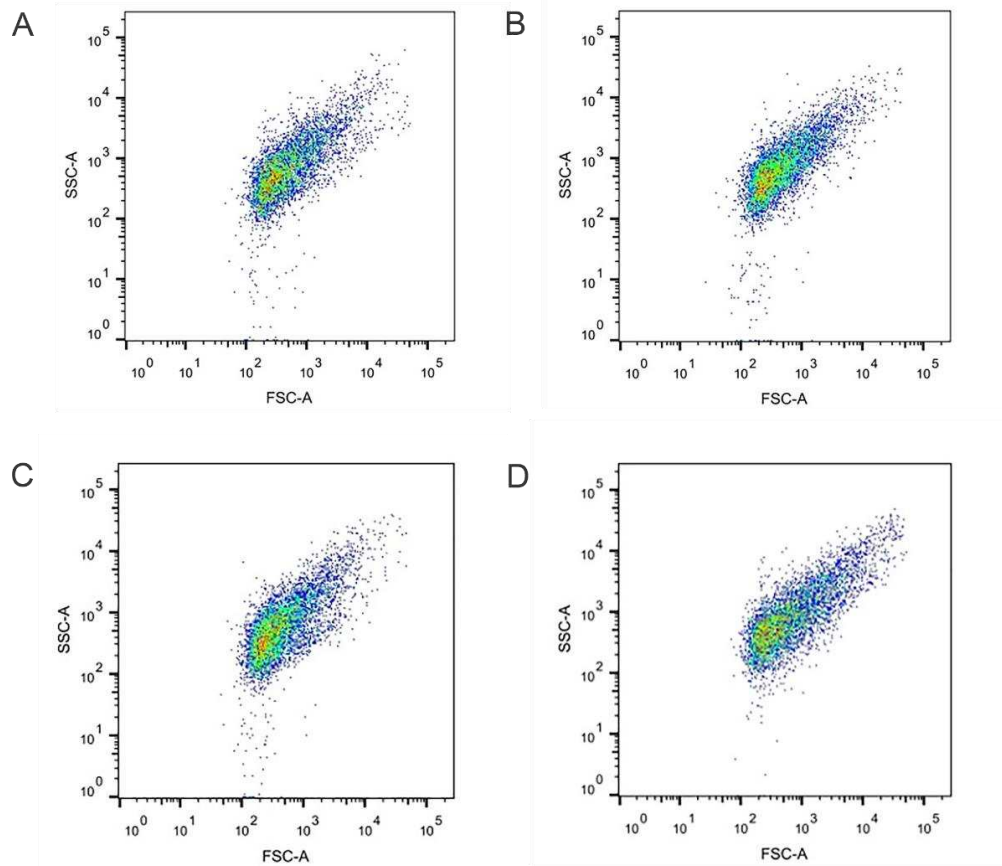
Fonte: A autora.

Figura 3 - Intensidade Média de Fluorescência do ensaio de fagocitose por citometria de fluxo dos hemócitos das subcastas de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, utilizando antissoro conjugado com FITC e bactérias *Escherichia coli* com iodeto de propídeo. (A) Soldados (74,2% de células fagocíticas); (B) Forrageira (64,4% de células fagocíticas); (C) Jardineira (69,4% de células fagocíticas) e (D) Lixeira. (73,0% de células fagocíticas).



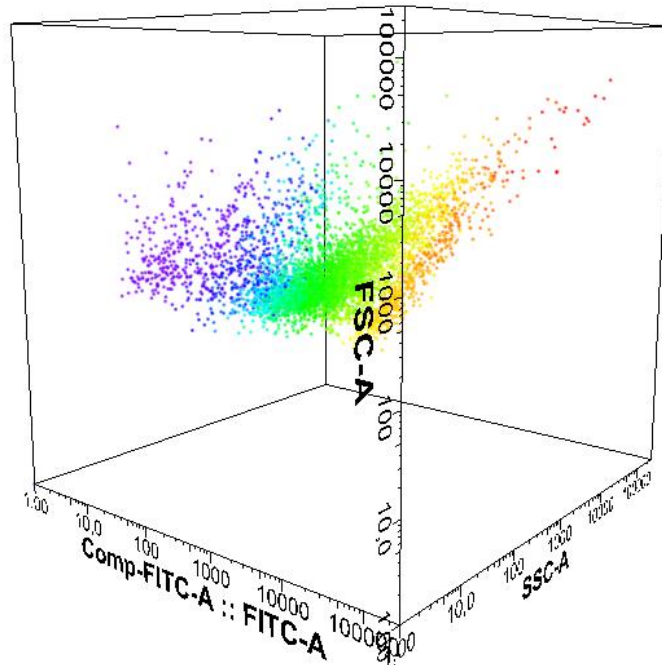
Fonte: A autora

Figura 4 - Análise do perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* por citometria de fluxo, obtidas pelos gráficos *dot plot*, mostrando os parâmetros de tamanho (FSC-A) vs complexidade celular (SSC-A), utilizando antissoro conjugado com FITC. (A) Jardineira; (B) lixeira; (C) Forrageira e (D) Soldado.



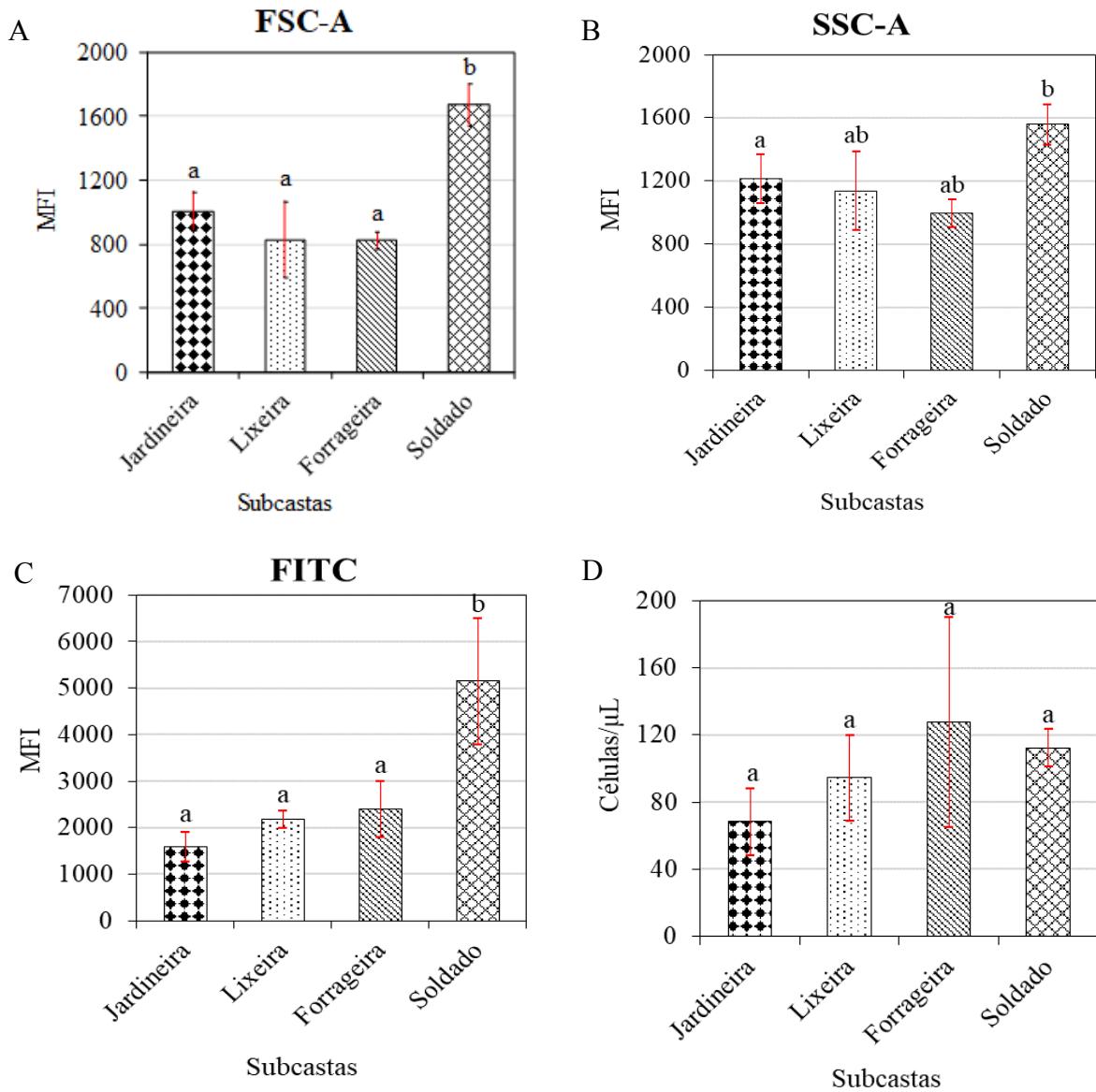
Fonte: A autora.

Figura 5 - Gráfico de dispersão em 3D de citometria de fluxo dos hemócitos da subcasta forrageira de *Atta sexdens rubropilosa*, apresentando os parâmetros de tamanho relativo (FSC-A) x complexidade celular (SSC-A) x fluorescência dos anticorpos conjugados com FITC, mostrando distintas subpopulações de hemócitos, representadas por cores diferentes.



Fonte: A autora.

Figura 6 - Intensidade Média de Fluorescência (MFI) e quantidade de hemócitos por subcasta de *Atta sexdens rubropilosa*. (A) Tamanho celular (FSC-A); (B) Complexidade interna/granulosidade (SSC-A); (C) Intensidade de fluorescência dos hemócitos conjugados à FITC; (D) Quantidade de hemócitos por microlímetro de acordo com cada subcasta. A linha em vermelho representa o desvio padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: A autora.

4. DISCUSSÃO

Morfologicamente, as quatro subcastas de *A. sexdens rubropilosa*, denominadas como jardineiras, lixeiras, forrageiras e soldados foram classificadas pelo comportamento no ninho e tamanho da cápsula cefálica, que variou entre 3,6 mm a 6,85 mm, apresentando alto padrão de polietismo como encontrado no capítulo 1.

Em todas as subcastas *A. sexdens rubropilosa* analisadas, os granulócitos e pró-hemócitos são os tipos mais abundantes circulando na hemolinfa, seguido pelos plasmatócitos e em menor número pelos oenocitóides e esferulócitos. Distribuição semelhante dos tipos de hemócitos tem sido observado em outros Hymenopteras como abelhas (AMARAL *et al.*, 2010; RICHARDSON *et al.*, 2018) e vespas (MANFREDINI; DALLAI; OTTAVIANI, 2008); Dipteras (HILLYER, CHRISTENSEN, 2002) e em Lepidopteras (DE ANDRADE *et al.*, 2003; VOGELWEITH *et al.*, 2016).

A imunocompetência dos insetos, principalmente no estágio larval do inseto, onde a quantidade de hemolinfa se apresenta de forma mais abundante, têm sido avaliada na contagem total de hemócitos (AMARAL *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010; HWANG *et al.*, 2015; STOEPLER *et al.*, 2013). Para isso, torna-se necessário se conhecer o sistema imune inato desses insetos ao longo do seu desenvolvimento, principalmente nos insetos sociais, onde o polimorfismo etário geralmente ocorre (RAVAIANO, 2017). Ao contrário das formigas forrageiras e soldados, as jardineiras, assim como as lixeiras, que embora estejam mais expostas à agentes patogênicos, apresentaram as menores quantidades de hemócitos totais circulando na hemolinfa, o que pode indicar que estas subcastas estão representadas por operárias mais velhas. Geralmente, quando alguns insetos envelhecem, ocorre uma redução da imunocompetência celular, relacionados ao envelhecimento do indivíduo e não a tarefa que realizam (RAVAIANO, 2017). Esse envelhecimento geralmente causa impactos em outros grupos de insetos, como nos mosquitos *A. aegypti* (HILLYER *et al.*, 2005) e *Anopheles gambiae* (KING, HILLYER, 2013).

A produção do antissoro policlonal contra hemócitos da formiga saúva-limão foi útil para eliminar a presença de uma grande quantidade de fragmentos celulares pelas análises prévias (Apêndice A). Nesse estudo, o antissoro policlonal produzido a partir dos hemócitos de *A. sexdens rubropilosa* permitiu diferenciar a população de interesse, que são os hemócitos totais presentes na hemolinfa da formiga, separando dos fragmentos celulares, constituindo-se dessa forma, em uma importante ferramenta para análises de citometria de fluxo. Os antissoros policlonais são caracterizados por um conjunto de grande variedade de moléculas

de imunoglobulinas originadas de diferentes linhagens de células B que reagem contra um antígeno específico, no entanto, cada uma identificando um epítipo diferente em um antígeno (LENZ, 2004; RUPPRECHT, NAGARAJAN, 2015). Além de eficiente na detecção de hemócitos, a produção do antissoro policlonal foi relativamente rápida e de baixo custo, apresentando maior facilidade técnica que seria necessária para produzir o antissoro monoclonal (ASCOLI, AGGELER, 2018; RUPPRECHT, NAGARAJAN, 2015), sendo mais eficaz devido à sua capacidade de se ligar a múltiplos epítipos em um antígeno (MARIAM *et al.*, 2015).

Os granulócitos e plasmatócitos de *Atta sexdens rubropilosa* apresentaram atividade na resposta imune celular em maior quantidade (~70%) na maioria das subcastas uma vez que realizam a fagocitose, assim como observado em outros insetos (LANOT *et al.*, 2001; LAVINE, STRAND, 2002), incluindo abelhas (AMARAL *et al.*, 2010; RAVAIANO, 2017).

Uma única população de hemócitos na hemolinfa de cada subcasta da operária da formiga foi identificada inicialmente. Esses resultados foram semelhantes aqueles em abelha *Apis mellifera*, sem populações distintas de hemócitos, utilizando mesmos parâmetros FSC versus SSC (DE GRAFF *et al.*, 2002). No entanto, utilizando outras técnicas, como microscopia de contraste de interferência e fluorescência, foi possível identificar diferentes subpopulações de hemócitos na abelha, o que pode ser explicado parcialmente pela pequena diferença de tamanho entre os hemócitos dentro de um único subconjunto dessas células (VAN STEENKISTE, 1988).

Distintas subpopulações nas subcastas de *A. sexdens rubropilosa* foram encontradas na análise gráfica de dispersão, representadas pelas diferentes cores, confirmando os resultados encontrados na microscopia de luz, confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura (Capítulo 1), onde cada subcasta apresentou cinco tipos morfológicos de hemócitos, identificados como pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos.

Duas subpopulações apresentaram tamanho celular, granulosidade/complexidade interna e intensidade de fluorescência maiores, indicando que provavelmente sejam as células mais complexas, como os plasmatócitos e granulócitos, que desempenham atividades na defesa imune dos insetos, encontradas com maior frequência na hemolinfa desta e de outras formigas (COSTA LEONARDO, CRUZ-LANDIM, 1978; GIANNOTTI, CAETANO, 1985). Algumas subpopulações estão sobrepostas, com padrões semelhantes, evidenciando FSC e SSC inferiores em relação às duas citadas anteriormente, não sendo possível inferir os distintos tipos celulares.

A presença de mais de uma população de hemócitos em outros insetos se apresentam de forma mais significativa, como em *B. mori* onde quatro subpopulações de hemócitos foram encontradas através das análises de citometria de fluxo associadas com vários marcadores moleculares, como iodeto de propídeo, proteína de fluorescência verde, anticorpos monoclonais e lectinas fluorescentes (NAKAHARA *et al.*, 2009). Estudos recentes para determinar o perfil dos hemócitos de *A. mellifera* através da citometria de fluxo revelaram quatro populações distintas, utilizando os marcadores fluorescentes como a lectina WGA (Aglutinina de germem de trigo-FITC), iodeto de propídeo e anexina V (MARRINGA *et al.*, 2014). Assim, o uso de mais marcadores fluorescentes além do anticorpo conjugado com FITC, pode distinguir os hemócitos de *A. sexdens rubropilosa* em mais subpopulações além das detectadas até presente momento.

Alguns fatores celulares específicos como a granulosidade/complexidade interna (SSC-A) pode modificar a função da quantidade de organelas, rugosidade do citoplasma e membranas intracelulares ou inclusões de material extracelular. Assim, tais características contribuem para a compreensão de que a classificação do tipo de célula em função do parâmetro SSC-A da citometria de fluxo pode, por vezes, não corresponder totalmente às observações de vacúolo ou grânulos na célula, caracterizados como um dos principais critérios de classificação visual (DONAGHY *et al.*, 2017). Células com características de SSC-A semelhantes como foram observadas na formiga *A. sexdens rubropilosa* podem possivelmente, pertencer a diferentes subpopulações, sendo, dessa forma, necessário uma avaliação das atividades celulares e os metabolismos intracelulares para caracterizar e discriminar de forma mais efetiva as populações celulares.

A subcasta de soldados possuem células maiores e com maior intensidade de fluorescência que jardineira, lixeira e forrageira. Por outro lado, os soldados apresentaram maior complexidade interna/granulosidade, com diferença significativa somente em relação à subcasta jardineira. Essas células presentes nos soldados, provavelmente correspondem aos plasmatócitos e granulócitos, que atuam na defesa imune, resultando em um sistema imunológico inato mais desenvolvido, que não está associada com o polietismo etário.

Apesar da maioria dos estudos com invertebrados, principalmente insetos, evidenciarem que a imunidade inata se torna menos eficiente com o avanço da idade (AMDAM *et al.*, 2005), estudos estão demonstrando que essa correlação pode não existir (ARMITAGE, BOOSMSMA, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2013). À medida que as formigas envelhecem, elas progridem para realizarem tarefas externas, como forrageio, estando em constante contato com patógenos (DE SOUZA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2011; WILSON,

1971). Na formiga-cortadeira *Acromyrmex subterraneus*, operárias direcionadas para exercerem atividades dentro do ninho necessitam de um investimento menor da defesa imune em relação as operárias que exercem atividades externas, economizando energia do sistema imunológico (DE SOUZA *et al.*, 2013). Em operárias mais velhas de *Acromyrmex octospinosus* há aumento significativo da atividade de fenoloxidade, enzima envolvida na melanização, gerada pela resposta imune (ARMITAGE, BOOSMSMA, 2010).

Estudos realizados com operárias *A. sexdens rubropilosa*, evidenciaram que as formigas que trabalham dentro dos ninhos, apresentaram maior taxa de encapsulamento do que aquelas que trabalham fora da colônia (RIBEIRO *et al.*, 2011). Nossos resultados corroboram o observado para operárias cortadeiras *A. octospinosus*, onde apresentam um sistema imunológico mais desenvolvido à medida que as operárias envelhecem (ARMITAGE, BOOSMSMA, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2013), embora essa não seja uma condição padrão, uma vez que o polietismo etário caracteriza-se como complexo e variável entre espécies.

De acordo com os estudos realizados recentemente, a quantidade de hemócitos não está relacionada com idade do inseto, como verificado em abelhas operárias, rainhas e zangões, que apresentaram uma redução considerável no número de hemócitos, regulada por fatores endócrinos (SCHMID *et al.*, 2008). Em abelhas operárias, Amdam *et al.*, (2004) e Amdam *et al.*, (2005) verificaram que a redução de hemócitos pode ser resultado da divisão do trabalho regulada pela vitelogenina e hormônio juvenil. Na libélula *Lestes viridis* sexualmente madura, a maior quantidade de hemócitos observadas em relação as recém-emergidas, pode ser regulada por condições específicas e não de acordo com a idade (ROLFF, 2001).

5. CONCLUSÃO

As formigas operárias de cada subcasta de *Atta sexdens rubropilosa* possuem cinco tipos morfológicos de hemócitos, que provavelmente correspondem aos pró-hemócitos, oenocitóides, esferulócitos, plasmatócitos e granulócitos.

Cinco hemócitos em cada subcasta de operárias da formiga foram encontrados, mas somente dois tipos de hemócitos correspondentes aos granulócitos e plasmatócitos podem estar presentes predominantemente na subcasta de soldados, conferindo como em outros insetos, um sistema imunológico inato mais ativo.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, I. M. R.; NETO, J. F. M.; PEREIRA, G. B.; FRANCO, M. B.; BELETTI, M. E.; KERR, W. E.; BONETTI, A. M.; UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. **Micron**, v. 41, n. 2, p. 123 - 129, 2010.
- AMDAM, G. V.; SIMÕES, Z. L.; HAGEN, A.; NORBERG, K.; SCHRODER, K.; MIKKELSEN, O.; KIRKWOOD, T. B.; OMHOLT, S. W. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 5, p. 767 - 773, 2004.
- AMDAM, G. V.; AASE, A. L. T.; SEEHUUS, S. C.; FONDRK, M. K.; NORBERG, K.; HARTFELDER, K. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 12, p. 939 - 947, 2005.
- ANDRADE, F. G. D.; NEGREIRO, M. C. C. D.; LEVY, S. M.; FONSECA, I. C. B.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, Â. M. F. Hemocyte quantitative changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by AgMNPV. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 279 - 284, 2010.
- ARMITAGE, S. A. O.; BOOMSMA, J. J. The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 7, p. 780 - 787, 2010.
- ARTEAGA BLANCO, L. A.; CRISPIM, J. S.; FERNANDES, K. M.; DE OLIVEIRA, L. L.; PEREIRA, M. F.; BAZZOLLI, D. M. S.; MARTINS, G. F. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell and tissue research**, v. 370, p. 153 - 168, 2017.
- ASCOLI, C. A.; AGGELER, B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. **Biotechniques**, v. 65, n. 3, p. 127 - 136, 2018.
- AZEVEDO, D. O. **Vitelogeninas em operárias de *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae): síntese, funções e regulação endócrina**. 2011, 59 f. Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa - MG, 2011.
- BÁLICO, L. D. L. D. L. **Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus fumigatus***. 2014. 178f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração em Biociências Aplicada à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2014.
- BALOG, J. Á.; HONTI, V.; KURUCZ, É.; KARI, B.; PUSKÁS, L. G.; ANDÓ, I.; SZEBENI, G. J. Immunoprofiling of *Drosophila* hemocytes by single-cell mass cytometry. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 243 - 252, 2021.
- BRYANT, W. B.; MICHEL, K. *Anopheles gambiae* hemocytes exhibit transient states of activation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 119 - 129, 2016.

CÁRDENAS, W.; DANKERT, J. R.; JENKINS, J. A. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides. **Fish & Shellfish Immunol**, v. 17, n. 3, p. 223 - 233, 2004.

COSTA LEONARDO, A. M.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo das células do sangue de *Camponotus rufipes* (Fabricius) (Hymenoptera: Formicidae). **Stud. Entomol.**, v. 20, p. 235 - 251, 1978.

DE ANDRADE, F. G.; DE NEGREIRO, M. C. C.; GREGÓRIO, E. A.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, Á. M. F Hemocytes of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. **Acta Microscopica**, v. 12, n. 1, p. 59 - 64, 2003.

DE GRAAF, D. C.; DAUWE, R.; WALRAVENS, K.; JACOBS, F. J. Flow cytometric analysis of lectin-stained haemocytes of the honeybee (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 33, n. 6, p. 571 - 579, 2002.

DE SOUZA, D. J.; LENOIR, A.; KASUYA, M. C. M.; RIBEIRO, M. M. R.; DEVERS, S.; DA CRUZ COUCEIRO, J.; DELLA LUCIA, T. M. C. Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 28, p. 182 - 187, 2013.

DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas-cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. 262 p.

DONAGHY, L.; HONG, H. K.; PARK, K. I.; NOBUHISA, K.; YOUN, S. H.; KANG, C. K.; CHOI, K. S. Flow cytometric characterization of hemocytes of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 66, p. 289 - 299, 2017.

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; MEHRZAD, J.; MASSART-LEEN, A. M.; BURVENICH, C. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. **Journal of Dairy science**, v. 86, n. 3, p. 828 - 834, 2003.

DOUBLET, V.; POESCHL, Y.; GOGOL-DOERING, A.; ALAUX, C.; ANNOSCIA, D.; AURORI, C.; BARRIBEAU, S. M.; BEDOYA-REINA, O. C.; BROWN, M. J. F.; BULL, J. C.; FLENNIKEN, M. L.; GALBRAITH, D. A.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; GROSSE, I.; HOLT, H. L.; HULTMARK, D.; LATTORFF, H. M. G.; CONTE, Y. L.; MANFREDINI, F.; MCMAHON, D. P.; MORITZ, R. F. A.; NAZZI, F.; NIÑO, E. L.; GROZINGER, C. M. Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 1 - 17, 2017.

DU, J.; ZHU, H.; REN, Q.; LIU, P.; CHEN, J.; XIU, Y.; YAO, W.; MENG, Q.; GU, W.; WANG, W. Flow cytometry studies on the *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes subpopulations and immune responses to novel pathogen spiroplasma MR-1008. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 795 - 800, 2012.

DUDZIC, J. P.; KONDO, S.; UEDA, R.; BERGMAN, C. M.; LEMAITRE, B. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. **BMC biology**, v. 13, n. 81, p. 1 - 16, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, p. 1039 - 1042, 2011.

FONSECA, V. B.; CRUZ, B. P.; DA SILVA, S. S.; SOARES, M. P.; CAÑEDO, A. D.; VARGAS, M. A.; SANDRINI, J. Z. Morphological characterization of hemocytes of the brown mussel *Perna perna*: An update. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 120, p. 139 - 141, 2022.

FRANCO, A. A.; PERES, A. R.; SOUZA, M. F. P.; QUEIROZ, M. S.; ASSIS, J. M. F. Ação de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos simbiotes das formigas-cortadeiras. **Engenharia Ambiental-Espírito Santo do Pinhal**, v. 10, n. 1, p.103 - 113, 2013.

GÁBOR, E.; CINEGE, G.; CSORDÁS, G.; RUSVAI, M.; HONTI, V.; KOLICS, B.; TÖRÖK, T.; WILLIAMS, M. J.; KURUCZ, É.; ANDÓ, I. Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 109, p. 103701, 2020.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**, v. 10, Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GIANNOTTI, E.; CAETANO, F. H. A comparative study of the hemocytes of *Atta laevigata* adults (Formicidae: Myrmicinae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 8, n. 1, p. 37 - 45, 1985.

HILLYER, J. F.; CHRISTENSEN, B. M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochemistry and cell biology**, v. 117, p. 431 - 440, 2002.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; FUCHS, J. F.; BOYLE, J. P.; CHRISTENSEN, B. M. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 39 - 51, 2005.

HONG, H. K.; DONAGHY, L.; CHOI, K. S. Flow cytometric characterization of hemocytes of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve, 1846) and effects of air exposure stresses on hemocyte parameters. **Aquaculture**, v. 506, p. 401 - 409, 2019.

HONTI, V.; CSORDÁS, G.; KURUCZ, É.; MÁRKUS, R.; ANDÓ, I. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 1, p. 47 - 56, 2014.

HULTMARK, D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 1, p. 12 - 19, 2003.

HWANG, S.; BANG, K.; LEE, J.; CHO, S. Circulating hemocytes from larvae of the Japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128519, 2015.

- HYSTAD, E. M.; SALMELA, H.; AMDAM, G. V.; MÜNCH, D. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184108, 2017.
- IBRAHIM, A. S. H. Predation activity of ants (Hymenoptera: Formicidae) on sugar beet insect pests. **The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)**, v. 16, n. 1, p. 7 - 13, 2020.
- JACCOUD, D. B. **Formigas-cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas**. Brasília: IBAMA. (Série Meio Ambiente em debate, 34), 2000. 60 p.
- KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods**. Oxford: Scion Publishing Ltd, 2008. 606 p.
- KING, J. G.; HILLYER, J. F. Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. **BMC Biology**, v. 11, p. 1 - 15, 2013.
- KLADCHENKO, E. S.; ANDREYEVA, A. Y.; KUKHAREVA, T. A.; SOLDATOV, A. A. Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 98, p. 1030 - 1032, 2020.
- KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 225 - 232, 2008.
- LANOT, R.; ZACHARY, D.; HOLDER, F.; MEISTER, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. **Developmental biology**, v. 230, n. 2, p. 243 - 257, 2001.
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295 - 1309, 2002.
- LENZ, G. **Métodos Imunológicos**. Biofísica, p. 1 - 14, 2004.
- LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 3, p. 219 - 229, 2001.
- MANFREDINI, F.; DALLAI, R.; OTTAVIANI, E. Circulating hemocytes from larvae of the paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). **Tissue and Cell**, v. 40, n. 2, p. 103 - 112, 2008.
- MARIAM, S. S.; OOI, C. W.; TAN, W. S.; JANNA, O. A.; ARBAKARIYA, A.; TEY, B. T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 144, p. 133 - 138, 2015.
- MARRINGA, W. J.; KRUEGER, M. J.; BURRITT, N. L.; BURRITT, J. B. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e108486, 2014.
- MEISTER, M.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The Antimicrobial Host Defense of *Drosophila*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 248, p. 17 - 36, 2000.

NAKAHARA, Y.; SHIMURA, S.; UENO, C.; KANAMORI, Y.; MITA, K.; KIUCHI, M.; KAMIMURA, M. Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 439 - 448, 2009.

NUNES, C. C. C. **Caracterização citoquímica e ultraestrutural dos hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitada pela vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

OLIVER, J. D.; LOY, J. D.; PARIKH, G.; BARTHOLOMAY, L. Comparative analysis of hemocyte phagocytosis between six species of arthropods as measured by flow cytometry. **Journal of invertebrate pathology**, v. 108, n. 2, p. 126 - 130, 2011.

PARRINO, V.; COSTA, G.; CANNAVÀ, C.; FAZIO, E.; BONSIGNORE, M.; CONCETTA, S.; PICCIONE, G.; FAZIO, F. Flow cytometry and micro-Raman spectroscopy: Identification of hemocyte populations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) from Faro Lake and Tyrrhenian Sea (Sicily, Italy). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 1 - 8, 2019.

PIEPERS, S.; DE VliegHER, S.; DEMEYERE, K.; LAMBRECHT, B. N.; DE KRUIF, A.; MEYER, E.; OPSOMER, G. Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 626 - 631, 2009.

RAVAIANO, S. V. **Estudo da morfologia do coração, dos hemócitos e dos efeitos do imidacloprido e da infecção bacteriana nas populações de hemócitos de *Melipona quadrifasciata***. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa - MG, 2017.

REIS, V. M.; CRUZ, G. B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M.; FERREIRA, A.C.; REIS, F. B.; RIBEIRO, J. R. A.; SALLES, J. F.; WEBER, O. B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30), 1997. 11p.

RIBEIRO, M. M. R.; DE SOUZA, D. J.; GANDRA, L. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Immunocompetence and energetic metabolism in different groups of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 58, n. 1, p. 207 - 215, 2011.

RICHARDSON, R. T.; BALLINGER, M. N.; QIAN, F.; CHRISTMAN, J.W.; JOHNSON, R. M. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. **Apidologie**, v. 49, p. 397 - 410, 2018.

RIVAS, A. L.; QUIMBY, F. W.; BLUE, J.; COKSAYGAN, O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 13, n. 5, p. 399 - 407, 2001.

ROLFF, J. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, n. 12, p. 2176 - 2180, 2001.

RUPPRECHT, C.; NAGARAJAN, T. **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention**. v. 2, 1^a ed., Academic Press, 2015. 384 p.

SCHMID, M. R.; BROCKMANN, A.; PIRK, C. W.; STANLEY, D. W.; TAUTZ, J. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 2, p. 439 - 444, 2008.

SEQUEIRA, T.; VILANOVA, M.; LOBO-DA-CUNHA, A.; BALDAIA, L.; ARALACHAVES, M. Flow Cytometric analysis of molt-related changes in hemocyte type in male and Female *Panaeus japonicus*. **The Biological Bulletin**, v. 189, n. 3, p. 376 - 380, 1995.

SIMONET, P.; DUPORT, G.; GAGET, K.; WEISS-GAYET, M.; COLELLA, S.; FEBVAY, G.; CHARLES, H.; VIÑUELAS, J.; HEDDI, A.; CALEVRO, F. Direct flow cytometry measurements reveal a fine-tuning of symbiotic cell dynamics according to the host developmental needs in aphid symbiosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19967, 2016.

STOEPLER, T. M.; CASTILLO, J. C.; LILL, J. T. ELEFThERIANOS, I. Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70978, 2013.

VAN STEENKISTE, D. **De hemocyten van de honingbij (*Apis mellifera* L.): typologie, bloedbeeld en cellulaire verdedigingsreacties**, Ph.D.-thesis, University of Ghent., 1988. 285 p.

VIEIRA, G. C.; DA SILVA, P. M.; BARRACCO, M. A.; HERING, A. F.; ALBUQUERQUE, M. C. P.; DA ROSA COELHO, J.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L.; ROSA, R. D.; PERAZZOLO, L. M. Morphological and functional characterization of the hemocytes from the pearl oyster *Ptereria hirundo* and their immune responses against *Vibrio* infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 750 - 758, 2017.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nature immunology**, v. 6, n. 1, p. 17 - 21, 2005.

VOGELWEITH, F.; MORET, Y.; MONCEAU, K.; THIÉRY, D.; MOREAU, J. The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. **Journal of Insect Physiology**, v. 88, p. 33 - 39, 2016.

WILSON, E. O. **The insect societies**, Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 1971. 548 p.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) I. The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 7, p. 143 - 156, 1980.

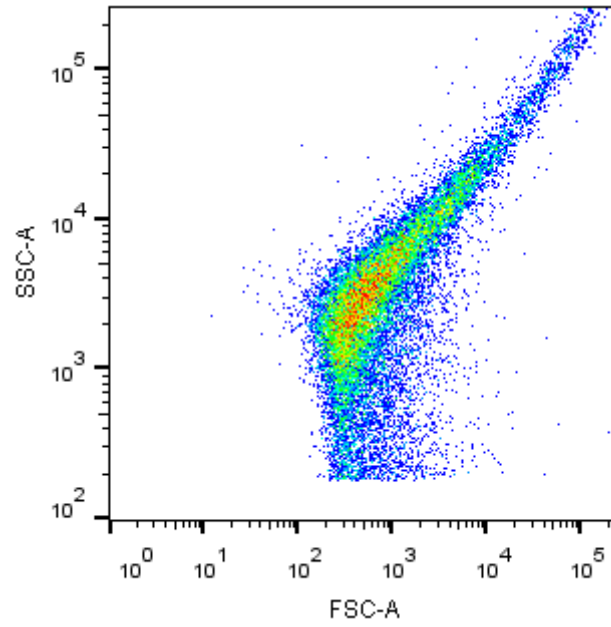
CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é a primeira caracterização dos hemócitos circulantes na hemolinfa das formigas operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, realizada através de diferentes técnicas de microscopia e principalmente por citometria de fluxo.

Como perspectivas, estudos complementares sobre ativação, diferenças fisiológicas provocadas por hormônios e diferenças de expressões gênicas, assim como o desenvolvimento de marcadores específicos, produção de anticorpos monoclonais associados com imunofenotipagem pela citometria de fluxo são necessários para otimizar a classificação dos hemócitos da espécie. Além disso, é necessário avaliar os tipos de hemócitos das fêmeas nas condições pré e pós-cópula, bem como dos indivíduos imaturos em diferentes subcastas.

APÊNDICE

A - Gráfico *dot plot* da população de hemócitos de *Atta sexdens rubropilosa*, com grande quantidade de fragmentos celulares.



Fonte: A autora.