

**Análise proteômica aplicada à ontogenia,
comportamento e aprendizagem em abelhas**

Liudy Garcia Hernández

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

Brasília, Fevereiro de 2009

A minha Família e Esposo

Agradecimentos

Quero fazer um parêntese e começar agradecendo ao primeiro Brasileiro que eu conheci e o primeiro responsável de que eu me encontre aqui defendendo esta tese. Esse brasileiro foi um amigo verdadeiro durante todos estes anos e também colaborador do projeto com a parte de MudPIT. Agradeço muito a Ricardo Bastos.

Para todas as pessoas e instituições que colaboraram com este trabalho meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

Primeiramente meu orientador o Professor Dr. Marcelo Valle pela oportunidade e confiança para desenvolver este projeto. Por suas idéias sempre inteligentes, as oportunas sugestões e as correções, mas sobre tudo por permitir-me crescer como profissional.

Para o Professor Dr. Carlos André que esteve incondicionalmente disponível para esclarecer minhas dúvidas, dar dicas, sugestões e pelo carinho e confiança que sempre me transmitiu.

Para o Professor Dr. Foued e à Luciana por contribuir diretamente com suas idéias neste projeto, pelo que me ensinaram sobre o maravilhoso mundo das abelhas. Assim como para Professora Dra. Deysi e Mauricio na parte de aprendizagem.

Para Manoel Silva e o Apiário Vereda Rosa pelas abelhinhas *Apis mellifera*.

Para Carlos Garcia pela grande contribuição nas análises dos géis, pela amizade e o carinho.

Para Gabriel que também faz parte deste projeto pela colaboração e disposição de sempre ajudar, o futuro esta nele agora.

Agradecimentos especiais Para Dr. Jaime Paba e Dr. Sébastien pela amizade, o tempo e a paciência para me ensinar o ABC da Eletroforese bidimensional quando apenas eu falava Português.

A professora Sonia Bão, Juliana e Keshler pelo apoio com a parte de Microscopia eletrônica.

Para os Colaboradores na parte de MudPIT o Professores Dr. Yates, Dr. Bingwen, Dra. Natalia Martins e Dr. Roberto Togawa.

Para os Professores Drs. do LBQP Consuelo, Pedro, Mariana e Wagner pela amizade, solidariedade, correções, apoio e carinho.

Aos técnicos do LBQP Antonio e Nuno pela disposição e colaboração. Especialmente quero agradecer a Antonio sua amizade, bondade e carinho.

Para os colegas do LBQP Adriana, Rafael, Aline, Elaine, Anne, Michelle, Camila, Alex, Karina, Liz, Flavia, Carol, Fabio, Rayner, Jaques pela cooperação e por fazer o dia a dia mais agradável no Lab.

A meus amigos Latino-americanos, sobre tudo aqueles que me brindaram amizade sincera, pela família que formamos, por fazer minha vida mais agradável aqui. Agradeço especialmente a Caro Santamaría, Sebas, Carlos U., Virginie, Dianis, Jimmy, Carito, Carolina Sanchez, Nelson, Sergio y Claudia.

A Fabiane pela imensa ajuda que me deu corrigindo a ortografia.

A minha amiga e irmã brasileira Ingrid pela amizade, carinho e ajuda com o Português.

A meus colegas do CEADEN, CIGB e minhas amigas de sempre pelo apoio, incentivo e amizade.

A TWAS-CNPQ pelo incentivo de colaboração entre países e o financiamento de minha bolsa..

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto e à FINEP pelo apoio em infraestrutura aos laboratórios.

A Universidade de Brasília e Departamento de Biologia Celular pela oportunidade para realizar este projeto e pelo apoio financeiro.

A minha querida e amada família especialmente meus Paes e irmã pelo incentivo, preocupação e amor de sempre, sobre tudo nestes anos de separação.

Por ultimo quero agradecer quem compartilha todos meus sonhos, quem foi o primeiro em me apoiar sabendo que nos esperavam anos de separação, pela paciência, compreensão, sugestões na discussão e por o amor que compartilhamos, agradeço profundamente a meu esposo Jorge.

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1 <i>Abelhas operárias nutridora e campeira</i>	1
1.1.1 <i>Neurobiologia da abelha, comportamento e aprendizagem</i>	3
1.1.2 <i>Aprendizagem por condicionamento operante</i>	4
1.1.3 <i>Estudos comparativos entre subcastas de abelhas</i>	5
1.2 <i>Proteômica</i>	6
1.2.1 <i>Espectrometria de massas</i>	7
1.2.2 <i>MudPIT (Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas)</i>	10
2 Objetivo	13
2.1 <i>Objetivo</i>	13
2.2 <i>Metas</i>	13
2.3 <i>Justificativa</i>	13
3 Materiais e métodos	15
3.1 <i>Coleção de insetos e dissecação de cérebros</i>	15
3.2 <i>Condicionamento operante</i>	15
3.3 <i>Preparação da amostra</i>	16
3.4 <i>Eletroforese bidimensional (2-DE)</i>	16
3.5 <i>Detecção de fosfoproteínas</i>	17
3.6 <i>Análise de Imagens</i>	17
3.7 <i>Digestão de proteínas e espectrometria de massas</i>	18
3.8 <i>Identificação de proteínas</i>	18
3.9 <i>Análise de imunocitoquímica e microscopia eletrônica</i>	19
3.10 <i>Identificação de proteínas por MudPIT</i>	19
3.11 <i>Análise dos espectros de massas MS/MS e categorização de proteínas</i>	20

3.12 Avaliação da expressão diferencial de proteínas usando o teste G na contagem espectral	21
4 Resultados e discussão	23
4.1 Extração de proteínas e 2-DE	23
4.2 Identificação de Proteínas	24
4.3 Expressão diferencial de proteínas por 2-DE e função biológica	30
4.4 Análise qualitativa das proteínas totais identificadas por MudPIT	37
4.5 Diferenças proteômicas quantitativas entre cérebros de nutridora e de campeira	39
4.6 Expressão diferencial de proteínas neurais específicas no cérebro das abelhas nutridoras e campeiras	47
4.7 Comparação das metodologias 2-DE e MudPIT	48
4.8 Análises proteômica e fosfoproteômica preliminares em <i>Melipona quadrifasciata</i>	50
5 Conclusões	57
6 Perspectivas	59
7 Referências	60
8. Anexos	69

Índice de Figuras

Figura 1. Castas de abelhas, A: Rainha, B: Zangão, C: Operaria	2
Figura 2. Estruturas do cérebro da abelha	3
Figura 3. Abelha da espécie <i>Melipona quadrifasciata</i> em treinamento.	5
Figura 4. Esquema representativo de identificação de proteínas em banco de dados pela estratégia de Impressão Digital por Massa de Peptídios (Peptide Mass Fingerprinting - PMF).	10
Figura 5. Esquema representativo de identificação de proteínas em banco de dados pela estratégia de Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas (Multidimensional Protein Identification Technology - MudPIT).	12
Figura 6. Padronização dos géis 2-DE de cérebro de abelhas no intervalo de pH 3-10.	23
Figura 7. Géis 2-DE representativos (pI 3-10, 10% T).	24
Figura 8. Comparação de proteomas cerebrais de abelhas nutridoras e campeiras por 2-DE (pI 4-7).	25
Figura 9. Regiões ampliadas do gel 2-DE mostrando isoformas de proteínas expressas diferencialmente.	29
Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de três regiões de cérebro de abelha imunomarcadas com anti-MRJP1 e ouro coloidal.	31
Figura 11. Imagem de microscopia eletrônica mostrando imunomarcção na região intercelular dos corpos cogumelares.	32
Figura 12. Regiões ampliadas do gel 2-DE mostrando isoformas da glutamina sintetase 2	36
Figura 13. Exemplo representativo dos espectros de massas MALDI-TOF da digestão trípica de dois spots identificados como proteína semelhante à glutamina sintetase 2, isoforma C.	36
Figura 14. Esquema representativo da classificação nas principais categorias da KOG.	38
Figura 15. Frequência das proteínas segundo as categorias do catálogo KOG.	40
Figura 16. Perfil 2-DE de proteínas cerebrais da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i>	51
Figura 17. Perfil 2-DE de proteínas cerebrais da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i> usando IPGs de faixa acida de pH 4-7.	52
Figura 18. Resultado da identificação pela estratégia PMF usando o programa Mascot.	53

Figura 19. Resultado da identificação pela estratégia PFF usando o programa Mascot.

54

Figura 20. Perfil 2-DE de fosfoproteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata* usando IPGs de faixa de pH 4-7.

56

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1.</i> Spot analisados por MALDI-TOF MS e identificados na busca em banco de dados não redundante NCBI usando o programa Mascot.	26
<i>Tabela 2.</i> Quantidade total de proteínas para cada grupo.	37
<i>Tabela 3.</i> Exemplos de proteínas seletivamente em cada grupo de operaria.	43
<i>Tabela 4.</i> Proteínas que coincidiram para ser diferencialmente expressas por ambas as metodologias 2-DE e MudPIT.	49

Abreviaturas

- CID.** Dissociação induzida por colisão (*Collision induced dissociation*)
- 2-DE.** Eletroforese bidimensional (*Two-dimensional electrophoresis*)
- d.i.** Diâmetro interno
- dSCP2.** Proteína sarcoplasmática ligante de cálcio 2 de *Drosophila* (*Drosophila melanogaster sarcoplasmic calcium-binding protein-2*)
- DTT.** Ditriotreitól
- ESI-MS.** Espectrometria de massas de ionização por eletronebulização (*Electrospray ionization mass spectrometry*)
- GO.** Ontologia de genes (*Gene Ontology*)
- GR.** Geléia real
- GS.** Glutamina sintetase (*glutamine synthetase*)
- IEF.** Focalização isoelétrica (*Isoelectric focusing*)
- IPG.** Gradiente imobilizado de pH (*Immobilized pH gradient*)
- JH.** Hormônio juvenil (*Juvenile hormone*)
- KOG.** Grupos de genes ortólogos eucarióticos (*EuKaryotic Orthologous Groups*)
- LC-MS.** Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (*Liquid chromatography mass spectrometry*).
- MALDI-TOF MS.** Espectrometria de massas por desorção e ionização a laser assistida por matriz (*Matrix assisted laser desorption Ionization time of flight mass spectrometry*)
- MRJPs.** Proteínas principais da geléia real (*major royal jelly proteins*)
- MudPIT.** Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (*Multidimensional Protein Identification Technology*)
- PAGE.** Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PFF.** Digital de fragmentos peptídicos (*Peptide Fragment Fingerprinting*)
- PMF.** Digital de massas peptídicas (*Peptide Mass Fingerprinting*)
- SDS.** Dodecil sulfato de sódio
- Spectral Count:** Contagem espectral
- TBS.** Solução salina tamponada por Tris (*Tris buffered saline solution*)
- TFA.** Ácido trifluoroacético

Resumo

A abelha da espécie *Apis mellifera* é um inseto social que apresenta comportamentos complexos e integrados. As mudanças no comportamento ocorrem a partir da diferenciação ontogenética e comportamental de nutridora para campeira. Neste trabalho, proteomas do cérebro das abelhas nutridora e campeira foram comparados através de eletroforese bidimensional em gel dentro da faixa de pH de 4-7 e análise por MudPIT, a fim de encontrar proteínas relacionadas ao desenvolvimento ontogenético e comportamental. Vinte proteínas diferencialmente expressas foram detectadas por análise computacional das imagens dos géis e identificadas por PMF utilizando espectrometria de massas MALDI-TOF. O cérebro de nutridora apresentou alta expressão das proteínas principais da geléia real (MRJP1, MRJP2 e MRJP7), que estão relacionadas com a determinação de castas e funções sociais durante a diferenciação das larvas. Análise por imunocitoquímica e microscopia eletrônica revelaram MRJP1 no citoplasma de células cerebrais, aparentemente ao longo de filamentos do citoesqueleto, nos lobo antenal, lobo óptico e corpos cogumelares. MRJP1 também foi encontrada em espaços intercelulares entre células dos corpos cogumelares, indicando que é uma proteína secretada. Outras proteínas implicadas na síntese protéica e funções putativas no sistema olfativo também foram mais expressas em cérebro de nutridora. Em campeiras experientes foram mais expressas proteínas envolvidas no metabolismo energético, transportes de ferro e metabolismo de neurotransmissores. Expandindo-se a análise proteômica pela estratégia de MudPIT, o primeiro mapeamento em grande escala do proteoma cerebral da abelha operária da espécie *A. mellifera* foi alcançado. Identificou-se um total de 2.742 proteínas a partir de amostra de cérebros de abelha operárias, nutridora e campeira, sendo que 17% das proteínas totais foram encontradas como diferencialmente expressas por amostragem estatística de contagem espectral e teste-G. A nutridora apresentou expressão aumentada no cérebro de proteínas envolvidas na tradução, estrutura ribossomal e biogênese (14,5%), consideravelmente maior que a operaria campeira (1,8%). Em campeiras as proteínas envolvidas na produção e conversão de energia foram muito abundantes, mostrando ampla diferença neste conjunto de proteínas (17%) em relação à operaria nutridora (0,6%). Ambas as metodologias foram coincidentes nos resultados de categorização e expressão diferencial de nove proteínas. Em experimentos relacionados à aprendizagem operante, foram comparados mapas proteômicos e fosfoproteômicos por 2-DE de extratos

cerebrais da abelha mandaçaia (*Melípona quadrifasciata*), identificando-se uma isoforma da proteína arginina quinase como mais expressa no cérebro das abelhas treinadas por condicionamento operante.

Abstract

The honey bee (*Apis mellifera*) is a social insect that shows complex and integrated behaviors. For instance, *A. mellifera* behavior changes upon the ontogenetic differentiation from nurse to forager worker subcastes. In this work, brain proteomes of nurses and foragers were compared by two-dimensional gel electrophoresis (2DE) within pH range of 4–7 and MudPIT analysis in order to find proteins related to such a ontogenetic and behavioral development. Twenty differentially expressed proteins were detected by gel image computational analysis, and identified by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. Nurse brain showed increased expression of major royal jelly proteins (MRJP1, MRJP2 and MRJP7), which are related to determination of castes during the honey bee larvae differentiation. Immunocytochemistry and electron microscopy showed that MRJP1 was localized in the cytoplasm of brain cells, seemingly along filaments of the cytoskeleton, in the antennal lobe, optical lobe and mushroom body. MRJP1 was also found in intercellular spaces between cells in mushrooms bodies, indicating that it is a secreted protein. Other proteins implicated in protein synthesis and putative functions in the olfactory system were also up-regulated in the nurse brain. Experienced foragers overexpressed proteins possibly involved in energy production, iron binding, metabolic signalling and neurotransmitter metabolism. As an expansion of the proteomics analysis, large-scale mapping of worker honey bee brain proteome was achieved by *MudPIT* analysis. An excess of 2742 proteins were identified from forager and nurse honey bee brain samples, with 17% of total proteins found to be differentially expressed by spectral count sampling statistics and G-test. Nurse brain showed increased expression of proteins implicated in translation, ribosomal structure and biogenesis (14.5 %), in comparison with forager (1.8%). Experienced foragers overexpressed proteins involved in energy production and conversion, showing extensive difference in this set of proteins (17 %) in relation to nurse subcaste (0.6%). Both methodologies (MudPIT and 2DE) provided coincident results of categorization and differential expression of nine proteins. Regarding operant learning experiments, proteomic and phosphoproteomic 2-DE maps of brain extracts from mandaçaia bee (*Melipona quadrifasciata*) were compared. A single isoform of arginine kinase was identified as over expressed in the brain of bees trained by operant conditioning.

1. Introdução

Estudar diversas sociedades animais permite a análise, em termos moleculares, dos papéis de convergência e de conservação na evolução social. É razoável supor que a evolução do comportamento social é movida, em parte, por mecanismos conservados que controlam as respostas aos estímulos do ambiente. Os sinais sociais, tal como outros estímulos ambientais, transmitem informações críticas para a sobrevivência e a reprodução animal ^[1]. Os princípios de como os indivíduos respondem ao seu ambiente são semelhantes em vertebrados e invertebrados e envolvem estruturas sensoriais, cascatas da transdução de sinal e diversas formas de plasticidade neural ^[2, 3].

As abelhas são, dentre os himenópteros, os insetos mais complexos do ponto de vista comportamental. Em relação à abelha *A. mellifera*, observa-se que essa complexidade etológica é acompanhada por um sistema nervoso simples, comparado ao de organismos superiores, mas que possibilita habilidade de aprendizagem, memória e um comportamento social organizado ^[4].

A divisão de trabalho entre operárias em função da idade é encontrada em sociedades de insetos e é baseada nos padrões de desenvolvimento comportamental de cada indivíduo ^[5]. Para o desenvolvimento de abelha nutridora para campeira, por exemplo, as adaptações são moduladas pelo meio ambiente, que causa alterações na expressão gênica cerebral, na neuroquímica e na morfologia do sistema nervoso ^[6]. As bases moleculares de comportamentos sociais permanecem obscuras, visto que existem poucos relatos sobre genes em que a expressão difere nas abelhas operárias em função da idade (polietismo) ^[6].

A abelha é um organismo ideal para investigações sobre aprendizagem, pois apresenta um vasto repertório comportamental, servindo como modelo para estudos dos níveis de complexidade das funções cognitivas. Contendo aproximadamente cerca de 960.000 neurônios, com um volume de 1 mm³, o cérebro da abelha é equipado com sistemas sensoriais sofisticados cujos mecanismos fundamentais não diferem drasticamente dos vertebrados como se supõe.

1.1 Abelhas operárias nutridora e campeira

Existem três tipos de indivíduos dentro do sistema de castas de abelhas da espécie *Apis mellifera*: a operária, a rainha e o zangão (Figura 1). A casta operária é composta por indivíduos menores com cerca de 10-15 mm de comprimento, fêmeas não

desenvolvidas reprodutivamente e responsáveis pela execução das tarefas da colônia. A rainha, tipicamente de 18-20 mm de comprimento, é a fêmea plenamente fértil especializada para a reprodução. O zangão, de 15-17 mm, é o macho cujo único objetivo é copular com a rainha.



Figura 1. Castas de abelhas. A: Rainha, B: Zangão, C: Operária.

As operárias possuem um tempo médio de vida de 45 dias e máximo de até 320 dias, dependendo da localização geográfica, da estação do ano e do genótipo, podendo ser caracterizadas conforme a função exercida dentro da colônia ^[7]. Nos primeiros dias de vida, executam serviços de faxina e, quando as glândulas que produzem GR já estão desenvolvidas, passam a trabalhar como nutrizes (operária nutridora), alimentando as larvas. Quando começam a produzir cera, estão aptas a assumir tarefas como a construção dos favos. Por último, quando desenvolvem as glândulas de veneno, as operárias passam a exercer funções de guarda, sinalização e forrageamento (operária campeira) ^[7].

Na colônia, tanto a divisão de trabalho quanto a plasticidade exibida pelas operárias adultas são reguladas hormonalmente. O hormônio envolvido na diferenciação das castas de abelhas mais bem estudado é o hormônio juvenil (JH) que é conhecido como regulador do crescimento, desenvolvimento, metamorfose e muitos aspectos do comportamento, na maioria dos insetos avançados. JH é secretado pelo “corpora allata”, um órgão globular, encontrado nas laterais do esôfago das larvas e adultos. O “corpora allata” está conectado, através de nervos, a dois outros órgãos endócrinos, “corpora cardiaca” e células neurosecretoras do cérebro ^[7]. Quando níveis de hormônio juvenil aumentam prematuramente no cérebro ^[8, 9], as abelhas passam a forragear mais cedo ^[10]. O hormônio juvenil serve como marcapasso no desenvolvimento comportamental ^[11].

As operárias nutridoras possuem comportamento higiênico bem desenvolvido, removendo pertencentes da ninhada que estejam doentes ou contaminados para fora da colônia ^[12]. Também cuidam das larvas, nutrindo-as com geléia real ^[7]. As operárias campeiras forrageiam, navegando vários quilômetros, visitando centenas de flores, de

maneira rápida e eficiente em busca de comida, aprendendo e memorizando os locais de interesse ^[10].

A divisão de trabalho é um polietismo temporal flexível ^[13] e, também, um processo altamente regulado pela taxa de hormônio circulante ^[11], por reações neuroquímicas ^[14] e por mudanças estruturais do cérebro ^[15].

1.1.1 Neurobiologia da abelha, comportamento e aprendizagem

As abelhas têm sido usadas em uma série de estudos etológicos e comportamentais tais como navegação, organização social e aprendizagem ^[16, 17, 18, 19, 20]. Este inseto tem sistemas nervoso e sensorial bastante eficientes, que são responsáveis pelo seu alto sucesso adaptativo ^[21].

Sabe-se que a plasticidade sináptica está diretamente relacionada com a capacidade de aprendizagem, armazenamento e evocação de memórias. Experiências vividas podem levar à mudanças no número, tamanho e complexidade das sinapses. As evidências de mudanças induzidas na estrutura do cérebro devido às experiências têm sido mostradas em abelhas ^[22, 23]. Em *A. mellifera*, mudanças no volume cerebral mostram forte correlação com mudanças no comportamento e com a idade ^[15, 24, 25].

Uma importante estrutura cerebral nas abelhas são os corpos cogumelares ou “corpora pedunculata”, que foi primeiramente descrita em detalhes por Dujardin em 1850 ^[26]. Os corpos cogumelares são importantes centros de processamento de sinais olfativos e para a formação da memória olfativa ^[27]. As estruturas do cérebro são apresentadas na Figura 2.

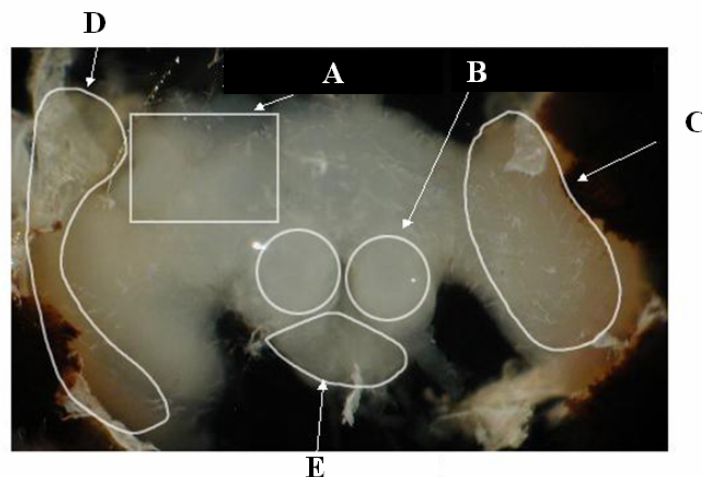


Figura 2. Estruturas do cérebro da abelha, A: Corpos cogumelares, B: Lobo antenal, C: Lobo ótico, D Olho composto, E: Gânglio sub-esofageal. Fonte: <http://photo.bees.net/biology/ch3/brain.jpg>

Diferenças entre as operárias nutridora e campeira foram analisadas quanto à aprendizagem olfativa e percebeu-se que não há diferenças em relação aos processos sensoriais, mostrando que ambas possuem tal habilidade ^[28]. No entanto, em um estudo das mudanças estruturais do cérebro duas regiões apresentaram volumes distintos para essas operárias. Enquanto a nutridora possui glomérulos olfatórios maiores, a campeira possui corpos cogumelares com maior volume. Sugere-se que esse padrão de variação pode estar relacionado com a função desempenhada na colméia, já que as nutridoras necessitam de melhor olfato e as campeiras, por outro lado, demandam de mecanismos de memória e aprendizagem mais aguçados ^[24].

1.1.2 Aprendizagem por condicionamento operante

Aprender a antecipar eventos futuros com base na experiência adquirida com as conseqüências do seu próprio comportamento (condicionamento operante) é uma forma de aprendizagem que os seres humanos compartilham com a maioria dos outros animais, incluindo invertebrados ^[29].

A complexidade do cérebro de vertebrados, cujos estímulos são processados e interligados em várias etapas hierárquicas, torna difícil discernir os circuitos que são responsáveis pela geração do comportamento. Cérebros mais simples também agem na aprendizagem por condicionamento clássico (Pavloviano) e operante. Estas formas de aprendizagem são tão fundamentais que apareceram no início da evolução e têm sido indispensáveis desde então. Dos muitos invertebrados que mostram condicionamento operante, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* tem se mostrado um bom modelo mecanicista de condicionamento operante ^[29].

A abelha *Melipona quadrifasciata* também tem sido utilizada em pesquisas de processos comportamentais operantes, pois é facilmente manipulada devido à ausência de ferrão. Um estudo particularmente interessante foi baseado em condicionamento operante visual em várias espécies de abelhas brasileira sem ferrão ^[30]. Os autores mostraram que os gêneros e espécies de *Melipona* e *Scaptotrigona* foram capazes de associar a cor com os alimentos. A primeira destas espécies discrimina muito bem entre azul e amarelo (Figura 3) ^[31].



Figura 3. Abelha da espécie *Melipona quadrifasciata* em treinamento. Abelha é treinada para discriminar entre as cores azul e amarela a partir de reforço positivo com xarope em equipamento especial de condicionamento operante como mostrado na figura.

1.1.3 Estudos comparativos entre subcastas de abelhas

Nas abelhas, a transição do trabalho interno na colméia ao forrageamento externo relacionado com a idade tem sido associada ao aumento da expressão do gene do forrageamento (*for*), que codifica uma proteína quinase dependente de guanosina 3', 5'-monofosfato (GMPc) (PKG) [32].

Genes específicos ligados a processos comportamentais têm sido clonados e caracterizados, como por exemplo, *Amtyr1*, um gene do cérebro de abelha codificante para um receptor de tiramina, o qual está envolvido em processamentos de sinais em funções cerebrais complexas [33], e o fator de transcrição CREB (do inglês- *cAMP response element binding protein*), que é requerido para a ligação de plasticidade sináptica e memória de curto e longo prazos [34].

Estudos sobre neurofisiologia e comportamento da abelha também têm empregado técnicas transcriptômicas tais como determinação de *expressed sequence tags* (ESTs) e análise de *cDNA microarrays* para identificar genes regulados diferencialmente durante a diferenciação de castas e operarias [35, 36, 37]. Outros estudos demonstraram diferentes padrões de expressão genética entre a operaria campeira e nutridora como, por exemplo, genes envolvidos na sinalização colinérgica [38], genes que codificam para a família das principais proteínas da geléia real (MRJPs) e enzimas metabólicas [37] e genes envolvidos em sinais de transdução, canais de íons e transportadores de neurotransmissores [39].

Diferentes estudos relacionados com a proteômica em *A. mellifera* têm sido realizados. Dentre estes se encontram estudos sobre a secreção da glândula hipofaríngea em nutridoras ^[40], neuropeptídeos cerebrais ^[41] e, recentemente, proteômica quantitativa em tórax de abelhas ^[42] e no organismo todo ^[43,44], descrevendo diferenças durante a transição da colméia ao forrageamento.

1.2 Proteômica

O proteoma tem sido definido como o conjunto de proteínas expressas a partir do genoma de um organismo, ou no caso de organismos multicelulares, como o complemento protéico expresso por um tecido ou por células diferenciadas; mas especificamente o conjunto de proteínas expressas em um determinado momento sob condições definidas ^[45]. Contrariamente ao genoma que é estático, o proteoma é complexo e dinâmico dependendo do ciclo celular, das condições externas e da história prévia do sistema. Geralmente, o proteoma é modificado segundo o contexto do processo biológico específico e estado fisiopatológico do organismo.

Apesar da importância de dados genômicos e transcriptômicos, somente em nível proteômico é possível vislumbrar a diversidade e funcionalidade bioquímica dos reais produtos de expressão gênica (proteínas). Esta diversidade deriva do fato de que um determinado gene pode gerar múltiplas proteínas distintas como resultado de *splicing* alternativo de transcrições primárias, a presença de polimorfismos na sequência, modificações pós-traducionais, e de outros mecanismos de processamento de proteínas.

Estudos recentes em levedura e células de mamíferos mostram que as quantidades de mRNA não são diretamente correlacionadas com os níveis de proteínas ^[46,47,48].

Análises de proteomas são mais comumente realizadas pela combinação de técnicas de separação de proteínas e de identificação. Entre as ferramentas da proteômica de separação encontram-se as técnicas electroforéticas e as cromatográficas. A técnica de eleição para a identificação é a espectrometria de massas.

A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma poderosa técnica de separação que permite a resolução simultânea de centenas ou até milhares de proteínas em condições especiais. Estas são separadas de acordo com duas características independentes, massa molecular e ponto isoelétrico ^[49]. A primeira dimensão de 2-DE é a focalização isoelétrica (IEF), durante a qual as proteínas são separadas de acordo com a carga. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas ortogonalmente por SDS-PAGE, de acordo com a massa molecular.

As principais limitações da 2-DE referem-se à pouca representação de proteínas de alta massa molecular, e de proteínas hidrofóbicas e à limitada capacidade de detecção de proteínas existentes em número reduzido de cópias por célula ^[50], além da dificuldade para obter padrões eletroforéticos reprodutíveis para proteínas com pontos isoeletricos muito alcalinos ^[51]. O pré-fracionamento da amostra ^[52, 53], a diminuição da concentração da malha dos IPGs ^[54, 55], assim como a diminuição do efeito eletroendosmótico em géis alcalinos ^[56] têm aliviado substancialmente estas restrições.

Na tentativa de superar algumas limitações inerentes à 2-DE, técnicas alternativas têm sido integradas a espectrometria de massas como novas plataformas de análise de proteomas. Uma técnica promissora é a análise direta de misturas complexas de peptídeos obtidos por digestão enzimática de extratos protéicos totais por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (do inglês- *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS*). Nesta, peptídeos com tempos de eluição similares podem ser selecionados, isolados e fragmentados sequencial e automaticamente dentro do espectrômetro sem sobreposição dos padrões de fragmentação. Assim, informações de seqüência para milhares de peptídeos podem ser obtidas em um único ensaio de LC-MS/MS.

1.2.1 Espectrometria de massas

Antes da década dos 80, a utilização da espectrometria de massas como uma ferramenta analítica, limitava-se à caracterização de pequenos compostos orgânicos ^[57], porque não havia métodos de ionização que permitissem, sem uma prévia derivatização, a ionização em fase gasosa de importantes biomoléculas, tais como peptídeos, carboidratos, proteínas e glicoproteínas.

Um espectrômetro de massa é constituído por uma fonte de ionização, na qual as moléculas são levadas a um estado gasoso e ionizadas, um analisador que separa os íons em função da m/z (razão massa / carga), e um detector que registra o número de íons para cada valor de m/z .

Com o surgimento de "métodos suaves de ionização", conhecidos assim devido à baixa energia fornecida para a amostra sem causar fragmentação, a espectrometria de massas passou a ser aplicada em diversas áreas, incluindo bioquímica ^[58], biotecnologia ^[59], farmacologia ^[60], microbiologia ^[61] e proteômica ^[62, 63].

Um dos primeiros destes métodos de ionização foi o bombardeamento de átomos rápido (FAB) ^[64], que foi utilizado na análise dos peptídeos e proteínas de fase líquida.

Este método tem várias limitações entre as quais se destacam o nível de sensibilidade em picomoles, a baixa gama de massas e a diferença na eficiência de ionização de peptídeos hidrofóbicos e hidrofílicos, o que limita a análise de misturas complexas. No início da década de 1990, duas técnicas de ionização acopladas a espectrometria de massas, dessorção ionização por laser assistido com matriz (MALDI-MS) [65, 66] e ionização por electronebulização (ESI-MS) [67] revolucionaram a identificação de proteínas separadas por 2-DE [68, 63, 69], entre outros fatores, devido à alta sensibilidade na ordem de femtomoles. Tipicamente esses métodos envolviam excisão da banda de interesse do gel, a digestão das proteínas contidas na banda usando a enzima tripsina [70] e, finalmente, a análise de espectrometria de massas dos peptídeos produzidos.

O método ESI surgiu na busca de interfaces que permitissem uma ligação direta da cromatografia líquida com os espectrômetros de massas [71]. A amostra, em um sistema adequado de solvente, é introduzida na fonte de ionização à pressão atmosférica através de uma agulha com um determinado fluxo. A combinação da alta tensão existente entre o buraco da agulha e a entrada para o espectrômetro (~ 4 kV) e do fluxo de gás nitrogênio (~ 60-80 ° C) na direção transversal e coaxial com respeito à introdução da amostra, faz que o líquido na ponta se espalhe em gotas cada vez menores, até chegar a moléculas de proteínas ou peptídeos totalmente dessolvatados e multicargados.

A ionização ESI gera íons multicargados sendo que proteínas com peso molecular na faixa de 10-100 kDa produzem íons de massas, em geral, com valores de m/z abaixo de 2.500. Nesta região, a transmissão de íons é geralmente boa, e a medição de massas é excelente, porque elas são vistas em diferentes estados de carga, o que favorece estatisticamente a determinação de massas moleculares. Esta característica torna a ionização ESI o método mais conveniente para a determinação do peso molecular das grandes biomoléculas.

A maioria dos acoplamentos de cromatografia líquida a espectrômetros de massas utiliza ESI como fonte de ionização. As fontes de ionização MALDI são geralmente utilizadas para a análise das amostras tratadas individualmente.

A ionização MALDI tem sido muito usada porque permite medições de amostras complexas na presença de sais, é de fácil manipulação e apresenta simplicidade dos espectros de massas devido a que são detectados somente íons monocargados. Neste método, os analitos são misturados com uma solução saturada de uma matriz que absorve fortemente a radiação ao comprimento de onda do laser. As matrizes mais comumente utilizadas na análise dos peptídeos e proteínas são o ácido alfa-ciano-4-

hidroxicinâmico (para peptídeos < 8 kDa) e ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi- cinâmico ou sinapínico (para proteínas e peptídeos > 8 kDa). Íons formados na fonte de ionização passam na região do analisador e são separados de acordo com a sua relação m/z.

Os analisadores de massas podem ser divididos em duas classes. A primeira classe utiliza como propriedade física o campo elétrico. Dentro deste grupo estão: o filtro de massa quadrupolar, a armadilha de íons quadrupolar (IT, *ion trap*) e o analisador de tempo de voo (TOF, *Time of Flight*). A segunda classe utiliza como propriedade física o campo magnético e estes incluem o de setor magnético e o ciclotron com ressonância iônica. Os diferentes analisadores variam na precisão, alcance de massa, resolução, sensibilidade, velocidade de varredura, custo, e a escolha depende da aplicação específica.

O tipo de analisador deve ser compatível com as fontes de ionização que são utilizadas e, embora possa haver várias combinações, as mais utilizadas são o quadrupolo e armadilha de íons (IT) com ESI o analisador de tempo de voo (TOF) com MALDI pela natureza descontínua da ionização neste último método.

Recentemente, novas configurações de analisadores de massas têm encontrado grande aplicação para a análise das proteínas. Por exemplo, para assegurar a efetiva fragmentação dos íons precursores têm sido ancorados dois analisadores em série, separados por uma câmara de colisões; esses são conhecidos como espectrômetros de massas em *tandem* (MS/MS). Esses instrumentos têm alta sensibilidade, resolução e precisão da medição. Um exemplo de MS/MS é o MALDI-TOF-TOF ^[72], em que dois analisadores TOF são separados por uma câmara de colisões. Outro exemplo é o híbrido quadrupolo-TOF (Q-TOF), no qual a câmara de colisões está situada entre o quadrupolo e o analisador TOF ^[73]. O Q-TOF pode ser acoplado a uma fonte de ionização MALDI ou ESI. Outras configurações incluem instrumentos com armadilha de íons lineares e ciclotron de ressonância iônica com transformada de Fourier (FT-ICR-MS).

Uma das estratégias para a identificação de proteínas em banco de dados é *Peptide Mass Fingerprinting (PMF)*. Esta consiste na comparação dos mapas peptídicos, resultantes da análise por espectrometria de massas de um digesto triptico de interesse, com os mapas peptídicos de proteínas presentes nos banco de dados digeridos teoricamente (*in silico*) ^[74, 75], conforme apresentado na Figura 4.

A fragmentação de peptídeos para obter seqüências internas de aminoácidos permite também a identificação de proteínas em banco de dados e pode ser realizada através da colisão com um gás inerte (*Collision Induced Dissociation, CID*) ^[76]. Nesses

experimentos, utilizam-se geralmente equipamentos do tipo MALDI-TOF/TOF ou ESI-Q/TOF. Este mecanismo gera espectros que podem ser interpretados para obter sequências *de novo* ou identificar a proteína pelo uso direto destes (espectros obtidos por CID-MS) contra bases de dados que contenham as massas dos fragmentos teóricos para todos os peptídeos com massas semelhantes àquelas determinadas no ensaio [77]. Esta estratégia se denomina do inglês *Peptide Fragment Fingerprinting (PFF)*.

“Peptide Mass Fingerprinting (PMF)”

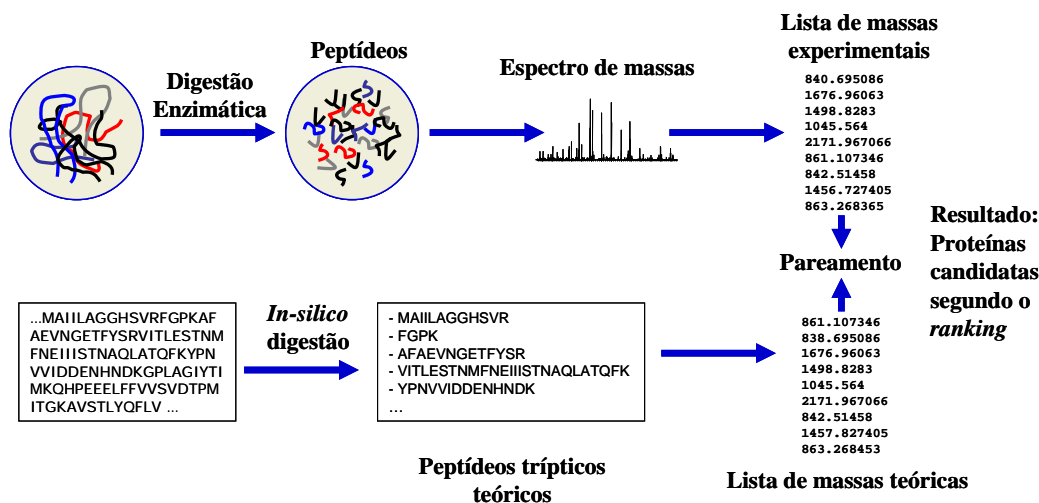


Figura 4. Esquema representativo [78] de identificação de proteínas em banco de dados pela estratégia de Impressão Digital por Massa de Peptídios (*Peptide Mass Fingerprinting - PMF*). Uma proteína solúvel é digerida com protease para produzir uma mistura de peptídeos, que tem suas massas determinadas geralmente por MALDI-TOF MS. Tais massas são comparadas computacionalmente com massas geradas por digestão *in silico* de proteínas em banco de dados. A partir dessa comparação, a proteína em questão tem sua identidade determinada.

1.2.2 MudPIT (Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas)

Na atualidade, dentro das novas e complementares estratégias que têm surgido na tentativa de superar as limitações da 2-DE, encontra-se MudPIT [79, 80], que permite a alta capacidade de análise por técnicas de espectrometria de massas e possibilita também o mapeamento em grande escala do proteoma, além de análises qualitativas e comparações quantitativas entre as amostras utilizando análise livre de marcação química.

MudPIT é uma técnica proteômica baseada em cromatografia, onde uma mistura complexa de peptídeos é carregada diretamente numa coluna bifásica microcapilar empacotada em sequência com uma matriz de troca catiônica forte e outra de fase

reversa, Figura 5. Depois que a mistura complexa de peptídeos é injetada na coluna bifásica microcapilar, esta é colocada diretamente em linha com um espectrômetro de massas. Os dados gerados por espectrometria de massas em *tandem* a partir de uma corrida de MudPIT são depois analisados para determinar o conteúdo de proteínas da amostra original.

A análise quantitativa livre de marcação em proteômica pode ser baseada na contagem espectral (*spectral count*) normalizado ^[81], onde o número total de espectros MS/MS tomados dos peptídeos sobre uma determinada proteína em uma dada análise LC/LC-MS/MS, é linearmente correlacionada com a abundância de proteína ao longo de um alcance dinâmico de duas ordens de magnitude. Além disso, a contagem espectral mostrou que tem maior reprodutibilidade técnica em comparação com outras amostragens estatísticas, como a cobertura na seqüência e a contagem de peptídeos ^[82].

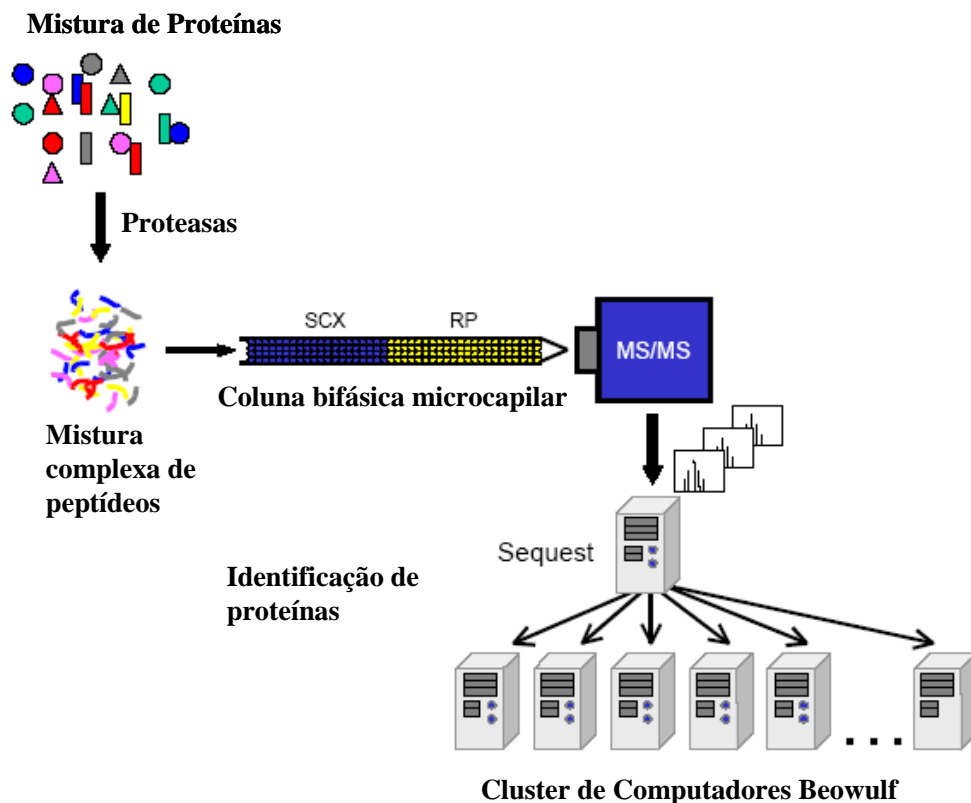


Figura 5. Esquema representativo ^[79] de identificação de proteínas em banco de dados pela estratégia de Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas (*Multidimensional Protein Identification Technology* - MudPIT). Uma amostra complexa de proteínas solúvel é digerida com uma protease para produzir uma mistura de peptídeos ainda mais complexa, que é carregada diretamente em coluna microcapilar de sílica (100 μm diâmetro interno) empacotada com resina trocadora catiônica forte (SCX) seguida de resina de fase reversa (RP). A coluna é colocada em linha com o espectrômetro de massa como parte de uma fonte de nano-electronebulização e os peptídeos são eluídos seqüencialmente no espectrômetro de massa. Os espectros de massa de fragmentação de peptídeos são processados usando programas disponíveis comercialmente.

2 Objetivo

2.1 Objetivo

Analisar os proteomas cerebrais das abelhas *Apis mellifera* e *Melípona quadrifasciata* a fim de se identificar proteínas relacionadas à ontogenia, comportamento e aprendizagem.

2.2 Metas

Padronizar condições para a obtenção de mapas proteômicos de amostras de cérebros de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata*.

Comparar mapas proteômicos cerebrais de operarias da espécie *A. mellifera* com comportamentos sociais diferentes (nutridora e campeira) a fim de se identificar proteínas diferencialmente expressas relacionadas à ontogenia e comportamento social.

Analisar qualitativa e quantitativamente proteomas cerebrais de operarias nutridora e campeira através de MudPIT e *spectral count* a fim de se identificar em larga escala proteínas diferencialmente expressas relacionadas à ontogenia e comportamento social.

Comparar mapas proteômicos cerebrais de sujeitos da espécie *M. quadrifasciata* treinadas por condicionamento operante e não treinadas a fim de se identificar proteínas diferencialmente expressas relacionadas à aprendizagem.

2.3 Justificativas

Assim como humanos, as abelhas, como as da espécie *A. mellifera*, são organismos que vivem em sociedades complexas muito bem estruturadas onde cada casta e subcasta têm uma função específica. Este comportamento social organizado, acompanhado de seu sistema nervoso simples comparado ao de organismos superiores, faz de *A. mellifera* um organismo acessível como modelo experimental, mormente após o sequenciamento de seu genoma, que foi concluído em 2006. Várias pesquisas têm empregado esta espécie como modelo biológico para estudos de comportamento social.

Outro processo biológico que as abelhas compartilham com humanos é a aprendizagem por condicionamento operante. A abelha da espécie *M. quadrifasciata*

tem sido utilizada em pesquisas de processos comportamentais operantes, pois é facilmente manipulada devido à ausência de ferrão.

O estudo destes processos em nível proteômico permite vislumbrar a diversidade e funcionalidade bioquímica das proteínas que são as que participam diretamente nos processos biológicos e suas regulações.

3 Materiais e métodos

3.1 Coleção de insetos e dissecação de cérebros

Operárias adultas campeira e nutridora da espécie *Apis mellifera* foram coletadas de colônias do apiário Vereda Rosa (Brasília, Brasil). As abelhas operárias foram diferenciadas pelas suas estruturas anatômicas (quantidade de pêlos e danos causados nas asas) e pelo desenvolvimento da glândula hipofaríngea, que foi removida durante a dissecação. Para garantir a plena maturidade das forrageiras, foram selecionadas só aquelas que transportavam pólen. As abelhas foram anestesiadas com clorofórmio e os cérebros, dissecados em tampão 2-DE frio (7 M uréia, 2 M tiouréia, 1% DTT, 2% Triton X-100, 0,5% Pharmalyte 3-10 ou 4.7), contendo um coquetel de inibidores de proteases (cOmplete, Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Após cuidadosa lavagem e imersão em tampão 2-DE, os cérebros foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados a -80 ° C

3.2 Condicionamento operante

Abelhas mandaçaia da espécie *Melipona quadrifasciata* operárias forrageiras treinadas e não treinadas (paradigma operante) foram fornecidas pela Dr. Deisy das Graças de Souza, da Universidade Federal de São Carlos, SP. O procedimento básico foi de aprendizagem discriminativa. Inicialmente, a abelha foi ensinada, por meio de modelagem, a voar da colméia até o equipamento de treinamento, localizado a 1,5 m. Isto ocorreu com o equipamento localizado inicialmente na saída da colméia, com xarope de sacarose exposto sobre a tampa; essa fonte de alimento foi afastada progressivamente. Quando a abelha estava voando sistematicamente até a fonte, o xarope foi removido e passou-se a modelar a resposta da discriminação entre cores. Dados de estudos prévios mostraram que essa abelha discrimina muito bem entre azul e amarelo. Para esta fase, foram usados dois aparelhos iguais. Em cada aparelho apresentou-se um círculo luminoso de 12 cm de diâmetro, dentro do qual ficava localizada a barra de respostas. O círculo era amarelo em um dos aparelhos e azul no outro. O xarope passou a ser apresentado apenas em uma das cores (por exemplo, sempre no azul, nunca no amarelo). A posição das cores se alternava semialeatoriamente ao longo das tentativas para evitar controle por posição. Respostas incorretas eram seguidas por um intervalo sem as cores, durante o qual não tinha xarope

disponível. A programação de tentativas sucessivas continuava em vigor até que ocorresse um intervalo de pelo menos meia hora sem uma visita (o que geralmente ocorre no final do dia). O critério de aprendizagem foi o de pelo menos 15 tentativas sucessivas corretas (isto é, 15 respostas consecutivas no estímulo correto, nenhuma resposta no estímulo incorreto). Os resultados foram analisados em termos de frequência acumulada de respostas na presença de cada estímulo, índice de discriminação e número de tentativas até o critério de aquisição da discriminação. Como abelhas controle foram utilizadas aquelas que saíam da colméia de manhã para forragear. Os cérebros foram dissecados como no item anterior.

3.3 Preparação da amostra

Os experimentos foram realizados com amostras preparadas de 10 cérebros para cada grupo de operarias (campeira e nutridora) ou abelhas treinadas e não treinadas. Os cérebros foram lisados por homogeneização manual em 200 μ L de tampão 2-DE em gelo. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 min. O sobrenadante resultante foi submetido a quantificação protéica por análise de aminoácidos e por de espectrofotometria e 2DQuant Kit de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)

3.4 Eletroforese bidimensional (2-DE)

O procedimento experimental consistiu em dois grupos da amostra (Ex: nutridora e campeira) utilizados para a comparação, três preparações da amostra por grupo (dez cérebros cada) e dois géis 2-DE replicatas para cada preparação da amostra, resultando em seis géis por grupo. A otimização da 2-DE foi alcançada por meio da combinação da IEF, utilizando tiras de IPG de 18 centímetros (GE Healthcare), intervalo pH 4-7, para a primeira dimensão e 10% T poliacrilamida SDS-PAGE para a segunda dimensão. Tiras de IPG foram reidratadas por 12 h em 370 μ L de tampão de lise suplementado com 10% (v / v) de isopropanol contendo 50 μ g de proteínas para os géis analíticos e 100 μ g para os preparativos. IEF foi feita a 20 ° C utilizando um equipamento IPGphor II (GE Healthcare) nas seguintes condições: 500 V (gradiente) durante 1 h, 1.000 V por 1 h e 8.000 V por 4 h e 30 min. Antes do início da segunda dimensão, as tiras de IPG foram submetidas a redução e alquilação. Estas foram embebidas durante 20 min em solução contendo 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e 125 mM de DTT e posteriormente 20 min

adicionais no mesmo tampão com 300 mM de acrilamida, em vez de DTT. SDS-PAGE foi realizada em 10% T poliacrilamida, a separação na segunda dimensão foi no sistema Protean II (Bio-Rad, Hercules, E.U.A.) conectado a um banho frio Multitemp II (GE Healthcare). Eletroforese foi realizada em 25 mA de corrente constante durante 6 h a 20°C. Proteínas foram visualizadas por meio de um procedimento de coloração com prata compatível com a espectrometria de massas ^[83].

3.5 Detecção de fosfoproteínas

Para a marcação de fosfoproteínas foi usado o Kit Pro-Q Diamond (Molecular Probes, OR, EUA). Os géis 2-DE foram fixados durante toda a noite em solução de fixação (50% de metanol, 10% ácido acético) em temperatura ambiente sob agitação suave. No dia seguinte, os géis foram incubados em solução fresca de fixação por 30 min. Os géis foram então lavados três vezes 10 min com água e corados com o corante Pro-Q Diamond por 2 h na escuridão. Os géis foram então imediatamente descorados (acetonitrila 20%, acetato de sódio 50 mM, pH 4.0) durante 30 min seguido a segunda e terceira etapas de descoloração por 30 min cada. Os géis foram então lavados com água e digitalizados com scanner Typhoon 9200 phosphorimager (GE Healthcare, QC, Canadá) disponibilizado pelo laboratório de Biologia Molecular da UnB, foi utilizado 532 nm de excitação e filtro de emissão 610 BP 30.

3.6 Análise de imagens

A aquisição de imagens dos géis foi realizada utilizando um scanner Sharp JX-330 (Tóquio, Japão) em 300 dpi de resolução. Imagens digitalizadas foram importadas via software ImageMaster 2D Platinum versão 5.0 (GE Healthcare) para análise. Foi aplicada a cada gel detecção automática de *spots* com a mínima interferência do usuário seguida pela edição manual quando necessário. A detecção automática de *spots* foi realizada com 10 *landmarks* bem definidos e distribuídos uniformemente. Os dados dos *spots*, que exibiam alterações quantitativas superiores a duas vezes na sua expressão entre os dois grupos, e presentes em pelo menos cinco das seis replicatas dos géis de cada grupo, foram submetidos à análise estatística para a rejeição da hipótese nula de expressão diferencial. *Spots* com baixa intensidade ou em zonas duvidosas foram ignorados na análise estatística, que foi realizada por meio do teste paramétrico Student's t e não-paramétricos de Wilcoxon e de Kolmogorov-Smirnov com $p < 0.01$.

Foram selecionados para identificação os *spots* que exibiam alterações quantitativas significativas pelos três testes estatísticos.

3.7 Digestão de proteínas e espectrometria de massas

As proteínas selecionadas foram processadas para digestão com tripsina e extração dos peptídeos segundo descrito por González *et al.* ^[84], usando tripsina modificada em grau de seqüenciamento (Promega, Madison, WI, EUA). Peptídeos foram desalinizados e concentrados utilizando ZipTips C18 (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Cada amostra (1 µL) foi colocada em placa de MALDI-TOF e misturada com matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em 50% acetonitrila, 0.1% TFA). Os espectros foram coletados em um espectrômetro de massa Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em modo de extração retardado e refletor. A calibração interna foi feita usando picos conhecidos da autólise da tripsina e de queratina (842,50 e 1475,77 Da, respectivamente). As massas dos peptídeos (MH +) foram registradas na faixa de 800 a 3000 Da. O programa FLEXControl v. 1.1.0.0 (Bruker Daltonics) foi utilizado para a aquisição de espectros, enquanto o processamento dos espectros foi realizado utilizando XTOF v. 5.1.1 (Bruker Daltonics) para a geração da listas dos picos.

3.8 Identificação de proteínas

A lista de massas de picos monoisotópicos criada pelo programa XTOF v. 5.1.1 foi utilizada para a busca em banco de dados pela estratégia de PMF usando BioTools v. 2.0 (Bruker Daltonics) ligado ao programa Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) ^[85] contra o banco de dados não redundante de proteínas NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, E.U.A.). A tolerância de massa foi definida em 100 ppm, e não foram impostas restrições na massa molecular das proteínas ou linhagem filogenética. A busca que não proporcionou pontuação significativa sem restrição com linhagem filogenética foi enviada para um segundo turno com taxonomia restrita a outros metazoa. Outros parâmetros usados na busca foram oxidação de metionina como modificação variável e propionamida (alquilação da cisteína com acrilamida) como modificação fixa. O número de sítios trípticos não clivados foi zero, na maioria dos casos. *Hits* foram considerados significativos se a pontuação para a

proteína ultrapassava a pontuação limiar calculada pelo programa Mascot assumindo valor de $p < 0,05$.

3.9 Análise de imunocitoquímica e microscopia eletrônica

Três regiões do cérebro da abelha *Apis mellifera* (lobo antenal, lobo óptico e corpo cogumelar) foram dissecadas e fixadas por 5 h à temperatura ambiente numa solução contendo 0,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 0,2% ácido pícrico em 5% de sacarose e 5 mM de cloreto de cálcio em tampão de cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2. Depois de serem lavados no mesmo tampão durante toda a noite a 4°C, os grupos aldeído livres foram “quenched” com cloreto de amônio, neste tampão durante 1 h a 4°C. O material foi contrastado em bloco com 2% de acetato de uranila e acetona 15% por 2 h a 4 ° C, posteriormente desidratado em acetona (30-100%) e incorporado em resina LRGold.

Seções ultrafinas foram coletadas em grades de níquel e pré-incubadas em solução salina tampão fosfato (PBS) contendo 1,5% de albumina bovina (PBS-BSA) e 0,01% de Tween 20, e posteriormente, incubadas durante 1 h com anticorpos monoclonais contra MRJP1 ^[86] diluído 1:10 em PBS-BSA. Após lavagem em PBS-BSA, as grades foram incubadas durante 1 h com anticorpos secundários marcados com ouro (rabitt-IgG-Au-conjugados 10nm, Sigma) diluídos em PBS-BSA 1:20. Por último, as grades foram lavadas com PBS e água destilada, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, observados e fotografados em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol ® 1011.

3.10 Identificação de proteínas por *MudPIT*

Amostras com misturas de peptídeos resultantes de digestão com tripsina de proteomas cerebrais (60 µg) de abelhas nutridoras e campeiras foram injetadas à pressão numa coluna capilar de dessalinização de sílica fundida de 250-µm (d.i) contendo 3 cm de resina Polaris C18-A, 5 µm, (Metachem, Ventura, Califórnia) com um filtro de união de 2 µm (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA). A coluna de dessalinização foi lavada com tampão contendo 95% de água, 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. Após a dessalinização, um capilar de 100 µm (d.i) com uma ponta puxada de 5 µm empacotado com 10 cm Aqua C18, 3-µm, (Phenomenex, Ventura, Califórnia), seguida por 3 cm de trocador catiônico forte Partisphere, 5-µm, (Whatman, Clifton, Nova Jérsei) foi

anexado ao filtro de união e de toda a montagem (coluna dessalinização-filtro de união-coluna analítica), colocada em linha com um HPLC quaternário Agilent 1100 (Palo Alto, Califórnia). Os peptídeos foram analisados usando uma modificação de 12 passos de separação, como descrito anteriormente [79]. As soluções tampão utilizadas foram acetonitrila 5% / ácido fórmico 0.1% (tampão A); acetonitrila 80% / ácido fórmico 0.1% (tampão B); e acetato de amônio 500 mM / acetonitrila 5% / ácido fórmico 0.1% (tampão C). O passo 1 constou de 100 min um gradiente de 0-100% tampão B. Os passos do 2-11 tinham o seguinte perfil: 3 min de 100% tampão A, 2 min de X % tampão C, 10 min um gradiente de 0-15% tampão B, 97 min e um gradiente de 15-45% tampão B. Nos 2 min com tampão C as porcentagens (X) foram 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60%, respectivamente, para os 12 passos da análise. Na última etapa, o gradiente continha 3 min de 100% do tampão A, 20 min de 100% tampão C, 10 min de um gradiente de 0-15% tampão B, 107 min de um gradiente de 15-70% tampão B.

Os peptídeos eluídos a partir da coluna microcapilar, foram diretamente electronebulizados num espectrômetro de massa de armadilha iônica (*ion trap*) LTQ 2D (ThermoFinnigan, Palo Alto, Califórnia), com a aplicação de um spray distal de 2,5 kV de tensão. Um ciclo completo de varredura do espectro de massa (400-1400 m/z), seguido por 5 espectros MS/MS dependentes de dados com um 35% da energia de colisão normalizada, foi repetido continuamente ao longo de cada etapa da separação multidimensional. A aplicação das funções de varredura do espectrômetro de massa e os gradientes de solvente do HPLC eram controlados pela *datasystem Xcalibur*.

3.11 Análise dos espectros de massas MS/MS e categorização de proteínas

Os espectros MS/MS foram analisados usando o seguinte protocolo do programa de análise. Os espectros de má qualidade foram removidos do conjunto de dados utilizando um algoritmo de avaliação automatizado da qualidade do espectro [87]. Os espectros MS/MS remanescentes após filtragem foram analisados com o algoritmo SEQUEST™ [88] contra o banco de dados genômicos da abelha *A. mellifera* mantido no NCBI (baixada em sete de novembro de 2006) utilizando a opção *decoy* na qual a seqüência para cada entrada na base de dados original é invertida [80]. Todas as buscas foram realizadas em paralelo num cluster de computador *Beowulf* constituído por 100 CPUs *Athlon* de 1,2 GHz [89]. Nenhuma especificidade de enzima foi considerada para qualquer busca. Os resultados do programa SEQUEST foram montados e filtrados

utilizando o programa DTASelect (versão 2,0) [90, 91]. DTASelect 2,0 usa uma análise discriminante linear para definir dinamicamente XCorr e DeltaCN limiares para todo o conjunto de dados de usuário, para realizar uma determinada taxa de falsos positivos (5% nesta análise). As taxas de falsos positivos são estimadas pelo programa a partir do número e qualidade dos espectros pareados por *decoy* no banco de dados.

As seqüências de proteínas encontradas pela análise acima foram comparadas por busca de homologia via BLASTX com o catálogo KOG, e então classificadas dentro das principais categorias do catálogo da seqüência mais similar (E-valor <10E-5). A redundância de *contigs* não foi removida quando eles pertenciam a diversas categorias KOG, classificando-se como múltiplas categorias.

3.12 Avaliação da expressão diferencial de proteínas usando o teste G na contagem espectral

Primeiro, a contagem espectral para cada proteína foi normalizada de acordo com as contagens espectrais totais de todas as proteínas nas amostras. Tendo em conta que t_1 é a contagem espectral total de todas as proteínas na amostra 1, t_2 a contagem espectral total de todas as proteínas na amostra 2, n_1 a contagem espectral para uma dada proteína na amostra 1, n_2 a contagem espectral para essa mesma proteína na amostra 2, então,

$$f_1 = n_1 \frac{t_2}{t_1} + \lambda, \quad f_2 = n_2 + \lambda,$$

onde λ é a pseudo contagem espectral (= 0,5 neste caso). A pseudo contagem espectral é usada aqui para evitar tomar o logaritmo de zero.

O valor G foi calculado de acordo com Sokal e Rohlf (1994) [92]:

$$G = 2f_1 \ln\left(\frac{f_1}{\hat{f}_1}\right) + 2f_2 \ln\left(\frac{f_2}{\hat{f}_2}\right),$$

onde f_1 , f_2 são as contagens espectrais normalizada para a proteína na amostra 1 e na amostra 2, respectivamente; \hat{f}_1 , \hat{f}_2 são as contagens espectrais esperadas para a proteína na amostra 1 e na amostra 2, respectivamente. Assumimos que a proteína é igualmente expressa, assim $\hat{f}_1 = \hat{f}_2 = (f_1 + f_2)/2$.

O valor G foi calculado e utilizado para avaliar se a proteína foi diferencialmente expressa em função do chi-quadrado (χ^2) numa tabela de distribuição com um grau de

liberdade. As proteínas com G maiores do que 3,841 foram consideradas diferencialmente expressas com $P < 0,05$.

4 Resultados e discussão

4.1 Extração de proteínas e 2-DE

Diferentes procedimentos foram testados para a extração de proteínas cerebrais de abelhas. Ultra-som, pérolas de vidro e homogeneização manual foram utilizadas para a ruptura celular. Os melhores resultados foram obtidos por meio da homogeneização manual, que proporcionou integridade das proteínas e é um procedimento simples para a extração de proteínas (resultados não apresentados).

A adição de 10% de isopropanol no tampão da amostra 2-DE^[93] foi necessária para melhorar a resolução na separação das proteínas na região de pH básico, quando tiras IPG de pH 3-10 foram utilizadas na etapa IEF (Figura 6). Em SDS-PAGE, foram testadas várias concentrações de poliacrilamida. A melhor resolução para polipeptídios de alta massa molecular, que incluía a maioria dos *spots* nos mapas 2-DE, foi atingida usando concentrações de 10% T (Figura 6).

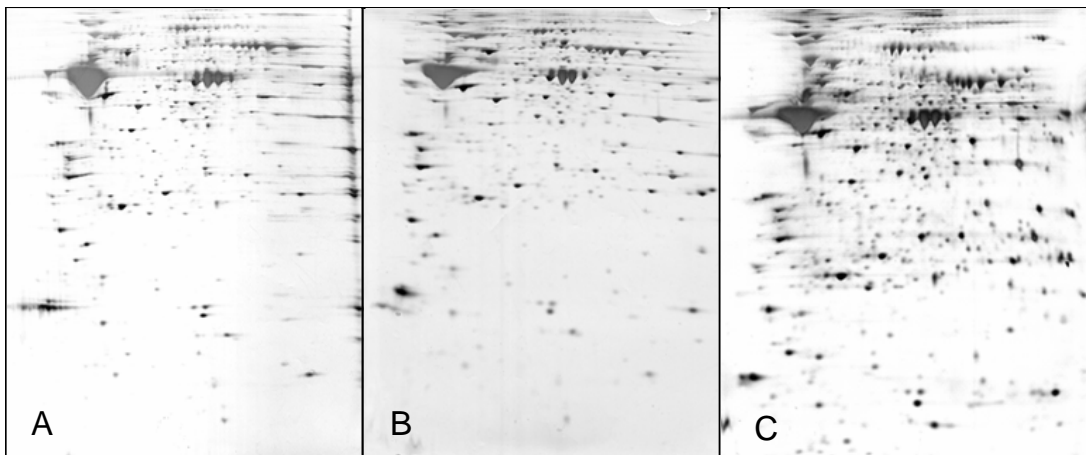


Figura 6. Padronização dos géis 2-DE de cérebro de abelhas no intervalo de pH 3-10. A Amostra foi aplicada em tampão 2-DE com (+) ou sem (-) 10 % isopropanol. Diferentes concentrações de poliacrilamida (12% ou 10% T) foram testadas. A) (-) isopropanol, 12% T; B) (+) isopropanol, 12% T; C), (+) isopropanol, 10% T.

A análise inicial das imagens dos géis 2-DE usando ampla faixa de pH (3-10) mostrou que a maior parte dos *spots* diferencialmente expressos foram concentrados na faixa de pH ácido (Figura 7). Por isso, tiras de IPG na faixa de pH 4-7 foram utilizadas para a seqüência de experimentos, uma vez que forneceram melhor resolução.

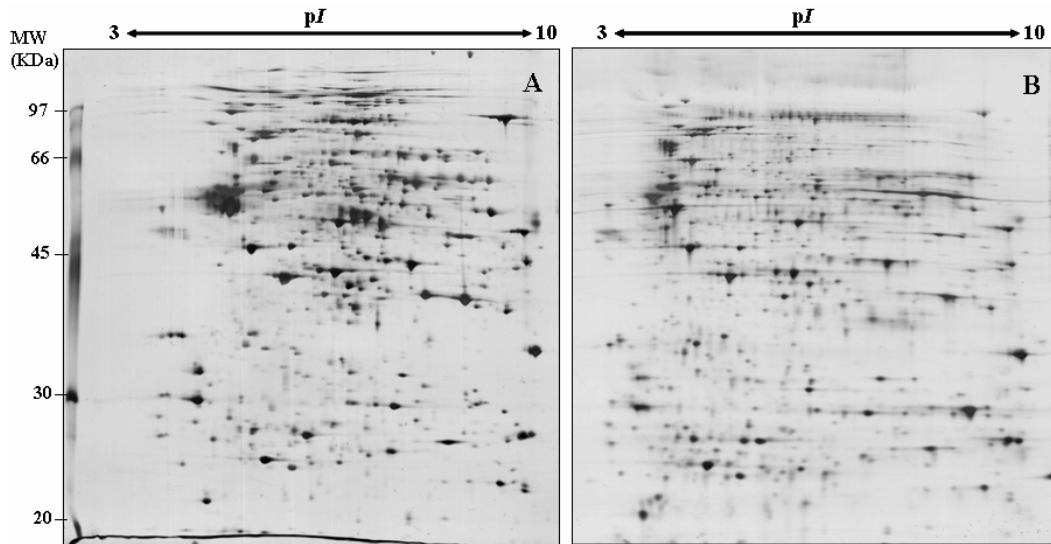


Figura 7. Géis 2-DE representativos (pI 3-10, 10% T), do total de extratos de proteínas de cérebro abelhas, foram aplicadas 50 µg de proteínas, A: Nutridora, B: Campeira. As proteínas foram detectadas usando coloração de prata.

Em média os dois grupos analisados apresentaram entre 800-900 *spots*/gel. A partir dos pontos de referências (*landmarks*), todos os géis foram alinhados, tiveram os *spots* numerados e pareados digitalmente. A quantidade de proteína presente em cada *spot* foi normalizada com respeito à quantidade total aplicada no gel a partir do total de *spots*. A comparação foi baseada na media de porcentagem de volume por grupo.

4.2 Identificação de Proteínas

Vinte *spots*, o que corresponde a dezesseis proteínas distintas, demonstraram ser diferencialmente expressas (de acordo com os critérios definidos em Materiais e Métodos) nos cérebros de nutridora e campeira. Essas proteínas foram identificadas por espectrometria de massas por meio da estratégia de PMF (Tabela 1, Figura 8). Ainda outras proteínas não diferencialmente expressas separadas por 2DE pH 3-10 e pH 4-7 foram identificadas por *peptide mass fingerprinting* e MS/MS (Anexos).

Quatro *spots* foram específicos de cada grupo, a saber, os *spots* 11 e 12 de nutridora (Figura 8A) e os *spots* de 19 e 20 de campeira (Figura 8B). Os outros dezesseis *spots* exibiram diferentes intensidades entre as operárias. A expressão diferencial de tais dezesseis proteínas revelou ser estatisticamente significativa nos testes Student's *t*, Wilcoxon e Kolmogorov-Smirnov com $p < 0,01$.

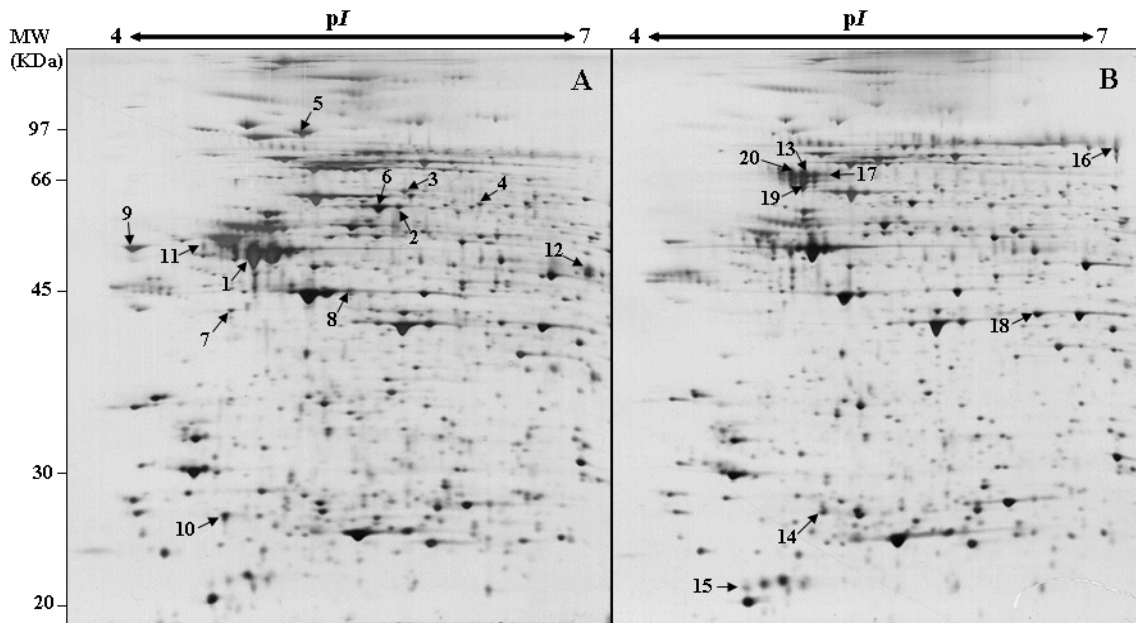


Figura 8. Comparação de proteomas cerebrais de abelhas nutridoras e campeiras por 2-DE (pI 4-7). Quantidades de 50 µg de proteínas foram utilizadas. Setas indicam proteínas que foram mais expressas em nutridora (A) e em campeira (B) identificadas pela estratégia de PMF como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Spots de proteínas diferencialmente expressas analisados por MALDI-TOF MS e identificados por busca em banco de dados não redundante NCBI usando o programa Mascot.

No.	Fator de cambio	Proteína identificada	Organismo/Proteína ID	Porcentagem de cobertura / pontuação de Mascot	Número de peptídeos pareados	pI (Teor.)/ PM(Teor.) KDa	Valor de t/ valor de D ^{a)}
Proteínas mais expressas no cérebro da nutridora							
1	9.2	major royal jelly protein 1	<i>Apis mellifera</i> /gi 58585098	26/150	10	5.10/49.42	9.90/1
2	2.8	PREDICTED: similar to ERp60 CG8983-PA, isoform A isoform 2	<i>Apis mellifera</i> /gi 66546657	25/160	10	5.57/55.82	8.75/1
3	2.0	PREDICTED: similar to T-complex Chaperonin 5 CG8439-PA, isoform A	<i>Apis mellifera</i> /gi 66522349	20/108	9	5.70/60.02	8.06/1
4	2.2	PREDICTED: similar to CG8351-PA isoform 1	<i>Apis mellifera</i> /gi 66540596	16/84	7	6.03/60.54	6.02/1
5	2.9	PREDICTED: similar to TER94 CG2331-PA, isoform A isoform 1	<i>Apis mellifera</i> /gi 66534286	24/114	16	5.18/89.62	4.94/1
6	2.3	PREDICTED: similar to ERp60 CG8983-PA, isoform A isoform 2	<i>Apis mellifera</i> /gi 66546657	29/131	11	5.57/56.32	4.82/1

7	2.1	PREDICTED: similar to stubarista CG14792-PA, isoform A	<i>Apis mellifera</i> / gi 66524293	26/114	6	4.94/34.03	3.28/1
8	2.0	PREDICTED: similar to Actin 88F CG5178-PA	<i>Apis mellifera</i> / gi 66509789	21/109	6	5.56/41.82	2.78/0.83
9	2.0	PREDICTED: similar to Calreticulin CG9429-PA isoform 1	<i>Apis mellifera</i> / gi 66545506	27/124	10	4.45/47.57	3.38/0.83
10	3.0	PREDICTED: similar to antdh CG1386-PA	<i>Apis mellifera</i> / gi 66548280	28/89	5	4.93/26.67	2.75/0.83
11	*	major royal jelly protein 7	<i>Apis mellifera</i> / gi 62198227	19/98	7	4.90/50.93	NA ^{b)}
12	*	major royal jelly protein 2	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585108	28/131	12	6.83/51.54	NA ^{b)}
Proteínas mais expressas no cérebro da campeira							
13	10.8	alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585164	15/98	8	5.06/65.74	8.62/1
14	2.5	similar to Protein lethal(2)essential for life (Protein Efl21)	<i>Apis mellifera</i> / gi 110750762	42/108	7	5.37/22.59	5.65/1
15	3.1	similar to Sarcoplasmic calcium-binding protein 2 CG14904-PA	<i>Apis mellifera</i> / gi 48140312	26/81	5	4.79/21.47	4.68/1

16	3.9	Transferrin	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585086	25/212	15	6.77/80.38	3.49/0.83
17	5.6	alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585164	19/96	12	5.06/65.74	2.90/1
18	2.0	PREDICTED: similar to Glutamine synthetase 2 CG1743-PC, isoform C	<i>Apis mellifera</i> / gi 48141383	27/102	9	6.42/41.95	4.15/1
19	*	alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585164	24/115	14	5.06/65.74	NA ^{b)}
20	*	alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera</i> / gi 58585164	27/179	11	5.06/65.74	NA ^{b)}

*: *Spot* estado específico (Presente em mais de 5 géis em um grupo e ausente no outro grupo)

a) *Spot* diferencialmente expresso sendo o valor de $t > 2.75$ e o valor de $D > 0.449$ for $n=12$ foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0.01$.

b) NA – Não aplicável.

Um total de catorze proteínas foram identificadas com pontuação maior que 100 e cobertura na seqüência superior a 24%, sendo a tolerância de massa do peptídeo <100 ppm em todos os casos. Além disso, o fato da proteína coincidir com a espécie *Apis mellifera* foi considerado como um critério importante para apoiar a identificação, pois nenhuma restrição taxonômica foi imposta durante a pesquisa no banco de dados. Todas as proteínas identificadas migraram em valores de *pI* e *Mr* muito semelhantes aos esperados. O cérebro da nutridora revelou alta expressão das principais proteínas da geléia real MRJP1, MRJP2 e MRJP7 e proteínas associadas à síntese protéica. Nas campeiras experimentadas foram mais expressas proteínas relacionadas a outros processos metabólicos.

Três proteínas foram identificadas em dois ou mais *spots*: MRJP1, alfa-glucosidase e *similar to ERp60 isoform A isoform 2*. Os dois primeiros aparecem como grupos de *spots* distribuídos ao longo do eixo de *Mr* e de *pI*, sugerindo modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação ou modificação por ácido siálico (Figura 9A, B). A glicosilação de MRJP1 foi reportada previamente^[94]. Ainda não foi relatada fosforilação ou modificação por ácido siálico para estas proteínas, no entanto foi relatado polimorfismo genético para MRJP3^[95]. Outras caracterizações devem ser realizadas para verificar a possibilidade, identidade, localização e função de tais modificações pós-traducionais hipotéticas sobre essas proteínas alvo.

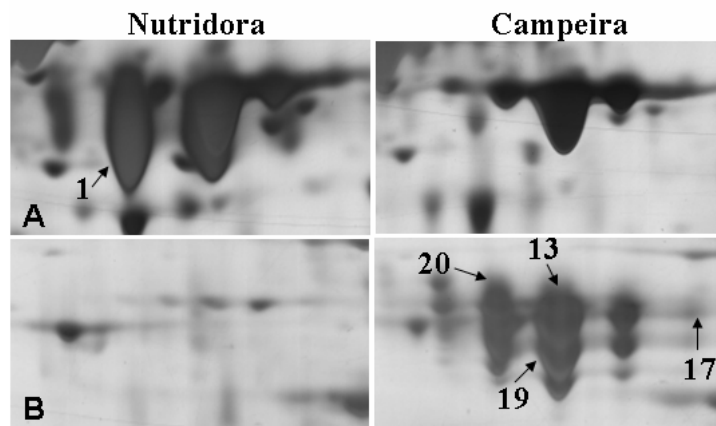


Figura 9. Regiões ampliadas do gel 2-DE mostrando isoformas de proteínas expressas diferencialmente A: número 1 indica MRJP1, B: números 13, 17,19 e 20 indicam isoformas da alfa-glucosidase .

Outros *spots* de proteínas que mostraram diferença significativa na expressão não puderam ser identificados pela estratégia de PMF devido à baixa quantidade de proteína

para obter identificação confiável. Outras proteínas compreendiam possíveis isoformas, e nesses casos, as proteínas dos extremos foram identificadas, o que nos permitiu supor que as proteínas localizadas entre os extremos poderiam ser as mesmas.

4.3 Expressão diferencial de proteínas por 2-DE e função biológica

Três proteínas detectadas e identificadas como mais expressas no cérebro da nutridora (MRJP1, MRJP2 e MRJP7) também foram detectadas na secreção da glândula hipofaríngea em nutridoras^[40]. Estas proteínas estão relacionadas com a determinação de casta e funções sociais durante diferenciação das larvas em abelhas, e também desempenham um papel importante na alimentação das mesmas^[96].

Expressões gênicas destas proteínas no cérebro de abelhas foram previamente relatadas. Por exemplo, o gene da MRJP1 (Swiss-Prot/TrEMBL número de acesso D79207) é expresso em um subconjunto das células de Kenyon dos corpos cogumelares^[97], sugerindo um papel para esta proteína no cérebro. Além disso, o mRNA para MRJP2 e MRJP7 foi detectado no tecido cerebral nas operárias^[98]. Ainda pouco se sabe sobre a função destas proteínas no cérebro de abelhas. É provável que as MRJPs tenham uma função no cérebro como fontes de aminoácidos essenciais para a síntese protéica, especialmente durante o processo de ontogenia da nutridora a campeira.

A fim de confirmar a presença de MRJP1 no cérebro de abelhas e para descartar possível contaminação a partir da glândula hipofaríngea, experimentos de imunolocalização foram realizados em três regiões do cérebro da operária nutridora. Microscopia eletrônica revelou a presença de marcação para MRJP1 no lobo antenal, lobo óptico e corpos cogumelares (Figura 10).

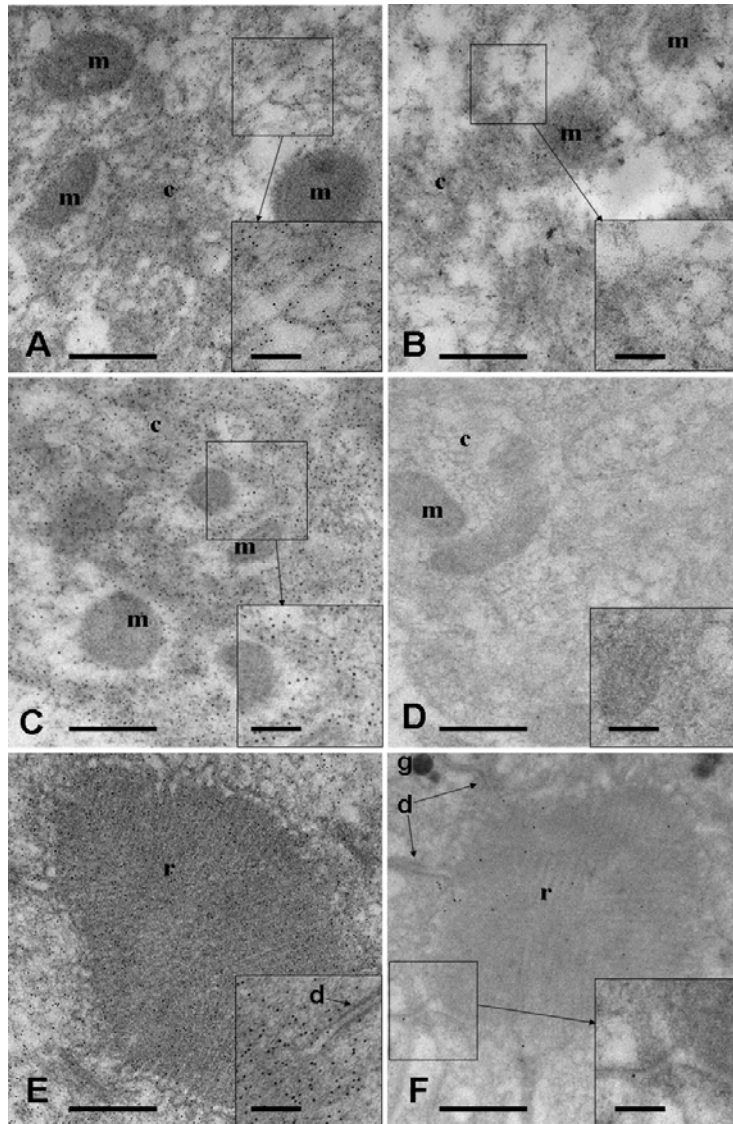
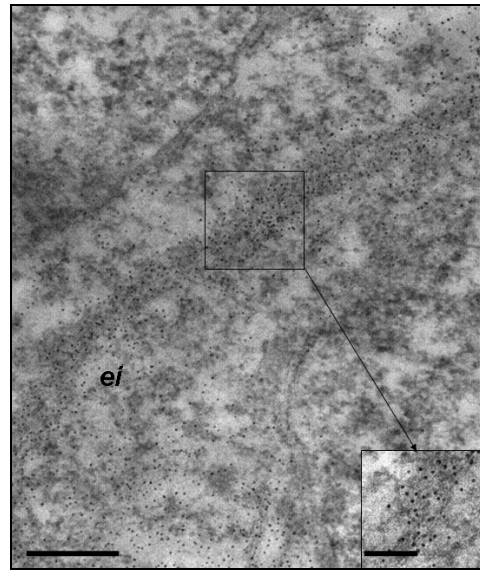


Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de três regiões de cérebro de abelha imunomarcadas com anti-MRJP1 e ouro coloidal. A: Corpos cogumelares, B: Controle; C: Lobo antenal, D: Controle; E: Lobo óptico, F: Controle. As barras em cada foto representam: esquerda: 0.5 μ m, direita: 0.2 μ m. c: citoplasma, m: mitocôndria, r: rabdoma, d: desmossomos, g: grânulo pigmentado. O controle consistiu em aplicar o mesmo procedimento sem anticorpo primario (anti-MRJP1) para as três regiões do cerebro

A MRJP1 está localizada no citoplasma, enquanto que em mitocôndrias não foi observada a marcação. Pela orientação, MRJP1 parece estar depositada em filamentos no citoesqueleto (Figura 10A). Na Figura 10E, observa-se MRJP1 depositada no rabdoma, estrutura presente em células de retina, composta por numerosos microtúbulos. Estas evidências sugerem que MRJP1 poderia ser uma proteína associada

a filamentos. As imagens também mostraram que esta proteína encontra-se no espaço intercelular de células dos corpos cogumelares, tal como se observa na Figura 11. Isto indica que MRJP1 é também uma proteína secretada. Tal conjunto de resultados sugere que MRJP1 poderia ter extra e inesperada função além de ser apenas uma provável reserva de aminoácidos para a síntese protéica no cérebro.



Três proteínas mais expressas em cérebro de nutridora (proteína *similar to calreticulin isoform 1*, *similar to TER94 isoform A isoform 1* e *similar to AntDH*) não têm a sua função descrita em *Apis mellifera*. Curiosamente, proteínas homólogas de *Drosophila* provavelmente desempenham papéis no sistema olfativo.

Figura 11. Imagem de microscopia eletrônica mostrando imunomarcação na região intercelular dos corpos cogumelares, ei: espaço intercelular. Barra esquerda: 0.5 μm , barra direita: 0.2 μm .

A calreticulina é uma chaperona multifuncional que liga Ca^{2+} e é implicada em vários processos celulares [99,100]. Calreticulina é um modulador essencial tanto nas funções de adesão celular como no início da sinalização mediada por integrina [101]. Outros genes que podem agir em adesão celular e também na união a Ca^{2+} (BM-40-SPARC), têm maior expressão no cérebro da nutridora [6]. Estudos anteriores indicam que, em *Drosophila*, a calreticulina desempenha um papel fundamental nas funções do sistema olfativo, possivelmente estabelecendo sensibilidade global a odorantes [102]. As reações comportamentais aversivas a odorantes são comprometidas em mutantes *Crc* (gene da calreticulina) de *Drosophila*. Esta deficiência na aversão ao odor não é específica a uma classe de odorante e parece estar correlacionada a uma mudança na potência do odorante [102].

Estudos de imunomarcação em adultos de *Drosophila* demonstraram que TER94 é predominante em sistema nervoso (corpos cogumelares e glomérulo antenal) [103]. O glomérulo antenal compreende as terminações de neurônios olfativos primários e dendritos de interneurônios. Os corpos cogumelares são órgãos que aparentemente desempenham uma função no processamento e armazenamento de informações

quimiosensoriais, e se acredita que é o local de aprendizagem olfativa ^[104]. O elevado nível de TER94 nestes tecidos pode refletir a necessidade desta proteína para o desenvolvimento dos cones de crescimento e pode ajudar na orientação por catalisar o evento de fusão de membrana entre TER e o cone de crescimento ^[103].

Quanto a AntDH, análises de *northern blots* e de hibridização *in situ* em crioseções de cabeça e antenas de *Drosophila* mostraram que a expressão desta proteína é restrita ao terceiro segmento antenal, sugerindo um papel para AntDH na olfação ^[105].

Outra proteína que resultou ser mais expressa no cérebro da nutridora foi a actina 88F. Já foi demonstrado anteriormente elevada concentração de F-actina no glomérulo olfativo em *Apis mellifera*, indicando que esta é uma característica essencial de tal sistema, mas provavelmente relacionado com um elevado grau de plasticidade sináptica e estrutural dentro das neuropilas do glomérulo do centro primário ^[106, 107]. Além disso, a surpreendente plasticidade de longo prazo no adulto que contém complexos glomerulares ricos da F-actina nas regiões da entrada visual e olfativa do cálice dos corpos cogumelares sugere que estas alterações sinápticas possam desempenhar um papel causal em adaptações comportamentais idade-específica e de castas ^[107].

Convém notar que as quatro proteínas descritas acima são potencialmente relacionadas com o sistema olfativo. Essas proteínas foram encontradas mais expressas no cérebro da nutridora. À medida que o ambiente no interior da colméia está escuro, a nutridora deve contar com a comunicação à base de odor para realizar o seu comportamento. Um interessante estudo recente mostrou os efeitos da idade cronológica da abelha do mel e do papel social sobre a sensibilidade sensorial e a performance da aprendizagem olfativa associativo ^[108]. A redução na aquisição da função olfativa foi relacionada com a função social, mas não com a idade cronológica. Este declínio ocorreu apenas em campeiras com longa experiência no forrageamento, mas ao mesmo tempo as campeiras apresentaram menor generalização dos odores, o que é indicativo de aprendizagem mais precisa. Além disso, campeiras que foram revertidas a partir de forrageamento para tarefas de nutridora, não apresentaram déficits na aquisição olfativa ^[108].

Outras quatro proteínas que foram mais expressas no cérebro da nutridora em comparação com campeira foram: *protein similar to ERp60 CG8983-PA isoform A isoform 2*, *protein similar to T-complex chaperonin 5 CG8439-PA isoform A*, *protein similar to CG8351-PA isoform 1* e *protein similar to stubarista CG14792-PA isoform A*.

Todas elas agem no enovelamento de proteínas durante o processo de síntese protéica, com exceção da stubarista que funciona como uma proteína ribossomal. Além disso, ERp60 pertence à família da proteína dissulfeto isomerase (PDI), que interage com calreticulina no ciclo de enovelamento de glicoproteínas^[109]. As nutridoras precisam de alta atividade de síntese protéica para desenvolver a maquinaria protéica necessária para as mudanças na estrutura cerebral que precedem a ontogênese a campeiras, o que justifica uma maior expressão dessas proteínas.

Campeiras experientes apresentaram maior expressão em comparação com nutridoras de alfa-glucosidase, transferrina, proteína semelhante à glutamina sintetase 2 isoforma C e uma proteína similar à proteína sarcoplasmática ligante de cálcio 2 (do inglês - *similar to sarcoplasmic calcium-binding protein 2*).

A alfa-glucosidase é secretada pela glândula hipofaríngea e converte a sacarose, o principal componente do néctar, em glicose e frutose^[110,111]. Estudos utilizando microarranjos de *DNA* e *Northern blottings* mostraram que o gene da alfa-glucosidase é mais expresso na cabeça de abelhas experientes quando comparado com as mais jovens^[37]. Alfa-glucosidase também é conhecida como uma enzima envolvida na degradação de glicogênio e oligossacarídeos, e produtos de metabolismo de carboidratos são utilizados não apenas como combustível para os vôos de forrageamento^[112], mas também para os nutrientes de neurônios em abelhas^[113]. A elevada expressão da alfa-glucosidase no cérebro poderia estar relacionada com o aumento das necessidades energéticas associadas à maior atividade cerebral durante os processos de aprendizagem e de memorização que são acionados mediante forrageamento.

Transferrina, uma proteína de ligação de ferro, teve sua expressão incrementada no cérebro da campeira, o que coincide com pesquisas anteriores que descreveram, em nível transcricional, uma alta concentração de seu mRNA nas neuropilas do cérebro central e nos olhos pigmentados do que em outras partes do corpo de abelhas operárias campeiras^[114]. Além disso, a exposição das abelhas recém emergidas à luz constante por 24 h conduziu a 50% de aumento na expressão da AmTRF (gene da transferrina em *A. mellifera*)^[114]. A Transferrina poderia então ser importante para o sistema nervoso das campeiras para lidar com novos insumos visuais fora da colméia. Os elevados níveis de mRNA para transferrina no sistema nervoso central da abelha poderiam também estar associados a um papel potencial como componente num mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS). Curiosamente, os últimos resultados indicaram que o ciclo redox celular normal em abelhas é fundamental para o

processamento olfativo, e o quelante de ferro impede o estresse oxidativo mediado por ROS [115]. Nos insetos, a transferrina pertence a uma família multigene [116], e apresenta outros possíveis papéis como proteína de transporte de ferro, agente antibiótico, indutor de vitelogenina e é uma proteína reprimida por hormônio juvenil [117].

Outra proteína que mostrou elevada expressão no cérebro da campeira foi identificada como proteína sarcoplasmática ligante de cálcio 2 (do inglês - *similar to sarcoplasmic calcium-binding protein 2, dSCP2*). O produto do gene dSCP2 de *Drosophila* mostrou atividade de JHDK (hormônio juvenil diol quinase) e sua sequência é similar à de JHDK de *Manduca sexta* [118]. A modelagem molecular para estas proteínas revelou homologia estrutural com proteína-G e proteínas ligantes de cálcio. Análise proteômica e de hibridização *in situ* revelou que a expressão de JHDK foi alta nos corpos cogumelares no cérebro da abelha campeira [119]. JHDK é uma importante enzima envolvida na via de degradação do hormônio juvenil (JH). Altos níveis de JHDK no cérebro da abelha campeira poderiam ser requeridos para a regulação dos títulos de JH. Existem evidências de que JH provoca mudanças na estrutura do cérebro da abelha relacionados com a maturação comportamental e polietismo [9]. Por outro lado, a proteína sarcoplasmática ligante de cálcio 2, também conhecida como calexitina, tem sido ligada à memória associativa e a mobilização de Ca^{2+} intracelular [120]. Também foi sugerido que JHDK está envolvida no processo de sinalização mediada por Ca^{2+} nos corpos cogumelares e poderia contribuir para a alta capacidade de aprendizagem e memória na abelha [119].

Uma putativa glutamina sintetase 2 (GS2) foi outra proteína com elevada expressão significativa no cérebro da campeira quando foi comparada com nutridora. Um recente estudo avaliou as bases moleculares de fenótipos de vôo em mutantes defeituoso de vôo de *Drosophila* para o receptor inositol 1,4,5- triphosphate (InsP3R), um canal intracelular de liberação de Ca^{2+} . Para isso, foi feito uma varredura de microarranjos com RNA isolado de cabeças e tórax de adultos. Foi observada diminuição na expressão de vários genes que influenciam a excitabilidade dos neurônios e músculos. Dentre estes, o papel da glutamina sintetase 2 foi investigado. Esta enzima reduz os níveis de glutamato na sinapse. Transcritos para a enzima glutamina sintetase 2 foram reduzidos significativamente em mutantes InsP3R de *Drosophila*. Isto foi acompanhado por baixas concentrações de glutamato, assim como também pelo aumento de ramificações axonais e o número de sinapse da junção neuromuscular do vôo. Foi proposto um mecanismo não autônomo da célula para o controle dos níveis de glutamato e a

expressão de Gs2 por sinais Ca^{2+} gerados através de InsP3R. Níveis destas moléculas podem ser importantes para a manutenção da estabilidade do vôo. Uma função similar para a glutamina sintetase 2 poderia ser proposta no modelo de abelhas. A campeira, que deve ter um complexo comportamento motor para o desempenho dos vôos de forrageamento, mostrou maior expressão no cérebro de uma das isoformas da enzima em relação às nutridoras, de acordo com nossos resultados.

GS2 foi identificada em dois *spot* com diferentes *pIs* (Figura 12), mas apenas no *spot* 18 a expressão diferencial foi estatisticamente significativa entre os grupos. Os espectros de massas e da correspondência dos peptídeos teóricos com experimentais para estes dois *spots* são mostrados na Figura 13.

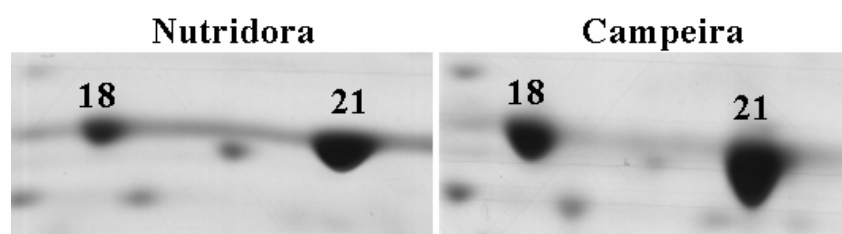


Figura 12. Regiões ampliadas do gel 2-DE mostrando isoformas da glutamina sintetase 2

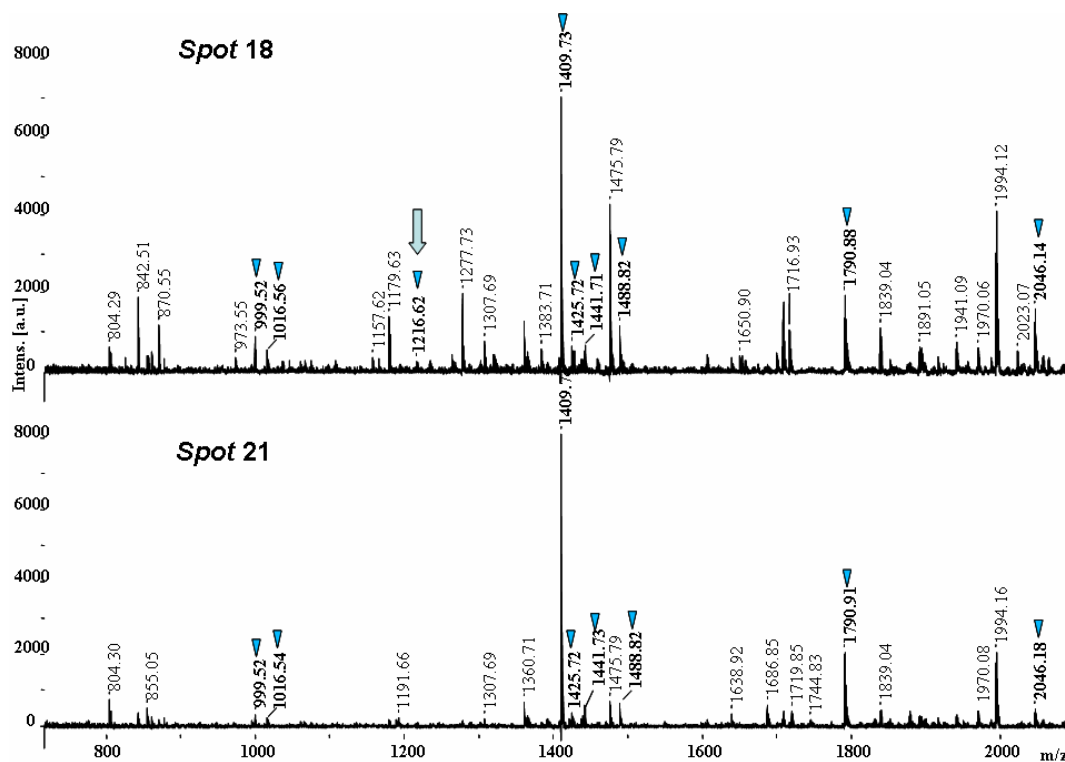


Figura 13. Exemplo representativo dos espectros de massas MALDI-TOF da digestão trípica de dois *spots* identificados como proteína semelhante à glutamina sintetase 2, isoforma C. Picos sinalizados indicam peptídeos experimentais pareados com os teóricos para ambos *spots*. Seta azul indica peptídeo não encontrado no *spot* 21

Adicionalmente, foi encontrado que a proteína letal (2) essencial para a vida (proteína Efl21) foi mais expressa no cérebro da campeira. Trabalhos prévios utilizando hibridação por *Northern blots* também mostraram que o gene que codifica para esta proteína foi mais expresso na cabeça da abelha campeira [37]. Esta proteína tem função desconhecida em *Apis mellifera*, mas parece ser uma chaperona (do inglês - crystallin-like chaperonin, HSP20) codificada pelo gene letal (2) essencial para a vida (*l2efl*) em *Drosophila melanogaster* [121].

4.4 Análise qualitativa das proteínas totais identificadas por MudPIT

Foram identificadas um total de 2.742 proteínas a partir das amostras dos cérebros das abelhas nutridoras e campeiras (para dados completos, vide CD em anexo) . As contagens dos espectros totais para campeira e nutridora foram 21.948 e 28.431, respectivamente. As proteínas identificadas representam 27,4% do conjunto de 10.157 genes preditos a partir da avaliação inicial do genoma de *A. mellifera* [122]. Até a presente data, este é o primeiro mapeamento em grande escala do proteoma cerebral da abelha operária *A. mellifera*.

A Tabela 2 apresenta o total de proteínas categorizadas pelo catálogo KOG. Proteínas que se expressam tanto em nutridoras quanto em campeiras são representadas com NC, aquelas que se expressam apenas em nutridoras e não estão incluídas em NC são representadas no grupo N e aquelas unicamente expressas em campeiras estão representados no grupo C.

Tabela 2. Quantidade total de proteínas para cada grupo.

	Total de proteínas identificadas por MudPIT	Total de proteínas categorizadas NrBlast	Hits	No Hits
NC	1619	1514	1376	138
N	1123	1096	985	111
C	245	230	189	41
Total Nr	2742	2840		

Nr: Não redundante

Hits: aquelas proteínas que foram categorizadas segundo o pareamento com seqüências homólogas no catálogo KOG.

As funções principais do grupo de proteínas NC, incluíram: produção e conversão de energia (C-6,5%); mecanismos de transdução de sinal (T-8,8%); modificação pós-traducional, reciclagem de proteína e chaperonas (O-10,5%); e tradução, estrutura ribossomal e biogênese (J-6,7 %) (Figura 14 A).

Uma vantagem da tecnologia MudPIT é que permite a identificação de proteínas com baixo número de cópias por célula. Por exemplo, proteínas envolvidas nos mecanismos de transdução de sinal (T), várias das quais pouco concentradas em células, representaram uma grande fração nos três grupos (NC- 8,8%, N- 10,3% e C- 7,4%, Figura 14).

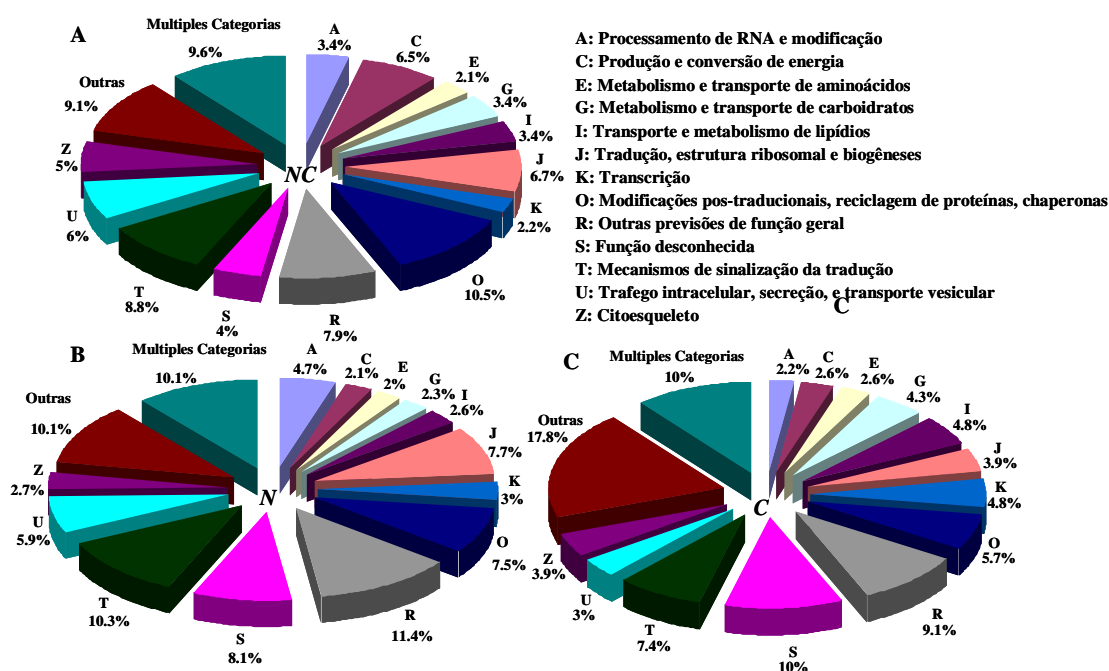


Figura 14. Esquema representativo da classificação nas principais categorias da KOG. A: grupo NC-proteínas identificadas em nutridora e campeira; B: grupo N-proteínas identificadas exclusivamente em nutridora; C: grupo C-proteínas identificadas exclusivamente em campeira.

Exemplos deste grupo foram as subunidades catalítica e regulatória de proteínas quinases A: *similar to cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (PKA C) isoform 1*(XP_393285.1) e *cAMP-dependent protein kinase type II regulatory chain*. Estudos anteriores demonstraram que *cAMP-dependent kinase (PKA)* contribuiu na indução para a formação de memória de longo prazo em abelhas (*Apis mellifera*) [123]. Outro exemplo foi *PREDICTED: similar to Calcium/calmodulin-dependent protein kinase CG6703-PB, isoform B isoform 1* (XP_394821.3). A expressão de

Ca²⁺/calmodulin-dependente proteína quinase II (CaMKII) nos corpos cogumelares do cérebro das abelhas foi reportada anteriormente [124].

Os principais reguladores dos processos celulares, tais como os fatores de transcrição, normalmente existem em um número muito reduzido de cópias por célula e, por isso, são difíceis de detectar por 2-DE. Exemplos de proteínas identificadas neste grupo foram: *PREDICTED: similar to Nuclear transcription factor Y subunit gamma* e *PREDICTED: similar to C-terminal-binding protein (CtBP protein) (dCtBP) isoform 1*.

As proteínas de membrana desempenham um papel central na adesão celular, transdução de sinal e transporte molecular, e são escassamente identificadas pelo procedimento tradicional de 2-DE. Neste trabalho, várias translocases e outras proteínas de membrana da vesícula sináptica foram identificadas com dois ou mais peptídeos (vide CD em anexo).

Outras proteínas que se identificaram como mais abundantes foram proteínas *housekeeping* como, por exemplo, chaperonas (NC-10,5%) e proteínas envolvidas com a tradução, estrutura ribossomal e biogênese (NC-6,7%).

Não foi possível atribuir função pelo catálogo KOG para cerca de 10% das proteínas nos grupos NC e N, e 18% na C. Isto pode ser explicado pelo fato de serem proteínas específicas da espécie *A. mellifera*, e, como o catálogo procura a função segundo a similaridade da seqüência com outras espécies, neste caso não houve coincidência (exemplos, as MRJPs). Cerca de 4, 8, e 10% das proteínas identificadas tinham função desconhecida nos grupos NC, N e C, respectivamente.

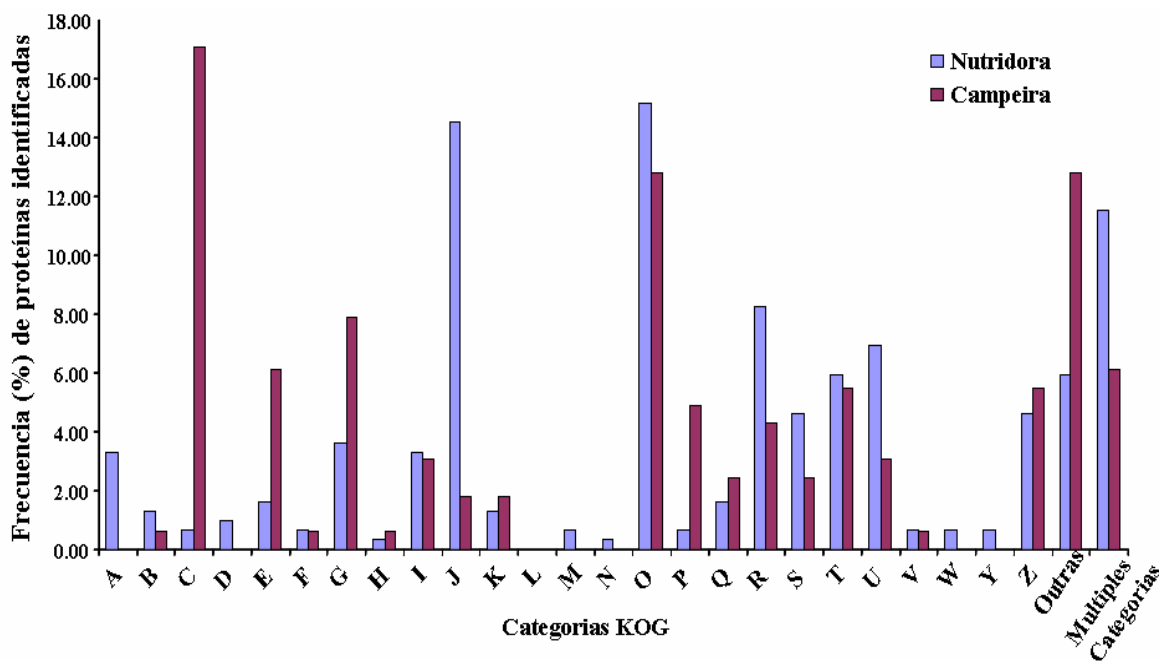
O genoma de *Apis mellifera* foi recentemente sequenciado pelo *Honey Bee Genome Sequencing Consortium* (HBGSC) (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>). Uma versão avançada (versão 4.0) da montagem do genoma da abelha foi lançada em março de 2006 e publicada em outubro daquele ano [125]. Porém, até o momento não existem ferramentas suficientes para uma análise automática mais profunda na caracterização de proteínas de *A. mellifera*, por exemplo, para caracterizar proteínas de acordo com domínios de transmembranas, *pI*, localização celular, etc. Além disso, nem todas as bases de dados são atualizadas com o genoma sequenciado de *A. mellifera*.

4.5 Diferenças proteômicas quantitativas entre cérebros de nutridora e de campeira

Após aplicar a normalização por *Spectral Count*, 467 proteínas (17% do total de proteínas) foram encontradas como diferencialmente expressas. Dentre essas, 164

proteínas são mais abundantes ou apenas expressas em campeiras, enquanto que 303 são mais abundantes ou apenas expressas em nutridoras (Tabela Suplementar 1, Vide CD em Anexos).

A comparação do conjunto de proteínas, especificamente aquelas implicadas na tradução, estrutura ribossomal e biogênese (J), revelou que foram identificadas mais proteínas nessa categoria em nutridoras (14,5%) que em campeiras (1,8%), Figura 15.



Metabolismo

- C: Produção e conversão de energia
- D: Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão de cromosoma
- E: Transporte e metabolismo de aminoácidos
- F: Transporte e metabolismo de nucleotídeos
- G: Transporte e metabolismo de carboidratos
- H: Transporte e metabolismo de coenzimas
- I: Transporte e metabolismo de lipídios
- P: Transporte e metabolismo de íons metálicos
- Q: Biosínteses de metabolitos secundários, transporte e catabolismo

- M: Parede celular/membrana/envelope biogenesis
- N: Mobilidade celular
- O: Modificações pos-traducionais, reciclagem de proteínas, chaperonas
- T: Mecanismos de sinalização da tradução
- U: Tráfego intracelular, secreção, e transporte vesicular
- V: Mecanismos de defesa
- W: Estrutura extracelulares
- Y: Estrutura nuclear
- Z: Citoesqueleto

Armazenamento e processamento da informação

- A: Modificação e processamento de RNA
- B: Dinâmica e estrutura da cromatina
- J: Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses
- K: Transcrição
- L: Replicação, recombinação e reparação

Caracterizado pobremente

- R: Outras previsões de função geral
- S: Função desconhecida

Figura 15. Freqüência das proteínas segundo as categorias do catálogo KOG que mostrou mudanças significativas na expressão entre os dois grupos.

O alto nível desse conjunto de proteínas (J) poderia refletir a alta atividade de síntese de proteínas em nutridoras para desenvolver a maquinaria protéica necessária para as mudanças na estrutura cerebral que antecede a ontogênese para campeira. Além

disso, proteínas relacionadas a modificações pós-traducionais, reciclagem de proteínas, chaperonas (O); estrutura e dinâmica da cromatina (B); tráfico intracelular, secreção, transporte vesicular (U) também foram mais abundantes no cérebro de nutridora (Figura 15).

O cérebro de nutridora exclusivamente mostrou expressão de proteínas associadas a modificação e processamento de RNA (A) e ao controle do ciclo celular, divisão celular e divisão de cromossomos (D). Essa maior expressão das proteínas referidas acima sugere uma diferenciação e desenvolvimento cerebral nas abelhas operárias jovens. É conhecido que a transição de nutridora a campeira implica mudanças na estrutura cerebral ^[126].

Outras proteínas envolvidas na biogênese de parede celular / membrana / envelope (M) e mobilidade celular (N) foram identificadas exclusivamente no cérebro de nutridora.

A Tabela 3 mostra proteínas que foram expressas exclusivamente no cérebro de nutridora com a maior contagem espectral depois da normalização. Um exemplo de proteína expressa exclusivamente no cérebro da nutridora com alta contagem espectral foi *PREDICTED: similar to 14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2* (XP_623183.1). De acordo com o banco de dados Gene Ontology (GO), por homologia a proteína 14-3-3 zeta é necessária para a proliferação celular dependente de *Raf* e na diferenciação do fotorreceptor durante o desenvolvimento dos olhos. Pode estar relacionada também com a aprendizagem olfativa em *Drosophila*. 14-3-3 zeta foi também uma das seqüências de *Apis* coincidente com o gene correspondente de *Drosophila* que é implicado no comportamento ^[127].

Outra proteína encontrada pela contagem espectral específica no cérebro da nutridora foi *PREDICTED: similar to moleskin CG7935-PA, partial*. De acordo com GO, esta proteína está envolvida na proliferação e diferenciação celular (ex: na diferenciação celular de cone de olhos compostos).

Vitelogenina foi expressa seletivamente no cérebro de nutridora. Sabe-se que a *vitelogenina* é predominante na hemolinfa, e que a alta taxa de síntese desta proteína é uma das principais características definidoras da abelha nutridora ^[128, 129, 130, 131, 132, 133].

O fator de transcrição putativo *mblk-1* foi também apenas expresso no cérebro da nutridora. Um estudo anterior indicava que *mblk-1* é um fator de transcrição que poderia funcionar nos circuitos neurais dos corpos cogumelares ^[134].

Outros exemplos de proteínas seletivamente expressas no cérebro de nutridora com alta contagem espectral são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Exemplos de proteínas seletivamente expressas e com maiores contagem espectrais em cada grupo de operaria. O total de proteínas diferencialmente ou seletivamente expressas com as respectivas contagens de espectros está na Tabela Suplementar 1 (Vide CD em Anexos).

No. de acesso	Proteína identificada	Organismo/Operaria	<i>Spectral Count</i> normalizado	Categorias KOG
XP_623183.1	PREDICTED: similar to 14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	<i>Apis mellifera</i> /nutridora	39.5	Modificações pós-traducionais, reciclagem de proteínas, chaperonas
XP_624116.2	PREDICTED: similar to moleskin CG7935-PA, partial	<i>Apis mellifera</i> /nutridora	23.5	Estrutura nuclear; trafego intracelular, secreção e transporte vesicular
XP_392511.2	PREDICTED: similar to eIF5 CG9177-PB, isoform B isoform 1	<i>Apis mellifera</i> /nutridora	20.5	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese
XP_624598.1	PREDICTED: similar to lethal (1) G0022 CG8231-PA KOG0359, Chaperonin complex component, TCP-1 zeta subunit (CCT6)	<i>Apis mellifera</i> /nutridora	16.5	Modificações pós-traducionais, reciclagem de proteínas, chaperonas
XP_393135.2	PREDICTED: similar to Ribosomal protein L23A CG7977-PA KOG1751, 60s ribosomal protein L23	<i>Apis mellifera</i> /nutridora	14.5	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese
XP_395962.2	PREDICTED: similar to p115 CG1422-PA KOG0946, ER-Golgi vesicle-tethering	<i>Apis mellifera</i> /nutridora	13.5	Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular

XP_394518.1	protein p115 PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938- PA, isoform A	<i>Apis mellifera/nutridora</i>	12.5	Modificações pós-traducionais, reciclagem de proteínas, chaperonas
XP_001120061 .1	PREDICTED: similar to Connectin CG7503-PA KOG4194, Membrane glycoprotein LIG-1	<i>Apis mellifera/nutridora</i>	11.5	Mecanismos de transdução de sinal
XP_624589.1	PREDICTED: similar to Calmodulin CG8472-PA, isoform A isoform 2	<i>Apis mellifera/nutridora</i>	9.5	Mecanismos de transdução de sinal
XP_624212.1	PREDICTED: similar to Nucleoporin Nup43 (p42)	<i>Apis mellifera/nutridora</i>	9.5	Estrutura nuclear
XP_623220.1	PREDICTED: similar to Tubulin alpha-1 chain	<i>Apis mellifera/campeira</i>	575.6	Citoesqueleto
BAE86928.1	alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera/campeira</i>	367.1	Metabolismo e transporte de carboidratos
AAP93583.1	thioredoxin reductase	<i>Apis mellifera ligustica/campeira</i>	44.5	Modificações pós-traducionais, reciclagem de proteínas, chaperonas
XP_623225.1	PREDICTED: similar to Ras-like GTP-binding protein Rho1 isoform 2	<i>Apis mellifera/campeira</i>	25.1	Predição de função geral
AAM20738.1	alpha-amylase	<i>Apis mellifera mellifera/campeira</i>	19.9	Metabolismo e transporte de carboidratos
XP_392060.2	PREDICTED: similar to CG6180-PA isoform 1,	<i>Apis mellifera/campeira</i>	19.9	Predição de função geral

ABH88169.1	KOG3346:Phosphatidyletanolamine binding protein chemosensory protein 1	<i>Apis mellifera</i>	12.2	Não pareamento por homologia de seqüência
XP_393296.2	PREDICTED: similar to Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	<i>Apis mellifera/campeira</i>	12.2	Mecanismos de transdução de sinal, predição de função geral
XP_392280.2	PREDICTED: similar to mitochondrial acyl carrier protein 1 CG9160-PB, isoform B isoform 1	<i>Apis mellifera/campeira</i>	10.9	Produção e conversão de energia; metabolismo e transporte de lipídeos; transporte, catabolismo e biosíntese de metabolitos secundários
XP_001123234.1	PREDICTED: similar to Catalase, partial	<i>Apis mellifera/campeira</i>	9.6	Metabolismo e transporte de íons inorgânicos

A maior parte das proteínas da operaria nutridora, tanto mencionadas acima como as representadas na Tabela 3, são relacionadas ao processo de síntese protéica e de proliferação e diferenciação celular, evidenciando uma vez mais a alta atividade de síntese de proteínas e de desenvolvimento de estruturas cerebrais nesta operaria.

Quando comparamos a fração de proteínas envolvidas na produção e conversão de energia, as campeiras experientes mostraram uma marcada diferença neste conjunto de proteínas (17%) em relação à operaria nutridora (0,6%) (Figura 15). A grande fração de proteínas dentro desta categoria pode estar relacionada ao aumento das necessidades energéticas associadas à maior atividade cerebral durante processos de aprendizagem e de memorização que são acionados mediante forrageamento.

Exemplos de proteínas mais expressas nesta categoria ou apenas expressas no cérebro da operaria campeira foram: alfa-glucosidase, glicose oxidase, alfa-amilase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, uma glicose desidrogenase putativa e citocromo C. Genes de várias destas enzimas metabólicas foram identificados na cabeça de abelhas experientes quando comparadas com as mais jovens utilizando *DNA micro-arrays* e *Northern blottings* [37]. Alfa-glucosidase, glicose oxidase e alfa-amilase foram encontradas seletivamente expressas na glândula hipofaríngea da operaria campeira [135,111].

Foi detectada expressão mais alta de *PREDICTED: similar to Guanine nucleotide-binding protein gamma-e subunit precursor (Ggamma(e))*, (XP_001120307.1) em relação ao cérebro de nutridora. De acordo com GO, esta subunidade está implicada na transdução de sinal visual do olho e é um elemento dos rbdômeros, participando no processo de fototransdução. Sabe-se que campeiras são capazes de discriminar entre cores de flores na busca de alimentação e precisam de um sistema visual bem desenvolvido para isso.

A proteína *PREDICTED: similar to Serine/threonine-protein phosphatase PPI-beta catalytic subunit* (XP_393296.2) foi identificada somente no cérebro de campeiras. De acordo com GO, por homologia, a PP1 participa na regulação do metabolismo de glicogênio e está envolvida na regulação da condutância iônica e na plasticidade sináptica de longo prazo.

Outros exemplos de proteínas expressas seletivamente no cérebro de campeira com alta contagem espectral são mostrados na Tabela 3.

A proteína *PREDICTED: similar to Carbonic anhydrase 1 CG7820-PA* (XP_392359.1) foi mais abundante na operaria campeira, mas não exibiu mudanças

quantitativas estatisticamente significativas quando o teste G foi aplicado. Um trabalho anterior mostrou elevada expressão de um gene da anidrase carbônica (similar to *CAHI*)^[136], a qual desempenha importante papel na plasticidade sináptica e cognição em mamíferos, incluindo a aprendizagem e a memória espacial^[137].

A presente abordagem de MudPIT foi capaz de identificar amplamente uma grande gama de proteínas. Outras proteínas importantes, como a proteína quinase dependente de GMPc, que é considerada como implicada na regulação de forrageamento^[32], e o transportador de manganês, também tido como relacionado à divisão de trabalho em abelhas^[138], não foram identificadas neste trabalho. A expressão de ambos mRNAs no cérebro de abelhas campeiras foi associada com o comportamento forrageador. No primeiro trabalho, os autores demonstraram que *Amfor* (o gene para o forrageamento de *A. mellifera*, que codifica para uma guanosina 3', 5'-monofosfato proteína quinase dependente de GMPc- (PKG)), é altamente expresso na lâmina dos lobos ópticos e nos corpos cogumelares do cérebro das campeiras, e, além disso, confirmaram que o cérebro de campeiras tinha níveis de mRNA de *Amfor* significativamente maiores do que as abelhas nutridoras. Esta diferença entre níveis de mRNAs e proteínas não é surpreendente, já que há vários trabalhos que mostram que essa correlação não é direta^[46,47,48]. Tal fato reforça a necessidade de se utilizar análise proteômica quando se deseja determinar concentrações relativas de produtos gênicos finais – as proteínas.

Por último, proteínas envolvidas no transporte e metabolismo de aminoácidos; transporte e metabolismo de carboidratos e transporte e metabolismo de íons inorgânicos foram também mais expressas no cérebro de campeiras, o que demonstra a alta atividade metabólica no cérebro desta operaria.

4.6 Expressão diferencial de proteínas neurais específicas no cérebro das abelhas nutridoras e campeiras

Foram encontradas várias proteínas neurais específicas diferencialmente expressas entre o cérebro de nutridoras e de campeiras.

Um exemplo de proteína neural muito expressa no cérebro de nutridora foi *PREDICTED: similar to synaptojanin CG6562-PB, isoform B*, a qual foi implicada na regulação da estrutura e atividade da sinapse de acordo com GO.

A nutridora também apresentou maior expressão no cérebro de: *similar to failed axon connections CG4609-PC, isoform C isoform 1(fax)*, que coincide com estudos

transcriptômicos anteriores em *A. mellifera* [6]. Esta proteína está envolvida na axogênese.

Outra proteína neural é: *PREDICTED: similar to Contactin CG1084-PA*, que foi praticamente expressa somente no cérebro de nutridora, está envolvida na adesão celular e é diferencialmente expresso em vários tecidos neuronais durante o desenvolvimento.

PREDICTED: similar to wrapper CG10382-PA também foi específica na operaria nutridora e participa na axogênese e gliogênese.

As proteínas descritas acima foram mais abundantes no cérebro de nutridoras e todas elas estão relacionadas com a gênese e a evolução da estrutura do cérebro, o que evidencia novamente mudanças nas estruturas cerebrais da operaria nutridora.

No entanto, em campeiras foram mais abundantes proteínas relacionadas à sinapse. Um exemplo de proteína neural específica muito abundante na operaria campeira foi: *PREDICTED: similar to Calcineurin, subunit B isoform 2 (Protein phosphatase 2B regulatory subunit)*. A calcineurina é uma proteína ligante de cálcio e calmodulina, provavelmente envolvida na secreção de neurotransmissores e transporte mediado por vesículas.

Outra proteína de vesícula sináptica abundantemente encontrada no cérebro de campeira foi *PREDICTED: similar to synaptotagmin CG3139-PA, isoform A isoform 1*. Synaptotagmin é o principal sensor de Ca^{2+} da vesícula sináptica na exocitose [139].

O cérebro de campeiras mostrou também aumento da expressão de *similar to Neurocalcin homolog (DrosNca)*. Segundo o GO, esta proteína inibe a fosforilação da rodopsina e têm alto nível de expressão nas regiões corticais do cérebro central.

Outra proteína de sinapse, *PREDICTED: similar to Synapse-associated protein 47kD CG8884-P, isoform A*, foi mais expressa no cérebro de campeira.

Os neurônios liberam neurotransmissores por exocitose dependente de cálcio das vesículas sinápticas. De acordo com os resultados acima, a alta expressão de proteínas sinápticas poderia estar relacionada à elevada atividade sináptica no cérebro das abelhas campeiras como consequência, por exemplo, da aprendizagem e da memorização, e das capacidades de navegação e comunicação dos indivíduos desta operaria.

4.7 Comparação das metodologias 2-DE e MudPIT

A comparação entre os resultados obtidos por 2-DE e MudPIT (Tabela 4) revelou que nove proteínas coincidiram como diferencialmente expressas por ambas as

metodologias, que usam princípios analíticos e testes estatísticos diferentes para avaliar tais alterações quantitativas. Essas nove proteínas representam mais que 50 % das proteínas que resultaram diferencialmente expressas por 2-DE.

Tabela 4. Proteínas que coincidiram em ser diferencialmente expressas por ambas as metodologias 2-DE e MudPIT.

Fator de câmbio: 2-DE/ <i>Spectral Count</i> normalizado	Proteína identificada	Organismo/Proteína ID	SCN-N/SCN-C*
Proteínas mais expressas no cérebro de nutridoras			
9.2/1.7	Major royal jelly protein 1	<i>Apis mellifera</i> /gi 58585098	211.5/124.9
3.0/3.0	PREDICTED: similar to antdh CG1386-PA	<i>Apis mellifera</i> /gi 66548280	55.5/18.6
^a /14.2	Major royal jelly protein 7	<i>Apis mellifera</i> /gi 62198227	25.5/1.8
^a /2.3	Major royal jelly protein 2	<i>Apis mellifera</i> /gi 58585108	108.5/47.1
Proteínas mais expressas no cérebro de campeiras			
10.8/32.6	Alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera</i> /gi 58585164	374.9/11.5
2.5/2.3	Similar to Protein lethal(2)essential for life (Protein Efl21)	<i>Apis mellifera</i> /gi 110750762	67.9/29.5
3.1/6.4	Similar to Sarcoplasmic calcium-binding protein 2 CG14904-PA	<i>Apis mellifera</i> /gi 48140312	175.4/27.5
3.9/4.7	Transferrin	<i>Apis mellifera</i> /gi 58585086	44.5/9.5
2.0/1.6	PREDICTED: similar to Glutamine synthetase 2 CG1743-PC, isoform C	<i>Apis mellifera</i> /gi 48141383	74.3/46.5

*: **SCN-N:** Contagem espectral normalizada para nutridoras, **SCN-C:** Contagem espectral normalizada para campeiras. ^a: Proteínas que resultaram estágio-específicas por 2-DE

Por ambas as metodologias, foram obtidos resultados semelhantes quanto ao fator de cambio na expressão diferencial das proteínas. Certas diferenças pequenas entre fatores de câmbio foram devidas provavelmente à análise por 2-DE, que só levou em conta um dos *spots* quando isoformas por modificações pós-traducionais estiveram presentes. Já no caso de MudPIT, todas as isoformas são conjuntamente consideradas. Portanto, há uma vantagem de 2-DE para análise de isoformas. Um exemplo foi à alfa-glucosidase. Uma exceção, a MRJP1, mostrou maior diferença entre fatores de câmbios. Baseado no resultado de 2-DE, esta proteína é uma das mais abundantes nesta amostra. Uma limitação do método *Spectral Count* é que a resposta ao aumento da quantidade protéica é saturável. O *Spectral Count* para cada proteína mostram um efeito de saturação acima de 30 espectros por proteína para uma corrida de HPLC ^[140]. Portanto pode ser que este método não permita uma verdadeira quantificação para as proteínas mais abundantes.

O restante das proteínas que exibiram alterações quantitativas significativas por 2-DE mostraram-se diferencialmente expressas pela análise MudPIT, mas não significativo pelo teste G.

Convém notar que ambas as metodologias coincidiram também no fato de identificarem como proteínas mais abundantes no cérebro das nutridoras aquelas relacionadas aos processos de síntese de proteínas. Contudo, no cérebro de campeiras foram mais abundantes proteínas envolvidas em outros processos metabólicos, principalmente de metabolismo energético.

A coincidência da expressão diferencial dos genes de algumas destas proteínas no nível transcriptômico relatado em trabalhos anteriores foi discutido previamente nesta tese (item 4.3). Em tal caso, por exemplo, está o gene da alfa-glucosidase e a proteína letal (2) essencial para a vida (proteína Efl21) que foram achados mais expressos na cabeça de abelhas campeiras. Assim como a presença das proteínas da geléia real MRJP 1, 2 e 7 no cérebro destas abelhas.

4.8 Análises proteômica e fosfoproteômica preliminares em *Melipona quadrifasciata*

Até esta data, na bibliografia consultada, não existem estudos prévios em nível molecular e menos ainda sobre análises de proteínas relacionadas ao processo de aprendizagem por condicionamento operante usando abelhas como modelo biológico.

No presente trabalho, os mapas de proteínas cerebrais de abelhas treinadas por condicionamento operante e abelhas controle foram realizados primeiramente em faixa de pH 3-10 (Figura 16). O perfil 2-DE demonstrou relativamente poucas diferenças entre as amostras comparadas. Pela inspeção visual só um ou dois *spot* mostraram diferenças na faixa ácida (sinalizado em um quadrado). Por este motivo, tiras de IPG 4-7 foram empregadas para uma análise com maior resolução (Figura 17). Análise mais crítica foi realizada baseada no programa específico de análise de imagens com o teste estatístico e só um *spot* resultou ser diferencialmente expresso, sinalizado com seta na Figura 17.

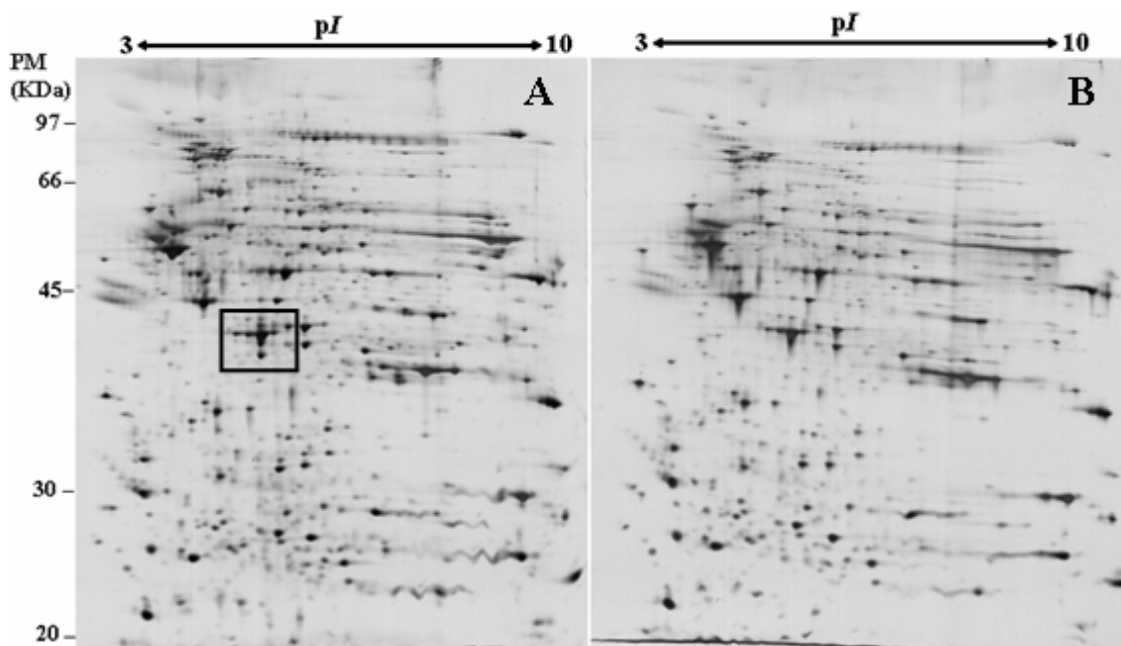


Figura 16 Perfil 2-DE de proteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata* A: Abelha treinada por condicionamento operante, B: Controle.

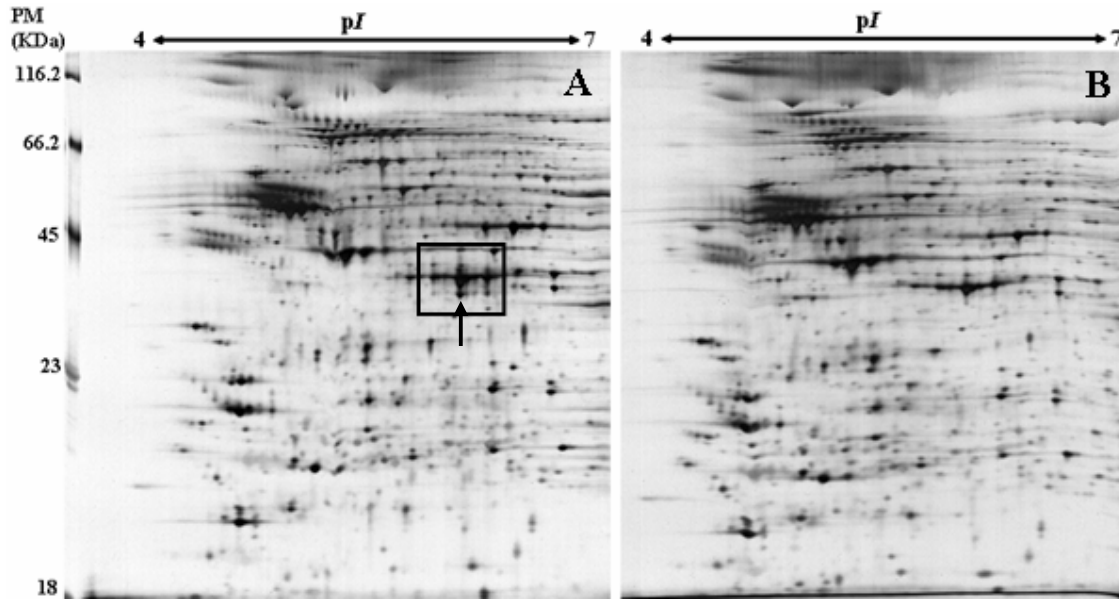


Figura 17. Perfil 2-DE de proteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata* usando IPGs de faixa ácida de pH 4-7. A: Abelha treinada por condicionamento operante, B: Controle. Seta indica a proteína que foi significativamente mais expressa na abelha treinada por condicionamento operante.

Uma explicação para a pequena diferença proteômica entre os dois grupos pode ser devido ao tempo de aprendizagem relativamente pequeno (8 h). Nesse curto tempo, talvez ainda não ocorra a síntese de novas proteínas relacionadas ao processo de aprendizagem. Outra possibilidade pode ser dada pelas limitações da metodologia empregada; por exemplo, quanto à sensibilidade da detecção das proteínas que se expressam em número baixo de cópias por célula, como é o caso de proteínas como as regulatórias. O fato poderia estar relacionado também com que esta única proteína diferencialmente expressa seja a primeira peça desencadeante de uma cascata de reações neste processo de aprendizagem.

A identificação do *spot* que mostrou mudanças significativas na expressão revelou a proteína arginina quinase. A Figura 18 mostra o resultado da identificação da proteína por busca no banco de dados o a partir do espectro MS.

{MATRIX} Mascot Search Results

User : liudy
Email : liudy@unb.br
Search title :
Database : SwissProt 56.5 (402482 sequences; 145232059 residues)
Taxonomy : Other Metazoa (6107 sequences)
Timestamp : 3 Dec 2008 at 19:20:02 GMT
Top Score : 59 for **KARG_AP1ME**, Arginine kinase OS=Apis mellifera GN=ARGK PE=2 SV=1

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 50 are significant ($p < 0.05$).

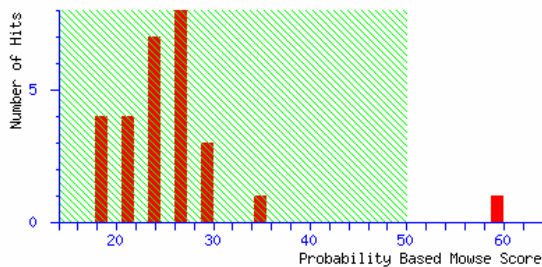
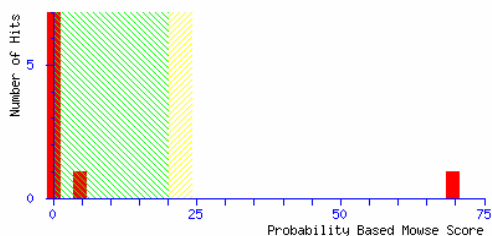


Figura 18. Resultado da identificação pela estratégia PMF usando o programa Mascot. A partir de um espectro de massas a busca resulta numa lista de proteínas candidatas contendo variadas informações incluído um valor numérico que determina se a identificação é confiável ou não (Mowse score).

Para confirmar a identificação desta proteína, um dos picos mais intensos a partir do espectro MS foi selecionado para ser fragmentado e analisado por MS/MS. Este pico representava um peptídeo de massa 1731.9.

Esta análise se realiza sem a intervenção do pesquisador e de forma automática. A Figura 19 apresenta o resultado da busca pelo programa Mascot que revelou a mesma proteína, mas usando uma estratégia de identificação diferente como é o caso de *PFF* (do inglês *Peptide Fragment Fingerprinting*) pelo que se considera uma identificação muito confiável.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p <	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/>	Ions score or expect cut-off
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/>	Sort unassigned
		Decreasing Score
		Require bold red <input type="checkbox"/>

Select All Select None Search Selected Error tolerant

- [KARG_APIME](#) Mass: 40409 Score: 69 Queries matched: 1
 Arginine kinase OS=Apis mellifera GN=ARGK PE=2 SV=1
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 1	1731.9270	1730.9197	1731.8039	-0.8842	0	69	1.6e-06 1 K.TFLVWCNEEDHLR.I

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **TFLVWCNEEDHLR**

Found in **KARG_APIME**, Arginine kinase OS=Apis mellifera GN=ARGK PE=2 SV=1

Match to Query 1: 1731.072724 from(1732.080000,1+)

Data file D:\Liudy\Proyecto\Doc\Proj_Melipona\Pico\1733\1733a0_D8\0\1733.0800.LIFT.LIFT\fastp\data\1\peaklist.xml

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from 0 to 1700 Da Full range

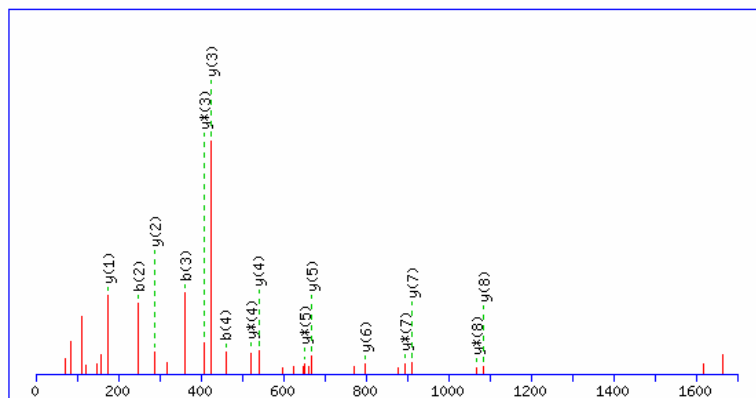


Figura 19. Resultado da identificação pela estratégia PFF usando o programa Mascot. A partir de um espectro dos fragmentos do peptídeo. Em seguida temos os fragmentos experimentais do espectro que parearam com os teóricos reportados no banco de dados (vermelho).

Estudos anteriores demonstraram que o mRNA da arginina quinase é relativamente abundante no sistema nervoso central e na antena da abelha *A. Mellifera*, e que a expressão é de duas a três vezes maior nos olhos compostos, sugerindo que a arginina

quinase é um importante componente do mecanismo de liberação de energia no sistema visual que tem alta demanda de energia ^[141]. Talvez esta proteína desencadeie algum mecanismo relacionado com o tipo de aprendizagem por condicionamento operante nas abelhas, e seria de grande interesse o estudo da interação desta proteína com outras para complementar o presente resultado.

Metodologias mais sensíveis que 2-DE, tal como MudPIT, poderiam também ser empregadas para detectar maiores diferenças na expressão de proteínas entre abelhas treinadas e não treinadas, no caso de existirem, assim como para complementar e confirmar este estudo.

Partindo da hipótese que a aprendizagem poderia ser causada por modificações pós-traducionais, particularmente fosforilações, já que as fosfoproteínas estão envolvidas em todos os processos biológicos e especificamente na regulação, se realizaram estudos comparativos do perfil fosfoprotéico entre as duas amostras (Figura 20). A detecção com ProQ-Diamond é específica para fosfoproteínas e permite detectá-las com maior sensibilidade.

Análises preliminares visuais dos mapas fosfoproteômicos revelaram também poucas diferenças entre as amostras. Análises computacionais realizada para determinar diferenças significativas na concentração de fosfoproteínas entre os dois grupos revelaram que 5 *spots* resultaram em mudanças significativas, mas não foi possível a identificação porque não eram visualmente acessíveis pela coloração com prata.

Outros experimentos complementares serão necessários para confirmar a existência de proteínas diferencialmente expressas, tanto de proteínas totais como fosforiladas, assim como a identificação por espectrometria de massas daquelas que apresentarem diferenças significativas.

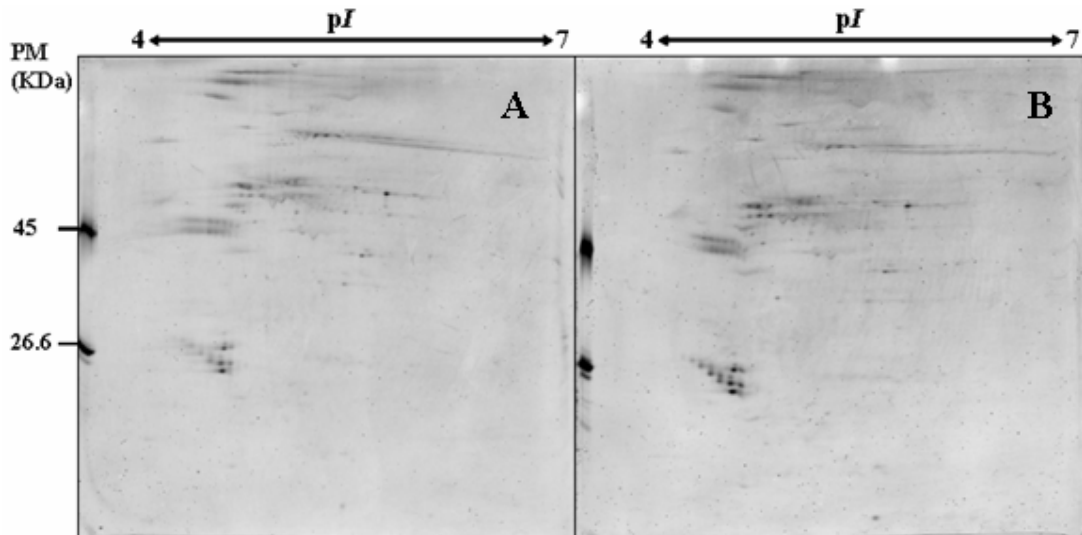


Figura 20. Perfil 2-DE de fosfoproteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata* usando IPGs de faixa de pH 4-7. A: Abelha treinada por condicionamento operante, B: Controle.

5 Conclusões

Existem diferenças no proteoma de cérebro entre operárias de abelhas da espécie *Apis mellifera* nutridora e campeira com distintos papéis sociais. Todas as proteínas que mostraram diferenças significativas de expressão foram identificadas e relacionadas com as putativas funções associadas a papéis sociais de cada operária. Esses resultados são complementares a dados anteriores em nível genômico e transcriptômico. No entanto, deve ser realizada uma investigação mais aprofundada para se alcançar um cenário onde as reais funções de tais proteínas no cérebro possam ser relacionadas com maior precisão aos comportamentos sociais. Estudos nos níveis de genômica e transcriptômica, associados à análise proteômica mais profunda são necessários para melhor entender os mecanismos de diferenciação ontogenética e comportamental na abelha *A. mellifera*.

Experimentos de imunolocalização mostraram a presença da proteína MRJP1 em três regiões do cérebro - lobo antenal, lobo óptico e corpos cogumelares - assim como a sua localização no citoplasma, sobre estruturas filamentosas, possivelmente citoesqueleto. Encontrou-se MRJP1 também como proteína secretada nos corpos cogumelares.

Os resultados obtidos por MudPIT e “*Spectral Count*” para amostras de cérebro das operárias nutridora e campeira mostraram várias diferenças quantitativas para algumas proteínas dentre as 2.742 proteínas identificadas. Algumas dessas proteínas seletiva ou diferencialmente expressas foram proteínas neurais específicas.

A comparação entre as duas metodologias 2-DE e *MudPIT* confirmou a expressão diferencial de nove proteínas que coincidiram por ambas as metodologias. Proteínas que se expressam em baixo número de cópias por célula e proteínas de membranas, que são difíceis de detectar por 2-DE, foram identificadas por *MudPIT*. Contudo isoformas de proteínas só foram separadas e detectadas por 2-DE. As duas metodologias mostraram que na operária nutridora são mais abundantes proteínas relacionadas com a síntese protéica, e, na operária campeira, proteínas relacionadas com a conversão e produção de energia. Fica evidente o desenvolvimento e diferenciação de estruturas cerebrais no caso de nutridoras e o alto requerimento energético em campeiras.

Obtiveram-se mapas protéicos por 2-DE de um extrato de proteínas totais e de fosfoproteínas da abelha *Melípona quadrifasciata* para o estudo de proteínas diferencialmente expressas entre abelhas treinadas por condicionamento operante e abelhas controles. Identificou-se uma isoforma de arginina quinase como mais expressa no cérebro das abelhas treinadas por condicionamento operante.

6 Perspectivas

- Caracterizar proteínas que resultaram como diferencialmente expressas entre as operarias campeira e nutridora de *A. mellifera* e estudar o interatoma das mesmas.
- Realizar análise proteômica comparativa usando metodologia complementar e mais sensível, como *MudPIT*, para as amostras de abelhas treinadas e não treinadas de *Melípona quadrifasciata*.
- Caracterizar a proteína arginina quinase e estudar a possível função no processo de aprendizagem por condicionamento operante.
- Utilizar técnicas complementares como RNAi para determinar a possível função das proteínas alvos.
- Levar estes estudos a animais evolutivamente superiores para determinar convergências e divergências com os presentes resultados.

7 Referências

1. Robinson, G.E. and Ben-Shahar, Y. Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? *Genes Brain Behav* 2002, 1, 197-203
2. Harris-Warrick, R.M. Ion channels and receptors: molecular targets for behavioral evolution. *J Comp Physiol (A)* 2000, 186, 605–616.
3. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Health Professions Division, 2000, New York, NY
4. Menzel R, Leboulle G, Eisenhardt D. Small brains, bright minds. *Cell* 2006,124, 2, 237-9.
5. Robinson, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology* 1992, 37, 637-665.
6. Whitfield, C. W., Cziko, A. M., Robinson, G. E. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 2003, 302, 296-299.
7. Winston, M.L. In: *The Biology of the Honey Bee* (Harvard Univ. Press, Cambridge) 1987.
8. Huang, Z. Y.; Robinson, G. E. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 89, 11726-11729.
9. Fahrbach, S. E.; Robinson, G. E. Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure of the honey bee. *Dev. Neurosci.* 1996, 18, 102-114.
10. Robinson, G.E., Fahrbach, S.E., Winston, M.L. Insect societies and the molecular biology of social behavior. *BioEssays* 1997, 19, 1099-1108
11. Sullivan, J., Jassim, O., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Hormones and behavior* 2000, 37, 1-14.
12. Spivak, M.; Masterman, R.; Ross, R.; Mesce, K. A. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol.* 2003, 55, 341-354.
13. Beshers, S., Huang, Z. Y., Oono, Y., Robinson, G.E. Social inhibition and the regulation of temporal polyethism in honey bee. *Journal Theoretical Biology* 2001, 213, 461-479.
14. Schulz, D. J; Robinson, G. E. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol.* 1999, 184, 481-488.
15. Withers, G.S., Fahrbach, S.E. and Robinson, G.E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 1993, 364, 238–240
16. Hammer, M. and Menzel, R. Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci.* 1995, 15, 1617-1630.
17. Menzel, R. and Muller, U. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci.* 1996, 19, 379-404.

-
18. Giurfa, M., Hammer, M., Stach, S., Stollhoff, N., Muller-deisig, N., and Mizyrycki, C. Pattern learning by honeybees: conditioning procedure and recognition strategy. *Anim Behav.* 1999, 57, 315-324.
19. Reinhard, J., Srinivasan, M.V., and Zhang, S., Olfaction: scent-triggered navigation in honeybees. *Nature* 2004, 427, 411.
20. Stach, S., Benard, J., and Giurfa, M. Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. *Nature* 2004, 429, 758-761.
21. Giurfa, M. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2003, 13, 726-735.
22. Gronenberg, W.; Heeren, S.; Holldobler, B. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Exp. Biol.* 1996, 199, 2011-2019.
23. Julian, G. E.; Gronenberg, W. Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queen ants. *Behav. Brain Evol.* 2002, 60, 152-164.
24. Withers, G. S.; Fahrbach, S. E.; Robinson, G. E. Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honeybees. *J. Neurobiol.* 1995, 26, 130-144.
25. Farris, S. M.; Robinson, G. E.; Fahrbach, S. E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *J. Neurosci.* 2001, 21, 6395-6404.
26. Dujardin, F. Memoire sur le systeme nerveux des insectes. *Ann Sci Nat Zool.* 1850, 14, 195-206.
27. Menzel, R., Durst, C., Erber, J., Eichmüller, S., Hammer, M., Hildebrandt, H., Mauelshagen, J., Müller, U., Rosenboom, H., Rybak, J., Schäfer, S., Scheidler, A. The mushroom bodies in the honeybee: from molecules to behaviour. *Fortschr Zool.* 1994, 39, 81-103.
28. Ben-Shahar Y and Robinson GE. Satiation differentially affects performance in a learning assay by nurse and forager honey bees. *Journal of Comparative Physiology [A]* 2001, 187, 891-899.
29. Brembs, B. Operant conditioning in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol.* 2003, 13, 710-717.
30. Pessotti, I., Sénéchal A. M. Aprendizagem em abelhas. I: Discriminação simples em onze espécies. *Acta Amazonica* 1981, 653-658
31. Moreno, A. M.; Rocca, J. Z.; Oliveira, L. M.; de Souza, D. G. Discriminações condicionais entre estímulos visuais e testes de simetria em meliponas. *Revista Brasileira de Análise do Comportamento* 2005, 1, 207-229.
32. Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B., Robinson, G. E. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 2002, 296, 741-744.
33. Blenau, W., Balfanz, S., and Baumann, A. Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J Neurochem.* 2000, 74, 900-908.
34. Eisenhardt, D., Friedrich, A., Stollhoff, N., Muller, U., Kress, H., and Menzel, R. The AmCREB gene is an ortholog of the mammalian CREB/CREM family of transcription factors and encodes several splice variants in the honeybee brain. *Insect Mol Biol.* 12, 2003, 373-382.
35. Evans, J. D., Wheeler, D. E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5575-5580.

-
36. Evans, J.D., Wheeler, D.E. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.* 2001, 2, research0001.1-0001.6.
37. Kucharski, R., Maleszka, R. Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol.* 2002, 3, research0007.1-0007.9.
38. Shapira, M., Thompson, C. K., Soreq, H., Robinson, G. E. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *J. Mol. Neurosci.* 2001, 17, 1-12.
39. Tsuchimoto, M., Aoki, M., Takada, M., Kanou, Y., Sasagawa, H., Kitagawa, Y., Kadowaki, T. The changes of gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zool. Sci.* 2004, 21, 23-28.
40. Santos, K. S., Delazari dos Santos, L., Mendes, M. A., Monson de Souza, B., Malaspina, O., Palma, M. S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005, 35, 85–91.
41. Hummon, A.B., Richmond, T.A., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, M.A., Vierstraete, E., Rodriguez-Zas, S.L., Schoofs, L., Robinson, G.E., Sweedler, J.V. From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science* 2006, 314, 647-649.
- 42 . Schippers M. P., Dukas R, Smith R. W., Wang J, Smolen K, McClelland G. B.: Lifetime performance in foraging honeybees: behaviour and physiology. *J Exp Biol.* 2006, 209, 3828-3836.
43. Wolschin F, Amdam GV: Comparative proteomics reveal characteristics of life-history transitions in a social insect. *Proteome Sci.* 2007, 5, 10.
44. Wolschin F, Amdam GV: Plasticity and robustness of protein patterns during reversible development in the honey bee (*Apis mellifera*). *Anal Bioanal Chem.* 2007, 389, 1095-1100.
45. Wilkins, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional gel eletrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 1996, 14, 61-65
46. Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 1999, 19, 1720-1730.
47. Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J.M., Misek, D.E., Kardia, S.L., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 304-313
48. Orntoft, T.F., Thykjaer, T., Waldman, F.M., Wolf, H., Celis, J.E. Genome-wide study of gene copy numbers, transcripts, and protein levels in pairs of non-invasive and invasive human transitional cell carcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 37-45.
49. O’Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007-4021
50. Gygi, S. P, Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. and Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 17, 9390-9395.
51. Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D., Roberts, R. C. and Van Oostrum, J. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics* 2002, 2, 2, 127-134.

52. Gorg, A., Boguth, G., Kopf, A., Reil, G., Parlar, H. and Weiss, W. Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics* 2002, 2, 12, 1652-1657
53. Locke, V. L., Gibson, T.S., Thomas, T.M., Corthals, G. L. and Rylatt, D. B. Gradiflow as a prefractionation tool for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2002, 2, 9, 1254-1560.
54. Candiano, G., Musante, L., Bruschi, M., Ghiggeri, G. M., Herbert, B., Antonucci, F., Righetti, P. G. Two-dimensional maps in soft immobilized pH gradient gels: a new approach to the proteome of the Third Millennium. *Electrophoresis* 2002, 23, 2, 292-297.
55. Bruschi, M., Musante, L., Candiano, G., Ghiggeri, G. M., Herbert, B., Antonucci, F. and Righetti, P. G. Soft immobilized pH gradient gels in proteome analysis: a follow-up. *Proteomics* 2003, 3, 6, 821-825
56. Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D., Roberts, R. C. and Van Oostrum, J. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics* 2002, 2, 2, 127- 134.
57. Meng, C. K., Mann, M., Fenn, J. B. Of protons or proteins. *Z Phys D*. 1988, 10, 361-368.
58. Siuzdak G. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 11290-11297.
59. Carr, S. A., Hemling, M. E., Bean, M. F., Roberts, G. D. Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2802-2824.
60. Fenselau, C. Tandem mass spectrometry: the competitive edge for pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992, 32, 555-578.
61. Easterling, M. L., Colangelo, C. M., Scott, R. A., Amster, L. J. Monitoring protein expression in whole bacterial cells with MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2704-2709.
62. Roepstorff, P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8, 6-13.
63. Pandey, A., Mann, M. "Proteomics to study genes and genomes." *Nature*. 2000, 405, 837-846.
64. Baber, M., Bordoli, R. S., Garner, G. V., Gordon, D. V., Sedgwick, R. D., Tetler, L. W., Tyler, A. N. Fast-atom-bombardment mass spectra of enkephalins. *Biochem. J.* 1981; 197: 401-404.
65. Karas, M. and Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988, 60, 20, 2299-2301
66. Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., and Chait, B. T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1193A-1203A
67. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246, 4926, 64-71.
68. Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco F., Wilm M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. and Mann, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93, 14440-14445

69. Patterson, S.D. and Aebersold, R. Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* 1995, 16, 1791–1814.
70. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 1996, 68, 850-858.
71. Niessen, W. M. A.; Tjaden, U. R., Van der Greef, J. Strategies in developing interfaces for coupling liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1991,554, 3-26.
72. Medzihradszky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L., Burlingame, A. L. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.* 2000, 72, 552–558.
73. Loboda, A. V., Krutchinsky, A. N., Bromirski, M., Ens, W., Standing, K. G. A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 1047–1057.
74. Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C., and Watanabe, C. Identifying Proteins from Two-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide Fragments in Protein Sequence Databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993, 90, 5011-5015.
75. Pappin, D., Hojrup, P. and Bleasby, A. Rapid identification of proteins by Peptide Mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 1993, 3, 327-332.
76. Aebersold, R. and Goodlett, D. R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.* 2001, 101, 2, 269-295.
77. Eng, J., McCormack, A. L. and Yates J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 1994, 5, 976-989
78. Palagi, P. M. Conference: MS Bioinformatic analysis for Proteomics. ICGEB Course: Proteomic Approaches in Molecular Biology: Theory and Practice (University of Buenos Aires, UBA)
79. Washburn, M. P.; Wolters, D.; and Yates, J. R., III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 242-247.
80. Peng, J.; Elias, J. E.; Thoreen, C. C.; Licklider, L. J.; Gygi, S. P. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J. Proteome Res.* 2003, 2, 43-50.
81. Liu H, Sadygov RG, Yates JR 3rd: A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2004, 76, 4193-4201.
82. Zhang, B., VerBerkmoes, N. C., Langston, M. A., Uberbacher, E., Hettich, R. L. and Samatova, N. F. Detecting Differential and Correlated Protein Expression in Label-Free Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* 2006, 5, 2909- 2918.
83. Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A., Mann, M. Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods in Molecular Biology* 1999, 112, 513-530.
84. Gonzalez, L. J., Castellanos-Serra, L., Badock, V., Diaz, M., Moro, A., Perea, S., Santos, A., Paz-Lago, D., Otto, A., Muller, E.C., Kostka, S., Wittman-Liebold, B., Padron, G. Identification of nuclear proteins of small cell lung cancer cell line H82: An improved procedure for the analysis of silver-stained proteins. *Electrophoresis* 2003, 24, 237-252.

85. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999, 3551-3567.
86. Peixoto, L. G., Calábria, L. K. Espindola, F. S. Identification of mayor royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* (submitted)
87. Bern, M., Goldberg, D., McDonald, W. H., and Yates, J. R., 3rd. Automatic quality assessment of Peptide tandem mass spectra. *Bioinformatics* 2004, 20 Suppl 1, 149-154.
88. Eng, J., McCormack, A., and Yates, J. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1994, 5, 976-989.
89. Sadygov, R. G., Eng, J., Durr, E., Saraf, A., McDonald, H., MacCoss, M. J., Yates, III, J. R. Code Developments to Improve the Efficiency of Automated MS/MS Spectra Interpretation. *J. Proteome Res.* 2002, 2, 211-215.
90. Tabb, D.L., McDonald, W.H., Yates, J.R., III. DTASelect and Contrast: Tools for Assembling and Comparing Protein Identifications from Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* 2002, 1, 21–26.
91. Cociorva, D; Yates, JR., III *54th ASMS Conference on Mass Spectrometry.* 2006
92. Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research., 3rd edition. New York: Freeman. 1994
93. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz J., Madjar, J. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* 1997, 18, 328–337.
94. Mariko, K., Yoichiro, H., Kazunori, T., Kiyoshi, O., Hiroyuki, S., Hideo, Y., Yoshinobu, K. Occurrence of GalNAc β 1-4GlcNAc Unit in *N*-Glycan of Royal Jelly Glycoprotein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66, 1985-1989.
95. Albert S, Klaudiny J, Simuth J. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999, 29, 427–434.
96. Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroeder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., Simuth, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. Life Sci.* 1998, 54, 1020–1030.
97. Kucharski, R., Maleszka, R., Hayward, D.C., Ball, E.E. A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honeybee brain. *Naturwissenschaften* 1998, 85, 343–346.
98. Thompson, G.J., Kucharski, R., Maleszka, R., Oldroyd, B.P. Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees. *Insect Molecular Biology* 2006, 15, 637-644.
99. Krause, K.H, Michalak, M. Calreticulin. *Cell* 1997, 88, 439–443.
100. Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., Eggleton, P. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 2001, 11, 122–129.
101. Coppelino, M.G., Woodside, M.J., Demareux, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R., Dedhar, S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 1997, 386, 843–847.

-
102. Stoltzfus, J.R., Horton, W.J., Grotewiel, M.S. Odor-guided behavior in *Drosophila* requires calreticulin. *J. Comp. Physiol. A* 2003, 189, 471–483.
103. Pintér, M., Jékely, G., Szepesi, R. J., Farkas, A., Theopold, U. *et al.* TER94, a *Drosophila* homolog of the membrane fusion protein CDC48/p97, is accumulated in nonproliferating cells: in the reproductive organs and in the brain of the imago. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1998, 28, 91-98.
104. Heisenberg, M. Central brain function in insects: Genetic studies on the mushroom bodies and central complex in *Drosophila*. In *Neural basis of behavioural adaptations* (ed. K. Schildberger and N. Elsner), *Fortschritte der Zoologie* 1994, 39, 61–79. G. Fischer, Stuttgart, Germany.
105. Wang, Q., Hasan, G., Pikielny, C.W. Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster*, the antennae. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 10309–10315.
106. Rossler, W., Kuduz, J., Schurmann, F.W., Schild, D. Aggregation of F-actin in olfactory glomeruli: a common feature of glomeruli across phyla. *Chemical Senses* 2002, 27, 803–810.
107. Groh, C.; Ahrens, D.; Rossler, W., Environment- and age-dependent plasticity of synaptic complexes in the mushroom bodies of honeybee queens. *Brain Behav Evol.* 2006, 68, 1-14.
108. Behrends, A.; Scheiner, R.; Baker, N.; Amdam, G. V., Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*). *Exp Gerontol.* 2007, 42, 1146-53.
109. Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaali, N., Nakamura, K., Opas, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 1999, 344, 281–292.
110. Simpson, J., Riedel, I.B.M., Wilding, M. Invertase in the hypopharyngeal gland in adult worker honey bees. *Apidologie* 1968, 21, 457–468.
111. Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur J Biochem.* 1999, 265, 127–133.
112. Neukirch, A. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *J Comp Physiol.* 1982, 146, 35–40.
113. Tsacopoulos, M.; Magistretti, P. J., Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci.* 1996, 16, 877-85.
114. Kucharski, R., Maleszka, R. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Insect Sci.* 2003, 3, 27–36.
115. Farooqui, T. Iron-induced oxidative stress modulates olfactory learning and memory in honeybees. *Behav Neurosci.* 2008, 122, 433-47.
116. Dunkov, B.; Georgieva, T., Insect iron binding proteins: insights from the genomes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006, 36, 300-9.
117. Nichol, H.; Law, J. H.; Winzerling, J. J. Iron metabolism in insects. *Annu Rev Entomol.* 2002, 47, 535-59.
118. Maxwell, R. A.; Welch, W. H.; Horodyski, F. M.; Schegg, K. M.; Schooley, D. A., Juvenile hormone diol kinase. II. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. *J Biol Chem.* 2002, 277, (24), 21882-90.

119. Uno, Y., Fujiyuki, T., Morioka, M., Takeuchi, H., Kubo, T. Identification of proteins whose expression is up- or down-regulated in the mushroom bodies in the honeybee brain using proteomics. *FEBS Letters* 2007, 581, 97–101.
120. Alkon, D.L., Nelson, T.J., Zhao, W., Cavallaro, S. Time domains of neuronal Ca²⁺ signaling and associative memory: steps through a calyculin, ryanodine receptor, K⁺ channel cascade. *Trends Neurosci.* 1998, 21, 529–537.
121. Kurzik-Dumke, U., Lohman, E. Sequence of the new *Drosophila melanogaster* heat-shock-related protein gene, *lethal (2) essential for life [l(2)efl]*, at locus 59F4,5. *Gene* 1995, 154, 171-175.
122. Elsik, C. G. et al. Creating a honey bee consensus gene set. *Genome Biol.* 2007 8(1), R13.
123. Fiala, A., Müller, U. and Menzel, R. Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Neurosci.* 1999, 19, 10125–10134.
124. Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Kage E., Kubo T. Molecular mechanisms of the highly advanced behaviors in the honeybee. *Honeybee Science* 2001, 22, 113-120
125. The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 2006, 443, 931-49.
126. Robinson, G. E., Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *Am Nat.* 2002, 160 Suppl 6, S160-72.
127. Whitfield, C. W, Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C.G., Liu, L., Pardinas, J. R., Robertson, H.M., Bento Soares, M. and Robinson, G. E. Annotated Expressed Sequence Tags and cDNA Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. *Genome Res.* 2002, 12, 555-566.
128. Engels, W. Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *Am. Zool.* 1974, 14, 1229–1237.
129. Engels, W. and Fahrenhorst, H. Age-dependent and caste-dependent changes in hemolymph protein patterns of *Apis mellifera*. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. mech. Org.* 1974, 174, 285–296.
130. Fluri, P., Lußcher, M., Wille, H. and Gerig, L. Changes in weight of the pharyngeal gland haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honeybees. *J. Insect Physiol.* 1982, 28, 61–68.
131. Pinto, L. Z., Bitondi, M. M. G. and Simões, Z. L. P. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.* 2000, 46, 153–160.
132. Engels, W., Kaatz, H. H., Zilikens, A., Simões, Z. L. P., Truve, A., Braun, R. and Dittrich, F. (1990) in *Advances in Invertebrate Reproduction 5*, eds. Hashi, M. and Yamashita, O. (Elsevier Science, Amsterdam), pp. 495–502.
133. Marco Antonio D. S., Guidugli-Lazzarini K. R., Nascimento A. M., Simões Z., Hartfelder K. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 2008, 95, 953.
134. Park, J.M., Kunieda, T., and Kubo, T. The activity of Mblk-1, a mushroom body-selective transcription factor from the honeybee, is modulated by the ras/MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 18689–18694.

-
135. Takeo, K., Masami, S., Jun, N., Hiromi, S., Kazuaki, O., Hideaki, T. and Shunji, N. Change in the Expression of Hypopharyngeal-Gland Proteins of the Worker Honeybees (*Apis mellifera* L.) with Age and/or Role. *J. Biochem.* 1996, 119, 291-295.
136. Robinson, G. E., Grozinger, C. M. and Whitfield, C. W. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nature Rev. Genet.* 2005, 6, 257--270.
137. M. K. Sun, D. L. Alkon. Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. Trends in Pharmacol. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002, 23, 83.
138. Ben-Shahar, Y., Dudek, N. L. & Robinson, G. E. Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter malvolio in honeybee division of labour. *J. Exp. Biol.* 2004, 207, 3281–3288.
139. Yoshihara, M. and Montana, E. S. The Synaptotagmins: Calcium Sensors for Vesicular Trafficking. *Neuroscientist* 2004, 10, 566-574.
140. Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., Resing, K. A., and Ahn, N. G. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4, 1487 –1502
141. Kucharski, R. and Maleszka, R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey-bee, *Apis mellifera*. *Gene* 1998, 211, 343-349.