



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR- CAM

ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE *Melipona interrupta* POR ANÁLISE
PROTEÔMICA

LEISSANDRA NASCIMENTO CASTELO

MANAUS, AMAZONAS
MARÇO/2016

LEISSANDRA NASCIMENTO CASTELO

**ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE *Melipona interrupta* POR ANÁLISE
PROTEÔMICA**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Projeto de dissertação apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**MANAUS, AMAZONAS
MARÇO/2016**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C349e Castelo, Leissandra Nascimento
Estudo da diferenciação sexual de Melipona interrupta por análise proteômica / Leissandra Nascimento Castelo. 2016
60 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Abelha sem ferrão. 2. shotgun. 3. espectrometria de massas. 4. proteínas. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



99ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 31 de março de 2016 às 14:30h, no Auditório do Bloco “M” - Setor Sul – UFAM. **Leissandra Nascimento Castelo** defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada “**Estudo da diferenciação sexual de *Melipona interrupta* por análise proteômica**”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Edmar Vaz de Andrade – Orientador	Aprovado () Reprovado ()	
Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro – (UFAM)	Aprovado () Reprovado ()	
Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva – (UFAM)	Aprovado () Reprovado ()	

Manaus, 31 de março de 2016.

Resultado Final: Aprovado ()
 Reprovado ()

Coordenador do PPGBIOTEC/UFAM.

*Não fiquem com medo, pois estou com
você; não se apavorem, pois eu sou o seu
Deus. Eu lhes dou forças e os ajudo; eu os
protejo com a minha forte mão.*

Isaias 41:10

AGRADECIMENTOS

À FAPEAM pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC.

Ao meu orientador Edmar Vaz de Andrade por toda paciência e imensuráveis ensinamentos, sendo mais que um orientador, ajudando em tudo que foi possível. Obrigada professor!!

A todos do Laboratório de Proteômica, Julío, Larissa, Mauricio, Anita em especial a querida Isabelle Cordeiro, por todo o tempo que disponibilizou e sempre que precisei, me acalmando e tirando as dúvidas, obrigada pela tranquilidade e alegria que passa, você ajuda sem ao menos saber até os que estão distantes, obrigada Belle por tudo!

A Lucyanna que foi mais que uma colega de laboratório... obrigada Lucyanna por toda atenção e preocupação, por disponibilizar sua ajuda sempre que possível e nas mais variadas formas. E por aqueles puxões de orelha rsrs... Obrigada pela companhia nessa caminhada.

Ao Laboratório GPA-INPA, coordenado pela Dra. Gislene de Carvalho Zilse. Ao Diego que disponibilizou todo o seu tempo e conhecimento, a Diana que me atendeu nas mais diversas dúvidas e questionamentos, mostrando todo o seu conhecimento e paciência. E aos demais pela companhia e pelo auxílio nessa dura caminhada de eterno aprendizado.

A todos os amigos da turma de mestrado que fizeram ser menos penosa a caminhada obrigada pelas risadas dentro e fora de hora rsrs, Deus e nós sabemos o quão complicado é passar por isso e as marcas que isso causa no nosso psicológico rsrs mas crescemos e aprendemos. Obrigada por tudo!

Aos amigos da Graduação Marta, Ruth, Diego, Weison, que mesmo de longe se fizeram presentes nessa jornada.

Ao professor Spartaco que mesmo sem saber o meu nome, me acolheu e me ensinou muito com sua humildade e com seu cuidado. Sei quem o

colocou no meu caminho e isso me alegra. Obrigada Professor!! O senhor é um exemplo de humanidade e de profissional.

Ao povo da igreja que se preocupava mesmo sem entender o que se passava. Obrigada, Geise, Odair, Nayssandra e aos pastores Gilberto Mendonça e Rubenita Paixão pelas intercessões.

Á minha família que é o meu tudo, que auxiliou mesmo de longe e mesmo sem entender bem o que eu estava fazendo. Obrigada por toda atenção e paciência e torcida, sem vocês eu não teria chegado onde cheguei. Papai (Jorge Castelo) Mamãe (Fátima Castelo) irmãs (Leila, Leidiane, Lainara) e cunhados (Everlan, Francenilton e Maykon) minhas tias (Maria, Lene, Celeste). Vocês são parte dessa conquista. Obrigada por todas as orações, e cuidado nos meus momentos de desespero e de desistência. E por todas as palavras de impulso que me deram força quando não tinha mais. Muito obrigada! Amo vocês, com todas as chatices kkk. (Poderia ser menos, mas nem tudo é perfeito) Obrigada por serem parte dessa história.

Em fim... a todos que ajudaram de forma direta e indireta na realização deste trabalho.

Acima de tudo e todos a Deus, meu maior amor, que me fortaleceu em meios as crises e me trouxe calma quando tudo era um caos absoluto, e que pois ordem no meio das minhas confusões, e me mostrou que tudo estava sobre o sEu controle. Obrigada Pai, sem tua mão me guardando eu não teria conseguido.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Importância das abelhas	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Morfologia e organização das abelhas	17
2.2 Diferenciação de castas	18
2.3 Determinação sexual	21
2.4 O gene do Sistema Complementar de Determinação do Sexo - <i>csd</i>	22
2.4.1 HPLC e UPLC	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Material biológico	31
4.1.1 Coleta de pupa	31
4.2 Extração de proteínas	32
4.2.1 Dosagem de proteínas	33
4.3 Análise em gel de primeira dimensão (SDS-PAGE)	33
4.5.1 Tratamento com tripsina	37
4.5.2 Tratamento das amostras para espectrometria de massas	37
4.6 Classificação das proteínas	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Identificação das pupas provenientes de <i>Melipona interrupta</i>	39
5.2 Extração de proteínas provenientes das pupas	39
5.4 Espectrometria de massas	44
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição Geográfica dos Meliponíneos. As áreas em vermelho no mapa estão representando a Distribuição Geográfica dos meliponíneos nas regiões Tropicais e Subtropicais do Planeta, regiões em branco são as demais regiões de Zona temperada norte e sul e os polos Árticos e Antártico. OLIVEIRA et al.,2013..... **15**
- Figura 2:** Desenvolvimento fisiológico de meliponínios: 1) Célula de cria; 2) Ovo; 3) Larva no primeiro estágio; 4) Larva no segundo estágio; 5) Larva pré-defecante; 6) Larva pós - defecante; 7) Pré-pupa; 8) Pupa não pigmentada; 9) Pupa pigmentada; 10) Imago; 11) Abelha jovem. Fonte: FRAZÃO (2013). Adaptado de POSEY e CAMARGO(1985)..... **19**
- Figura 3:** Prováveis resultados do cruzamento entre himenópteros haploides. Desenvolvimento de machos provenientes de ovos não fecundados, e fêmeas de ovos fecundados. Fonte: NUNES-SILVA, 2008, modificado de HASSELMANN et al, (2008)..... **21**
- Figura 4:** Esquema de alelos sexuais hipotéticos, diferenciados nas cores vermelho (x3) e azul (x4). Os machos desenvolvem-se de ovos haploides (não fecundados) e as fêmeas de ovos diplóides (fecundados) e heterozigotos. Quando há uma redução da variabilidade de alelos sexuais na população, machos diploides homozigóticos podem desenvolver; estes indivíduos são reprodutivamente inviáveis. Modificado de HASSELMANN et al.,2008..... **23**
- Figura 5:** Organização do RNAm produzido a partir dos genes de SDL em *Apis*. (A) Diagrama dos genes de SDL dentro deste mapeamento genético as fêmeas são sempre heterozigotas. Os genes são orientados na direção 5' - 3'de acordo com a direção das setas.(B) Diagrama da estrutura dos introns e dos exons do gene encontrados no SDL. Os exons estão representados nas caixas e os introns são conectados a estes e são representados por linhas no diagrama. O início das leituras abertas destacadas na cor cinza e a região de início dos códons de parada são indicadas. Adaptado de Gempe et al.,2009..... **24**
- Figura 6:** Eleletroforese 2D-Page modificado de GALDOS, 2009..... **27**

Figura 7: Discos de cria de <i>Melipona interrupta</i> BARBOSA-COSTA 2007 apud FRANCINI, 2008.....	31
Figura 8: Visualização da estrutura característica do gonóstilo (destacado em círculo): Em (A), gonóstilo de operária e em (B), do Macho em <i>M. interrupta</i> . BARBOSA-COSTA 2007 apud FRANCINI, 2008.....	32
Figura 9: Extrato total de proteínas (5µg), separadas em gel de poliacrilamida 12% e coradas com Azul de Comassie. M: Marcador (<i>Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder</i> apparent MW); PM macho; PR: rainha; POP: operária.....	39
Figura 10: Perfil proteômico de rainha (A), operária (B) e macho (C).....	41
Figura 11: Exemplo de Isomerização cis-trans de uma ligação peptídica Xaa-Pro (GALAT A., 1993)	48

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama de Venn 1: Distribuição das proteínas identificadas de acordo com o sexo e casta em pupa <i>M. interrupta</i>	46
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Programação da focalização.....	35
Tabela 2: Componentes das soluções de equilíbrio I e II.....	35
Tabela 3: Componentes para o preparo do gel de agarose que é utilizado para fixação das strips nos géis.....	36
Tabela 4: Tabela com as proteínas identificadas. (PM-Pupa de Macho, POP-Pupa de operária e PR-Pupa de Rainha).....	45

RESUMO

Abelhas são insetos sociais que vivem em colônias organizadas, com diferenciação de sexo e castas. Possuem uma grande diversidade. Representam cerca de 6% do número total de espécies. As abelhas nativas, que são popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão ou Meliponíneos são encontradas em regiões de clima tropical, ocorrendo no Brasil, principalmente na região Amazônica onde é expressivo o número de espécies. Em alguns estudos foi observada a presença de machos diplóides nas abelhas, derivados de ovos fertilizados por endogamia, o que levou a propor a existência de uma complementariedade do sexo. Com base nisso este estudo propôs identificar proteínas específicas para as fases de pupa de rainha, operária e macho de *Melipona interrupta* por espectrometria de massa. Foram identificadas 47 proteínas. Destas, 35 proteínas são comuns para as três condições, 4 foram detectadas apenas em pupa de macho (PM), 2 em pupa de rainha (PR) e 2 em pupa de operária (POP). Outras são compartilhadas por pelo menos duas das condições, sendo que 5 são comuns para PM e PR, 2 para PM e PO e 1 para PO e PR. Algumas proteínas encontradas estão envolvidas de forma indireta com a diferenciação morfológica. Contudo, mais estudos deverão ser realizados para melhor caracterização de cada uma das proteínas e de suas interações com as vias de diferenciação sexual e casta.

Palavras-Chave: Abelha sem ferrão, *shotgun*, espectrometria de massas, proteínas

ABSTRACT

Bees are social insects that live in organized colonies with differentiation of sex and caste. They have a great diversity. They represent around 6% of the total number of species. Native bees, which are popularly known as stingless bees and stingless bees are found in tropical regions, occurring in Brazil, mainly in the Amazon region where a significant number of species. Some studies have observed the presence of diploid males in bees, derived from fertilized eggs inbreeding, which led him to propose the existence of a complementary sex. This study has aim to identify specific proteins for the phases of queen, workers and male pupae from *Melipona interrupta*, for mass spectrometry. We identified 47 proteins. Of these, 35 proteins are common to the three conditions, four were detected only in male pupae (PM), 2 in pupal queen (PR) and 2 worker pupa (POP). Others are shared by at least two of the conditions, and 5 are common to PM and PR, 2 to PM and PO and 1 to PO and PR. Some proteins found are involved indirectly with the morphological differentiation. However, further studies should be conducted to better characterization of each protein and its interaction with the sexual differentiation pathways and caste.

Key-words: stingless bee, *shotgun*, mass spectrometry, proteins

1 INTRODUÇÃO

O Filo Artropoda possui um grande número de espécies e são estimados 75% dos animais do planeta (BUZZI e MIYAZAKI, 1993). Os animais deste filo são identificados por possuírem características distintas e exoesqueleto constituído principalmente por quitina (KERR, 1996; SOARES et al., 2001; SILVEIRA, et al., 2002). Dentro deste grande número de insetos, as abelhas ganham destaque, por sua expressiva quantidade, que em número é estimada em aproximadamente 20 mil espécies e consequente diversidade; por sua utilidade relatada desde as civilizações mais remotas, pois forneciam alimento e materiais úteis ao homem e a maior delas; são agentes polinizadores. As abelhas em sua grande maioria são de hábitos solitários, não vivendo em sociedade (KERR,1996,VILLAS-BOAS, 2012 CARVALHO-ZILSE et al.,2012, VILLAS-BÔAS, 2012).

Por outro lado, há também outras abelhas que vivem em sociedade, se organizando em colônias. Dentre estas espécies ditas eussociais, algumas destas possuem ferrão. Porém, há um número de aproximadamente 400 espécies que não possuem ferrão funcional, a razão pela qual são popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão, organizadas num grupo denominado Meliponíneos (CARVALHO-ZILSE et al.,2012). As abelhas eussociais representam cerca de 6% do número total de espécies e estão divididas de acordo com o padrão de eussocialidade da tribo Meliponini e Apini é considerado o mais evoluído (KERR et al., 1996; ENGEL, 2001; MICHENER, 2007; KRUG, 2007). Os meliponíneos são distribuídos em grande parte nas regiões de clima tropical, com ampla ocorrência no território latino americano, também são encontrados em regiões de clima temperado temperado subtropical. (Figura 1) (NOGUEIRA-NETO, 1997;MICHENER,2000;CAMARGO e PEDRO,2007).

1.1 Importância das abelhas

A região Amazônica é uma região rica e diversificada, tanto em espécies animais como em vegetais. A floresta por ser tão diversa é dependente de insetos que prestem o serviço de polinização. Os insetos que mais contribuem para a polinização são as abelhas. Os meliponíneos possuem grande importância ecológica sendo considerados os principais responsáveis por cerca de 30% a 80% da polinização da flora nativa e também importantes na polinização de plantas domesticadas e usadas em grandes plantações, sendo de vital importância para a manutenção das espécies vegetais em nossa região (NOGUEIRA NETO, 1997, KERR et al., 2001, CAMPOS, 2003, IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2006).

Estima-se que os serviços prestados pelas abelhas movimentam, globalmente, 200 bilhões de dólares por ano e que 30% dos alimentos de origem vegetal consumidos pelo homem dependem da polinização das abelhas (SLAA, 2006). Os serviços de polinização tem contribuição expressiva em algumas culturas de expressão econômica como culturas de maçã, melão em alguns estados como no Ceará e no Rio grande do Norte e Região sul do país (Freitas & Imperatriz-Fonseca, 2005).

Algumas características comuns e exclusivas chamam a atenção nestes seres, como sua morfologia, a organização de suas colônias, diferença de castas dentro destas colônias e diferenciação sexual. Algumas destas serão brevemente descritas nos parágrafos posteriores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morfologia e organização das abelhas

Abelhas são insetos sociais que vivem em colônias organizadas, com diferenciação de sexo e castas. No ninho são encontrados: machos, operárias, e rainhas (FREITAS, 2010). As castas são divididas em rainhas e operárias (GULLAN e CRASNSTON, 2008).

Na tribo Trigonini, as rainhas nascem a partir de células-reais, as quais são diferenciadas das demais por serem bem maiores. Já as da tribo Meliponini as células não são diferenciadas em relação ao seu tamanho, ou seja, as rainhas nascem de células de tamanho igual aos das células de operárias, não há células-reais (NOGUEIRA-NETO, 1997). Há evidências de uma predisposição genética em relação à diferenciação das castas, pois, segundo Kerr (1996) a produção de rainhas em uma colônia é relativamente constante. Mesmo que as castas sejam alimentadas de forma diferenciada, a proporção de rainhas não chega a mais de 25%.

Dentro das colônias a função básica da rainha está relacionada à postura de ovos (oviposição), com fim de, perpetuar a espécie, e manter a união da colméia. Na presença de rainhas virgens no ninho, formam-se aglomerações de machos ao seu redor na espera do vôo nupcial para a fecundação da rainha (NOGUEIRA-FERREIRA e SOARES,1998).

As operárias são de fácil identificação por possuírem um aparelho coletor de pólen, a corbícula, localizado no terceiro par de patas. As operárias são responsáveis pela realização de todo o trabalho da colônia, de acordo com a idade. Os machos por sua vez são facilmente reconhecidos por possuírem a cabeça mais arredondada quando comparada com as das operárias. Os machos não possuem corbícula, mas podem exercer outras funções dentro do ninho além da fecundação (WINSTON, 1987; KERR,1996).

2.2 Diferenciação de castas

Uma característica exclusiva destes indivíduos é o cuidado coletivo com a prole. Estas espécies apresentam divisão de tarefas entre os indivíduos da colônia. Os indivíduos adultos destas colônias pertencem a duas ou mais gerações que são sobrepostas, ou seja, os indivíduos mais velhos cuidam dos mais novos, sobrepondo assim uma geração a outra, este alto grau de organização é característico de indivíduos eussociais (KERR, 1996).

Há divisão de castas, distinguindo em casta reprodutiva e outra não reprodutiva; sendo que rainhas (casta reprodutiva) são fêmeas completas e podem copular com um ou mais machos, conforme a espécie, e armazenam os espermatozoides na espermateca o que permite a conservação por um longo período conforme o número de ovos fecundados que irá por durante sua vida útil. As operárias (casta não reprodutiva) também são fêmeas, mas não são férteis e não copulam com machos. As operárias são responsáveis por algumas das funções dentro da colônia, como limpeza do ninho, defesa da colônia, entre outras funções e desempenham também tarefas fora do ninho, como o forrageamento, em busca de pólen, néctar, água, resina (KERR, 1996; ENGEL, 2001b, HÖLLDOBLER, 2005, GULLAN e CRANSTON, 2008).

Na grande maioria, a determinação das castas se dá pela diferença quantitativa de alimento (NUNES-SILVA, 2008). As abelhas em seu desenvolvimento passam por holometamorfose, com desenvolvimento ordenado desde o estágio de ovo, passando pela fase de larva um estágio inativo (pupal), até a eclosão do indivíduo adulto (CRUZ-LANDIM, 2004), como representado na (Figura 5).

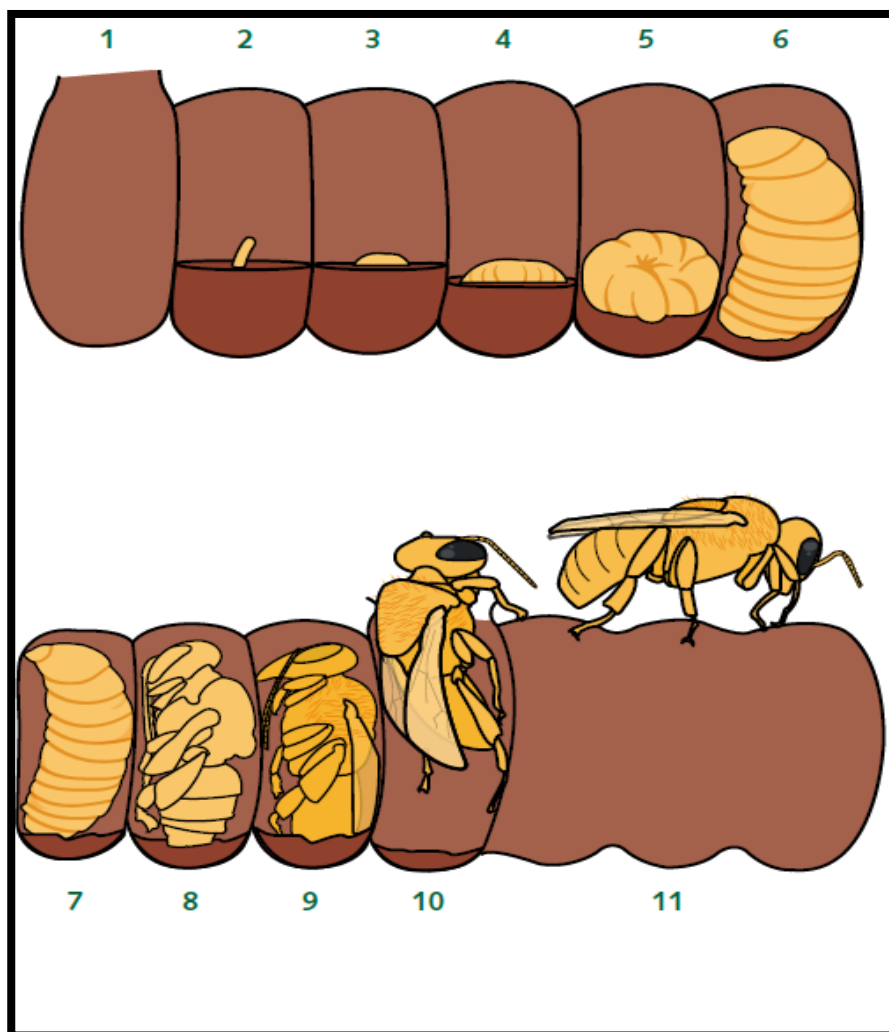


Figura 2: Desenvolvimento fisiológico de meliponínios: 1) Célula de cria; 2) Ovo; 3) Larva no primeiro estágio; 4) Larva no segundo estágio; 5) Larva pré-defecante; 6) Larva pós - defecante; 7) Pré-pupa; 8) Pupa não pigmentada; 9) Pupa pigmentada; 10) Imago; 11) Abelha jovem. Fonte: FRAZÃO (2013). Adaptado de POSEY e CAMARGO (1985).

As larvas depositadas nas células de cria maiores resultam no fenótipo de rainha. Essas células também são conhecidas como realeiras, por serem células maiores e consequentemente, receberem uma maior quantidade de alimento (HARTFELDER et al., 2006).

Em algumas espécies, a construção dos favos de cria se dá em forma de cachos e não há diferenciação em relação ao tamanho das células de cria. Ocorre o rompimento da célula por uma larva mais velha, a qual rompe a célula acima da sua e suga o alimento contido nela, assim recebendo o dobro de alimento e se

desenvolvendo em uma rainha (KERR et al., 1996). Já as espécies do gênero *Melipona*, apresentam células de cria de tamanhos iguais, as rainhas emergem de células de tamanho igual às de operárias e zangões (NOGUEIRA-NETO, 1997).

De acordo com Kerr (1950) a determinação das castas se dá por um mecanismo denominado sistema genético-alimentar. Esse processo decorre do princípio de que dois genes (xa e xb) e cada um desses genes possuam dois alelos. A heterozigose dupla desses genes tem como resultado o fenótipo rainha, enquanto homozigose para um ou para ambos resulta no fenótipo de operária. A combinação gênica nesse processo se associa à alimentação suficiente das larvas, ou seja, há uma quantidade mínima de alimento, ainda que as larvas apresentem dupla heterozigose. Em condições ideais, a produção de rainhas do gênero *Melipona* é constante e em grande quantidade, chegando a um percentual de 25 % das crias (KERR et al., 1996). Diferente da determinação de castas que possui uma proporcionalidade relatada anteriormente a determinação sexual em himenópteros possui particularidades e mecanismos diferenciados que são abordados posteriormente.

2.3 Determinação sexual

A determinação sexual é um fenômeno fundamental e primário da vida (BEYER, 2004). O mecanismo de determinação de sexo em insetos é um importante instrumento evolutivo (BOSCOLLI e KERR, 2008) e determinante no sucesso das espécies. Em abelhas e outros himenópteros há um sistema evolutivo de determinação do sexo denominado sistema haplodiplóide, primeiramente descrito em abelhas por Dzierzon (1845). O sistema de haplodiploidia é um mecanismo responsável pela determinação sexual em himenópteros, que é determinado pela não fertilização ou pela fertilização dos ovos. Neste sistema, os indivíduos hemizigotos haplóides são machos e os heterozigotos diplóides são fêmeas, podendo haver a existência de machos diplóides monozigóticos assim como demonstrado no esquema da (Figura 2) (BOSCOLLI e KERR, 2007; NUNES-SILVA, 2008).



Figura 3: Prováveis resultados do cruzamento entre himenópteros haploides. Desenvolvimento de machos provenientes de ovos não fecundados, e fêmeas de ovos fecundados. Fonte: NUNES-SILVA, 2008, modificado de HASSELMANN et al, (2008).

A determinação sexual em abelhas se dá por partenogênese arrenótoca, ou seja, os machos são provenientes de ovos não fertilizados, enquanto as fêmeas são oriundas de ovos fertilizados. Os machos podem copular mais de uma vez, porém nas abelhas do grupo Apidae, a genitália dos machos é arrancada totalmente ou parcialmente, no ato da copulação, o que leva os machos a morte logo após o acasalamento (MICHENER, 2000).

Em alguns estudos foi observada a presença de machos diplóides nas abelhas, derivados de ovos fertilizados por endogamia, isso levou a propor a existência de uma complementariedade do sexo. Desta forma sugerindo que a determinação do sexo em himenópteros não é regida pelo processo de fertilização dos ovos, nem pelo sistema de heterozigose e homozigose e sim por um loco único que promove o sinal inicial de determinação sexual denominado de SDL (locos de determinação de sexo). (BEYER, 2003)

2.4 O gene do Sistema Complementar de Determinação do Sexo - *csd*

Com a descoberta do loco de determinação sexual em abelhas foi possível o isolamento do gene *csd*. O produto codificado por este gene é necessário para o desenvolvimento de fêmeas e a inativação do mesmo implica na modificação das fêmeas em machos diplóides (Figura 3). (WHITING, 1943; BEYER, 2003; BEYER, 2004; BOSCOLLI e KERR, 2008).

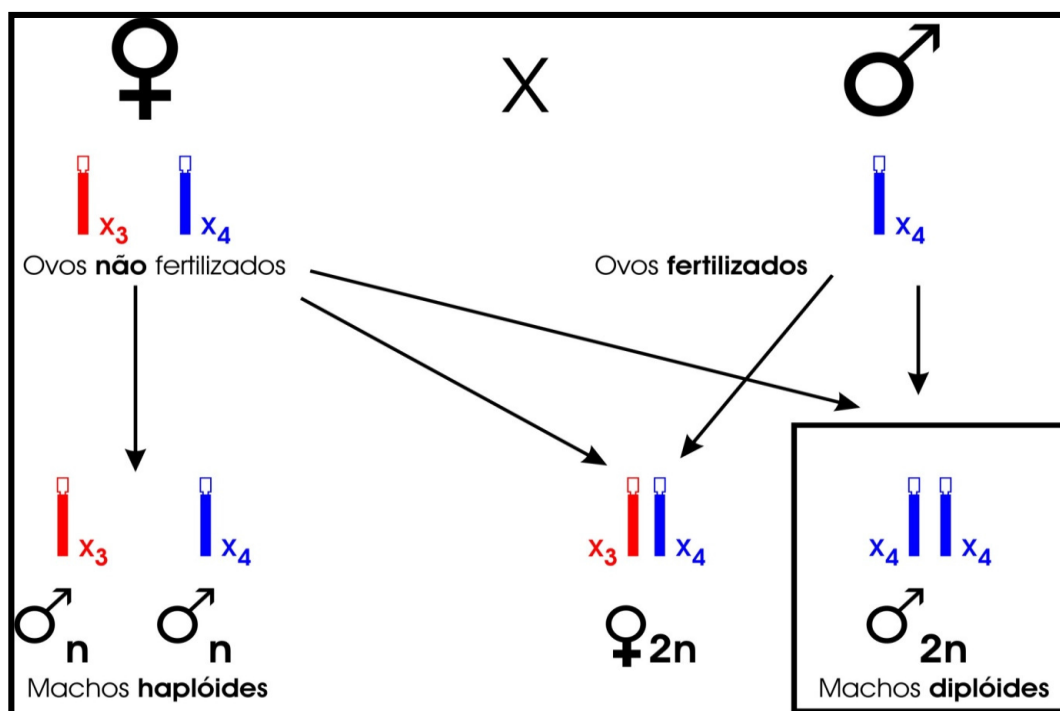


Figura 4: Esquema do cruzamento de alelos sexuais hipotéticos, diferenciados nas cores vermelho (x3) e azul (x4). Os machos desenvolvem-se de ovos haplóides (não fecundados) e as fêmeas de ovos diplóides (fecundados) e heterozigotos. Quando há uma redução da variabilidade de alelos sexuais na população, machos diplóides homozigóticos podem se desenvolver; estes indivíduos são reprodutivamente inviáveis. Modificado de HASSELMANN *et al.*, 2008.

O produto alvo do gene *csd* foi identificado como gene *feminizer* (gene *fem*) (HASSELMANN *et al.*, 2008). O produto do gene *fem* difere entre machos e fêmeas: apenas os indivíduos do sexo feminino possuem um produto funcional do gene *fem* que induz o *splicing* alternativo da região de determinação do sexo. Nos machos, a tradução do gene produz uma proteína não funcional, devido a presença de um códon de parada, isso faz com que não haja o *splicing* e a cascata de desenvolvimento seja interrompida prematuramente levando assim a produção de machos (Figura 4).

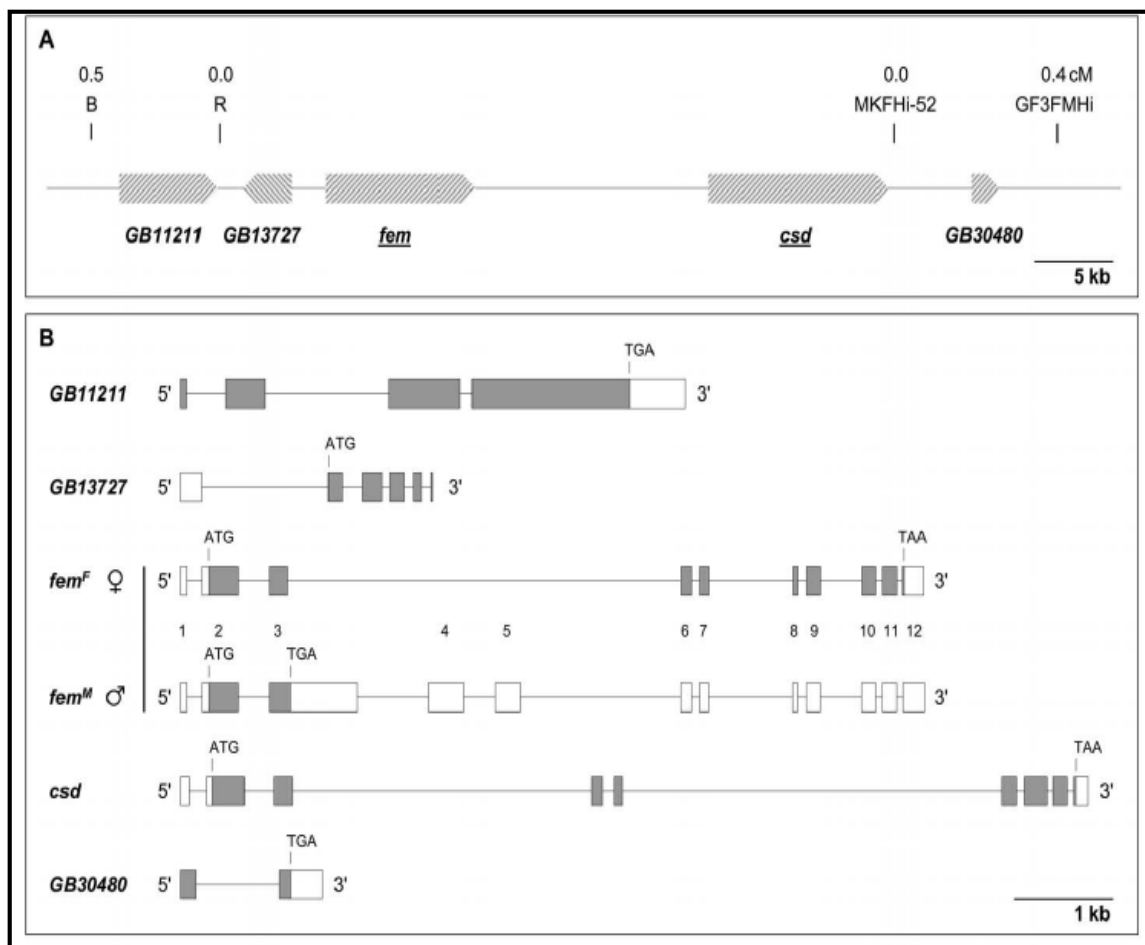


Figura 5: Organização do RNAm produzido a partir dos genes de SDL em *Apis*: (A) Diagrama dos genes de SDL dentro deste mapeamento genético as fêmeas são sempre heterozigotas. Os genes são orientados na direção 5' – 3' de acordo com a direção das setas; (B) Diagrama da estrutura dos *íntrons* e dos *éxons* do gene encontrados no SDL. Os *éxons* estão representados nas caixas e os *íntrons* são conectados a estes e são representados por linhas no diagrama. O início das leituras abertas destacadas na cor cinza e a região de início dos códons de parada são indicadas. Adaptado de Gempe et al., (2009).

Ao contrário do genoma, o proteoma que consiste no conjunto de proteínas expressas num dado tecido ou em uma dada célula, este encontra-se em estado ativo, respondendo a estímulos externos e internos, ou seja, pode se modificar dependendo das condições e estímulos ao qual o organismo está exposto, permitindo assim uma maior aproximação dos processos metabólicos intracelulares (FEY e LARSEN, 2001). Contudo, as análises proteômicas surgem como um

complemento de estudos genômicos, esclarecendo as redes de funcionamento e a regulação celular, interligando assim o genótipo e o fenótipo de um organismo (SILVA e SILVA et al., 2007).

Sendo assim, a proteômica, surgiu para esclarecer melhor os mecanismos bioquímicos e fisiológicos a nível molecular, permitindo a observação da expressão gênica e efeitos de regulação e expressão que ocorre pós-tradução e pós-transcrição, esclarecendo a função biológica e seus processos (HOOGLAND et al., 2000; DUTT e LEE, 2000).

A proteômica surgiu nos anos 70, quando se deu início a base de dados proteômicos, graças a utilização da técnica de eletroforese (O'FARREL, 1975). O que levou a uma catalogação das manchas nos géis bidimensionais, para a criação de um banco de dados dos produtos gênicos expressos. (GALDOS et al 2010). Segundo Burley, o termo proteômica vai além da uma análise funcional dos produtos gênicos, dando lugar a estudos mais abrangentes de identificação, localização de proteínas e suas funções. (BURLEY, 1999) O termo proteoma foi utilizado em 1995 para descrever o conteúdo de proteínas expressas de um dado organismo, tecido ou células. (WILKINS et al., 1996). Diante disso a proteômica é utilizada para melhor compreensão dos mecanismos moleculares.

Nos estudos de Halssemann e colaboradores foram encontrados resultados de proteínas expressas em *Apis mellifera*, que possivelmente estejam relacionadas na diferenciação sexual destes organismos (GEMPE, 2004; HASSELMANN 2009).

2.5 Alguns aspectos importantes no estudo proteico

O bom preparo das amostras é uma etapa crucial para bons resultados na proteômica. As metodologias de extração, precipitação e solubilização das proteínas podem variar conforme a amostra a ser analisada, isso deve ser estabelecido para cada caso. (RABILLOUD, 1996; CORTHALS et al., 2000; STULTS e ARNOTT, 2005; GORG et al., 2016; USAMI et al., 2007; GALDOS, 2009).

Diversos estudos proteômicos são baseados em técnicas de separação de proteínas. Para melhor investigação a proteômica utiliza técnicas de separação como a eletroforese bidimensional que é a principal técnica de separação de

proteínas atualmente utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. A vantagem do uso dessa técnica é a possibilidade de separar com um nível alto de resolução um número elevado de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões proteicos (QUALTIERI et al., 2007; SIZOVA et al., 2007).

A eletroforese em 2D é uma técnica que consiste na separação das proteínas de acordo com duas propriedades: ponto isoelétrico (pI) e sua massa molecular; especificamente na primeira dimensão há separação pelo pI , e na segunda dimensão a separação é realizada em função de sua massa. As proteínas são separadas por seu ponto isoelétrico através da focalização isoelétrica, o que consiste na primeira dimensão e, sequente à segunda dimensão onde as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular. (ANDERSON e ANDERSON, 1996, QUALTIERI, 2007; GALDOS, 2009).

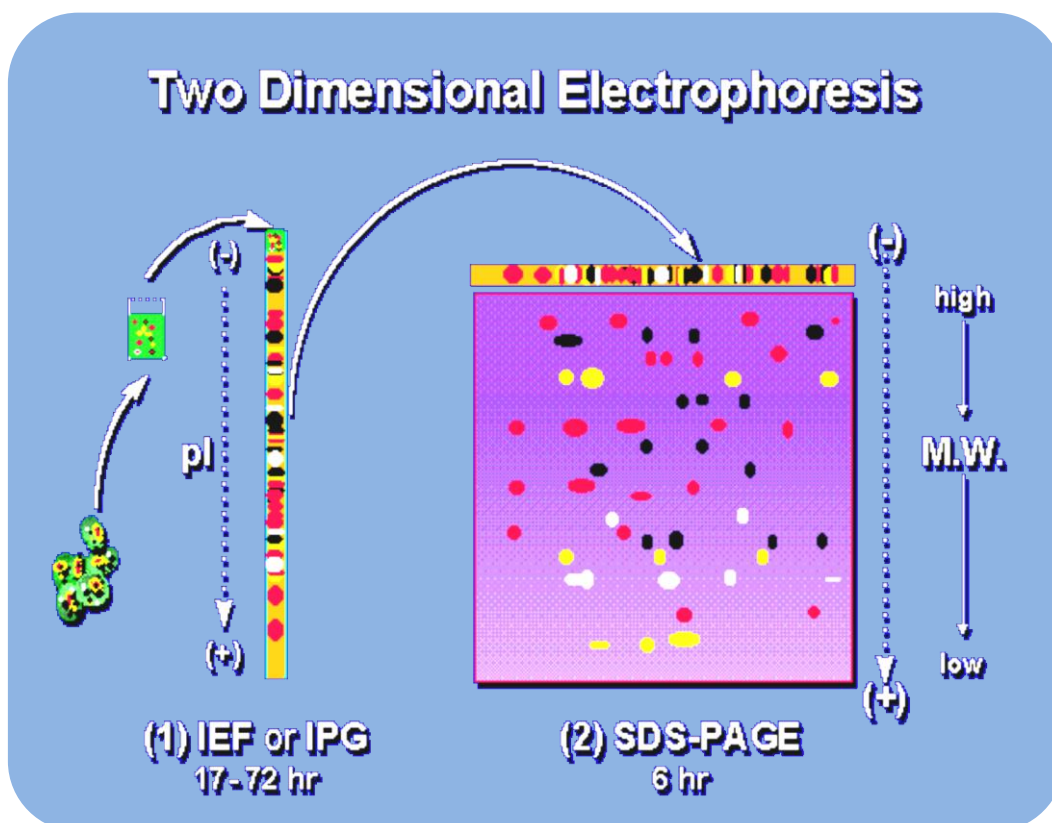


Figura 6: Eleletroforese 2D-Page modificado de GALDOS, 2009.

A análise das imagens obtidas nos géis é feita com a utilização de softwares especializados, permitindo comparações de vários géis, podendo assim identificar com base no que é visualizado por presença ou ausência, intensidade das proteínas diferenciando ou igualando as condições de cada amostra comparada. Algumas já podendo até ser previamente identificadas, por seu *pI* e massa molecular se esta já houver sido previamente descrita (JAMES, 1997). Acoplado à análise 2D está a análise por espectrometria de massas. Em matrizes biológicas complexas, a dinâmica das proteínas é muito elevada (KOKOT et al.,2011). Desta forma, é um grande desafio para concentrar o analito de modo a identificar as proteínas presentes em níveis mais baixos. Para isto o uso de métodos mais sensíveis é feito.

Na espectrometria de massas, as proteínas são separadas através da técnica analítica PMF (*Peptide Mass Fingerprint*), que consiste basicamente na digestão de uma proteína em pequenos peptídeos, na sequência a medida de suas massas absolutas em espectrômetro de massas MALDI-TOF ou ESI-TOF. Após a obtenção dessas massas, os resultados são “lançados” contra um banco de dados contendo genomas sequenciados ou sequencias de proteínas conhecidas. As sequencias de proteínas deduzidas de um genoma específico são “digeridas” teoricamente pelo programa e, através da comparação dos perfis obtidos da proteína de interesse e dos obtidos do genoma, obtém-se a melhor cobertura por análises estatísticas, que corresponderá a proteína específica (MICAS, 2012).

A espectrometria de massas é uma técnica de alta sensibilidade. (WILKINS2007, FREOUR et al.,FREOUR et al., 2013,REES et al.,2013,WANG et al, 2013 E YU et al., 2013). Devido a algumas limitações da técnica eletroforética como a baixa reprodutibilidade e os avanços das tecnologias dos espectrômetros de massa, foi desenvolvido novas técnicas como o *shotgun* que é uma técnica que atualmente vem sendo utilizada na identificação das proteínas de misturas mais complexas (MATYSIAK et al., 2014). al.,2013,REES et al.,2013,WANG et al, 2013 E YU et al., 2013). Devido a algumas limitações da técnica eletroforética como a baixa reprodutibilidade e os avanços das tecnologias dos espectrômetros de massa, foi desenvolvido novas técnicas como o *shotgun* que é uma técnica que atualmente vem sendo utilizada na identificação das proteínas de misturas mais complexas (MATYSIAK et al., 2014).

2.4.1 HPLC e UPLC

O método de HPLC (cromatografia de alta eficiência), se trata de uma técnica bem estabelecida e utilizada nas mais diferentes áreas, para solução de diversos problemas analíticos (Maldaner L, Jardim, 2012). A UHPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência) segue o mesmo princípio de uso da técnica de HPLC, tendo como principal diferença as suas colunas, que possuem uma dimensão reduzida e o tamanho das partículas de preenchimento que são menores ou igual a 2 μm , o que implicou na melhor precisão dos resultados, e diminuição da quantidade de amostras usadas para análise, melhor reprodutibilidade e rapidez. (Nováková et al 2005, Apollonio, L et al, 2006). Com essas facilidades e o aumento da empregabilidade do uso da UPLC nas análises, a técnica prevalece alvo de inovações, com o objetivo já definido, em relação a melhoria de novas fases estacionárias (FE), suportes cromatográficos e conseqüentemente melhoria dos equipamentos. (Maldaner L, Jardim, 2012).

Considerando os poucos estudos que esclarecem a base genética da determinação sexual dos himenópteros (Nunes- Silva, 2008) e a grande importância destes organismos para a manutenção da flora, pelo serviço prestado como polinizadores naturais e sua utilidade na produção de alimentos (agricultura) bem como a conservação da fauna entre outros (SLAA et al., 2006) e as poucas informações desta espécie, julga-se de grande interesse o estudo proteômico da espécie em estudo tendo em vista, que o sistema de determinação das castas é regulado, especialmente, por mecanismos genéticos e por influência ambiental, a identificação de proteínas diferenciais, na fase de pupa, de cada uma das condições poderão contribuir, no deslumbre e nas futuras investigações da espécie em estudo contribuindo assim para a conservação da mesma (KERR, et al 1950; 1966).

Alguns estudos com *Apis mellifera* investigaram as alterações das células somáticas, delimitando o controle das modificações destas células. Outros estudos com a mesma espécie buscou investigar as modificações nas células germinativas com base na possível divergência dos sinais de diferenciação sexual não serem entre células somáticas e células germinativas o que resultou na identificação de algumas proteínas que estão envolvidas na diferenciação sexual em *Apis*. Com base

nestes estudos e com base nos resultados que serão obtidos neste trabalho, uma gama de estudos genéticos e biotecnológicos poderão ser desenvolvidos, podendo assim abrir espaço para investigação das interações reguladoras nos genes de determinação tendo como base o estudo proteômico, ou seja, o que está sendo expresso com o objetivo de futuramente desvendar as interações reguladoras dos genes de determinação sexual em *Melipona interrupta* (MARSH e WIESCHAUS 1978; SCHUTT e NÖTHINGER, 2000; BEYE et al. 2003; CASPER e VAN, 2006 HASSELMANN, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar proteínas específicas para as fases de pupa de rainha, operária e macho de *Melipona interrupta*

3.2 Específicos

Obter extratos protéicos de pupa de rainha, operária e macho de *Melipona interrupta*;

Obter mapas proteômicos, para as diferentes condições experimentais.

Identificar proteínas específicas de cada condição experimental por espectrometria de massa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Coleta de pupa

As pupas utilizadas foram cedidas pelo Grupo de Pesquisa em Abelhas (GPA) no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA, sob coordenação da Profa. Dra. Gislene Carvalho Zilse. As colônias selecionadas foram as mais fortes, considerando a quantidade e reserva de alimento na colméia e o número elevado de indivíduos.

Após a escolha da (as) colônia (as) e do (os) disco(os), selecionado (os), (Figura 7), o procedimento de retirada das pupas de suas células foi feito com o auxílio de pinças e microscópio para visualização do órgão sexual.



Figura 7: Discos de cria de *Melipona interrupta* BARBOSA-COSTA 2007 *apud* FRANCINI, 2008.

A diferenciação das pupas (rainha e operária) ocorre por meio da visualização do tamanho da cabeça e do abdômen. No caso da diferenciação dos sexos (macho e operária), é necessária a visualização do gonóstilo (Figura 8, destacado em círculo amarelo). O gonóstilo é uma estrutura da genitália nos machos, que serve para prender a fêmea durante a cópula (OLIVEIRA et al., 2013).

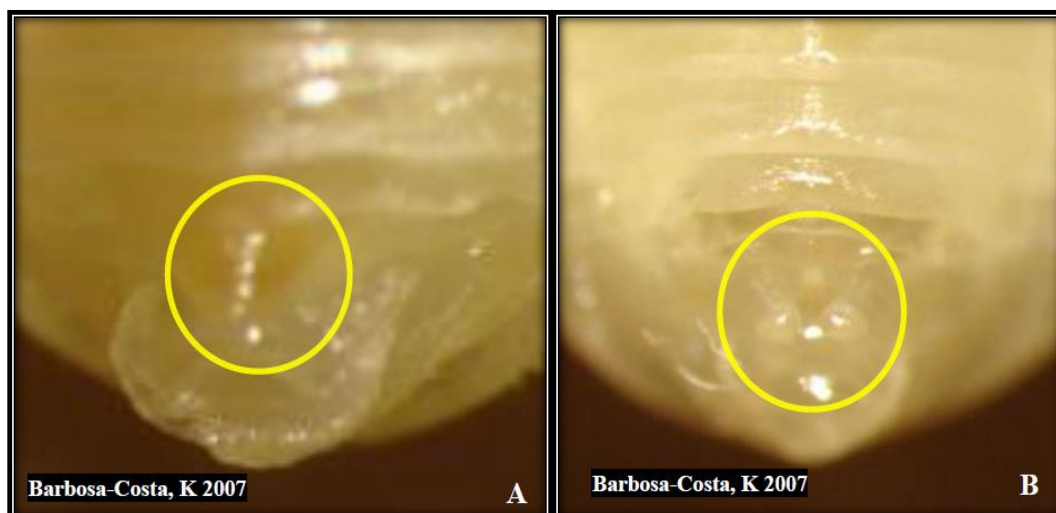


Figura 8: Visualização da estrutura característica do gonóstilo (destacado em círculo): Em (A), gonóstilo de operária e em (B), do Macho em *M. interrupta*. BARBOSA-COSTA 2007 *apud* FRANCINI, 2008.

Após a identificação, as pupas foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e imediatamente congeladas a -80°C . Foram transportadas para o laboratório de proteômica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e armazenadas a -80°C até o início do processo de extração de proteínas. Utilizaram-se pupas de estágio I (olho e corpo sem pigmentação) de rainha, operária e macho.

4.2 Extração de proteínas

Para extração de proteínas, adicionou-se às amostras 1500 μL de tampão de lise com anfólitos (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 50mM DTT, 1% PVPP, 2% de IPG Buffer 3-11, 1 mM PMSF e coquetel de inibidores 1x). Em seguida, o material foi parcialmente macerado com o auxílio de um bastão de vidro. Após essa etapa, as células foram completamente homogeneizadas com auxílio de um disruptor ultrassônico (*ECO-SONICS Desrruptor/sonicador Ultrassônico* modelo QR200), em 3 pulsos de 30% da potência máxima (conforme as especificações do fabricante) por 30s, podendo ser aumentado em pulsos de até 40% se necessário, e intervalo de 1min. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo para evitar aquecimento e degradação das amostras. Ao término da lise celular, a amostra foi deixada em banho de gelo por 60min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por

30min a 12000 a 4°C. O sobrenadante foi distribuído em alíquotas com volumes de 100µL em microtubos de 1,5mL, seguido da adição 5V de solução gelada de clorofórmio: metanol na proporção de (1:4). Em seguida, os tubos foram levados para agitação em vortex por 30s e centrifugados por 20min, a 12000rpm, a 4°C. O *pellet* obtido foi ressuspenso com 1mL de metanol gelado e novamente centrifugado por 20min, a 12000rpm, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o excesso de metanol foi retirado com o auxílio de papel toalha. Este procedimento de lavagem com metanol foi repetido mais duas vezes. O *pellet* resultante foi seco a temperatura ambiente e armazenados a -20°C até o momento de uso.

4.2.1 Dosagem de proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada com o *Kit* 2D-Quant (GE Healthcare), seguindo as orientações do fabricante. A absorbância foi aferida por leitura em espectrofotômetro em 480 nm, a concentração final de cada amostra foi calculada.

4.3 Análise em gel de primeira dimensão (SDS-PAGE)

A qualidade do extrato protéico obtido foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE, utilizando-se 5µg de proteínas previamente solubilizadas em uréia 5M na presença de tampão de amostra (Tris-HCl 0,2M pH 6,8; 4% (v/v) β-mercaptoetanol; 20 % (v/v) glicerol; 0,1 % (p/v) azul de bromofenol) resultando em um volume final de 20µL. As amostras foram deixadas em banho-maria a 100 °C por 5min para desnaturação das proteínas e posteriormente incubadas em temperatura ambiente para aplicação no gel SDS-PAGE 12%.

A eletroforese foi realizada em sistema BIO-RAD Mini-PROTEAN SYSTEM e tampão Tris-Glicina 1x pH 8,3 (Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M, SDS 0,1%). A potência utilizada foi de 30 W, corrente 50mA por gel e tensão máxima de 200V para separação das proteínas, por aproximadamente 1h: 30min. Para visualização, o gel

foi submerso em solução fixadora (ácido acético 10%, metanol 40%) por 30 minutos e a coloração realizada na presença de azul de Coomassie (0,5% Coomassie, 25% etanol, 8% ácido acético) e deixado em incubação *overnight*. Após o período de incubação com a solução corante, o gel foi submerso em água deionizada para a retirada do excesso do corante. Em seguida foi submergido em solução descorante (25% de etanol e 8% de ácido acético) para melhor resolução da imagem e documentação da mesma por digitalização em *scanner* (LabScan 5.0, GE Healthcare).

4.4 Eletroforese de duas dimensões (2DE)

Nesta etapa, para a preparação do gel bidimensional, foi realizada a separação das proteínas tanto pelo ponto isoelétrico (pI), como pela massa molecular. Aproximadamente 200 µg de proteínas foram solubilizadas em tampão de reidratação (*DeStreak Rehydration Solution*) e 1% anfólitos (*IPG buffer pH 3-11*) que facilitam a corrida das proteínas nas *strips* (fitas com gel imobilizado com gradiente de pH). Este sistema foi vortexado por 2 min, incubado a temperatura ambiente por 10 min seguido de centrifugação por 2min a 10000rpm a temperatura ambiente para sedimentação de partículas insolúveis e remoção de bolhas. Após solubilização o conteúdo foi aplicado no sarcófago (*strip holder*) de forma uniforme. As *strips* foram postas sob a amostra nos sarcófagos posicionadas em direção aos seus respectivos polos. A focalização das amostras foi realizada no sistema do focalizador EttanIPGphor II (GE Healthcare) numa temperatura de 20°C e corrente total de 50 mA por fita, utilizando a seguinte programação:

Tabela 1: Programação da focalização

PROGRAMAÇÃO PARA FOCALIZAÇÃO	
1	10 hrs para reidratação a 20°C,
2	Focalização 150 volts (V) por 2 hrs,
3	300 V por 2 hrs,
4	1000 V por 4 hrs,
5	8000 V por 2 hrs
6	8000 por 2 hrs.

Após o término da focalização, as *strips* foram imersas em 2mL de solução de equilíbrio I, incubadas por 15 minutos sob leve agitação a temperatura ambiente. Logo após, as *strips* foram transferidas para a solução II (alquilação) e incubadas nas mesmas condições anteriores. As *strips* foram então transferidas para o gel desnaturante SDS-PAGE 12%. Com o posicionamento correto das *strips* nos sistemas de gel adicionou-se uma quantidade suficiente de gel de agarose 0,8% (em Tris-Glicina 1x, contendo 0,1 % (p/v) azul de bromofenol. A corrida de eletroforese foi realizada sobre as seguintes condições: 500 Volts, 50mA (por gel) e 50W. A visualização dos pontos protéicos foi realizada conforme descrito no item.

Tabela 2: Componentes das soluções de equilíbrio I e II

Solução I	Solução II
Ureia-1,4g	Ureia-1,4 g
Glicerol-87 % - 1,4mL	Glicerol-87 % - 1,4 mL
Tris- HCl 1,5 pH 8,8 – 20µL	Tris- HCl 1,5 pH 8,8 – 200µL
DTT – 0,02g	Iodoacetamida (IAA) – 0,05g
SDS – 0,08	SDS – 0,08 g
-	Azul bromofenol – 20µL

Tabela 3: Componentes para o preparo do gel de agarose que é utilizado para fixação das *strips* nos géis

COMPOSIÇÃO DO GEL DE AGAROSE

Agarose	0,5%
Tris Glicina	1X
Azul de bromofenol	0,002%

Para as análises do perfil proteômico, os géis foram previamente digitalizados utilizando *LabScan 5.0*, seguido de análise no programa *Image Master Platinum*, versão 7.0 (*GE Healthcare*), com os valores de *saliência* e *smooth*, igual a 100 e 2, respectivamente, realizando-se correções manuais. Foram obtidos três géis para cada condição. Nesta análise o gel com o maior número de *spots* foi considerado como gel referência. Os géis referência de cada condição foram comparados entre si utilizando o programa *Image Master Platinum*, versão 7.0 (*GE Healthcare*), para verificação da similaridade e expressão diferencial.

4.5 Redução e alquilação

As amostras foram diluídas com 200 ureia 8M para redução das ligações dissulfeto, foi adicionado ao extrato proteico 0,5M de DTT da solução estoque para uma concentração final de 5 mM e incubado por 25 min a 56°C. Após esse período o complexo proteico foi deixado até atingir a temperatura ambiente e sequente foi adicionado 14mM de iodoacetamida e incubado em ambiente sem iluminação por 30min a temperatura ambiente para alquilação das cisteínas. Ao termino desse período a iodoacetamida foi descartada e adicionou-se 0,5M de DTT para um volume final de 5mM e incubado na ausência de iluminação a temperatura ambiente.

Após essa etapa um gel de uma dimensão (SDS-PAGE) foi feito para analisar a integridade do extrato proteico de todas as condições experimentais, verificar a ausência de degradação proteica e presença de possíveis interferentes demonstrado pelo arraste no gel.

4.5.1 Tratamento com tripsina

Após essa etapa foi realizada a diluição da mistura com 1:5 25mM de Tris-HCl, pH 8,2, para reduzir a concentração de ureia de 1,6M. Adicionou-se 0,1 M da solução estoque de CaCl_2 para um volume final de 1mM. Seguiu-se com a adição de tripsina para uma concentração mínima de 4-5ng mL⁻¹ e 1/200-1/250 e incubado *overnight* a 37°C. Após deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente e paralisar a reação de digestão com tripsina foi adicionado com TFA a 0,4% (vol/vol). Depois da realização desta etapa as amostras foram levadas a centrifuga por 10min a 2500rp a temperatura ambiente e o sedimento foi descartado.

4.5.2 Tratamento das amostras para espectrometria de massas

Análises por espectrometria de massas foram previamente tratadas assim como descrito anteriormente. Para essa etapa foram obtidos três amostras de cada condição (macho, operária e rainha). As amostras foram dessalinizadas para a remoção de ureia e de outros possíveis interferentes. Após isso ressuspendidas em ácido fórmico e injetadas no UPLC e analisadas em espectrômetro de massas. Os parametros utilizados seguiram o protocolo de Villen e Gygi, 2008 .

4.6 Classificação das proteínas

Para a classificação de proteínas, os resultados considerados foram analisados usando os programas de bioinformática disponíveis NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/)), e os dados foram comparados utilizando a base de dados de *Apis mellifera* a espécie mais próxima da espécie em estudo. O UniProt (<http://www.UniProt.org/>), e KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) foram utilizados para catalogar as proteínas de acordo com suas funções atribuídas assim conforme os resultados obtidos pelas pesquisas realizadas nestes bancos de dados. Os gráficos foram gerados usando *software Scaffold version 4.5*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das pupas provenientes de *Melipona interrupta*.

As abelhas foram identificadas conforme sua diferenciação morfológica, como descrito anteriormente no item 4.1.1.

5.2 Extração de proteínas provenientes das pupas

A extração das amostras e a qualidade do extrato protéico avaliada por eletroforese em SDS-PAGE (Figura 9), demonstrou que, quando comparado o perfil proteico para macho (PM), rainha (PR) e operária (POP) não é observado alguma diferença conclusiva quanto ao perfil de proteínas expressas. Os resultados obtidos demonstram que a extração foi bem sucedida. A ausência de arrastes no gel sugere a ausência de interferentes ou possível degradação das amostras pela ação de proteases. Dessa forma, seguiu-se com as etapas do tratamento das amostras com tripsina dessalinização e análises por espectroemtria de massas.

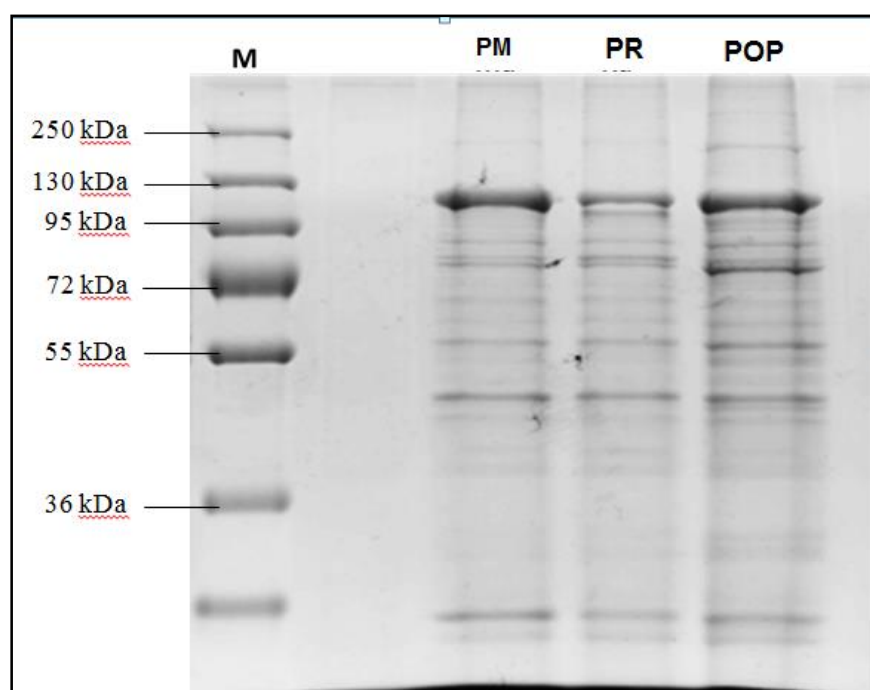


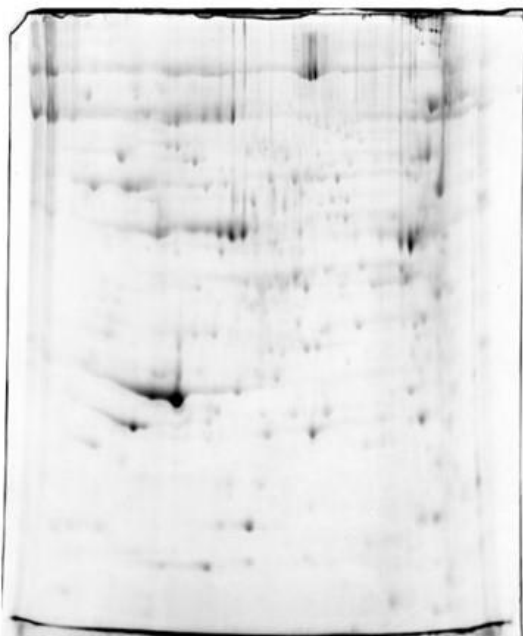
Figura 9: Extrato total de proteínas (5µg), separadas em gel de poliacrilamida 12% e coradas com Azul de Comassie. M: Marcador (*Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* apparent MW); PM macho; PR: rainha; POP: operária

5.3 Perfis proteômicos 2D *M. interrupta* em estágio I de PR, POP e PM

A digitalização dos géis 2D para cada condição, foi realizada como descrito no item 4.4. Nesta análise o gel com o maior número de *spots* foi considerado como gel referência. Os géis referência de cada condição foram comparados entre si utilizando o programa *Image Master Platinum*, versão 7.0 (GE Healthcare), para verificação da similaridade e expressão diferencial.

Nas Figuras abaixo são apresentados os perfis proteômicos de pupa em estágio I de *M. interrupta* de macho (A), rainha (B) e operária (C). Contudo, estes resultados são preliminares e serão posteriormente confirmados a partir da obtenção de pelos menos três géis com similaridade mínima de 70% para cada condição , seguido de análise comparativa a fim de se detectar *spots* com expressão diferencial. Estes serão isolados para identificação de proteínas envolvidas com a determinação de sexo e casta em *M. interrupta*.

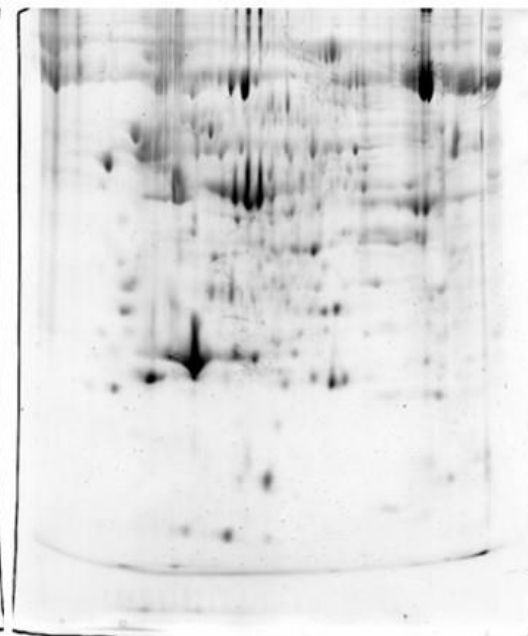
Rainha Strip **58459***
spots **458**



Rainha Strip **56173**
spots **519**

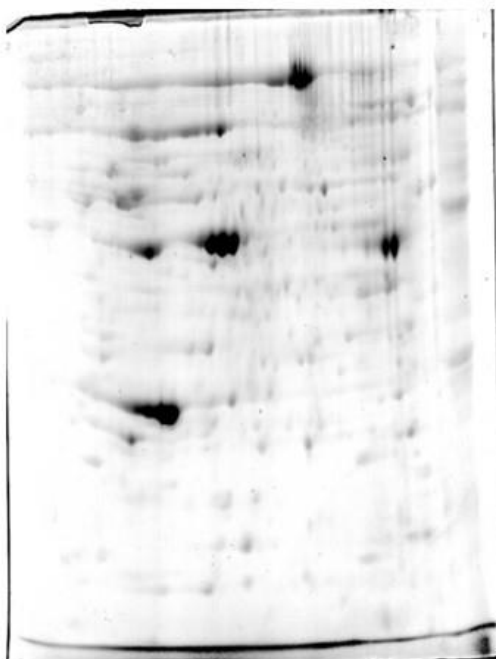


Rainha Strip **59044**
spots **395**

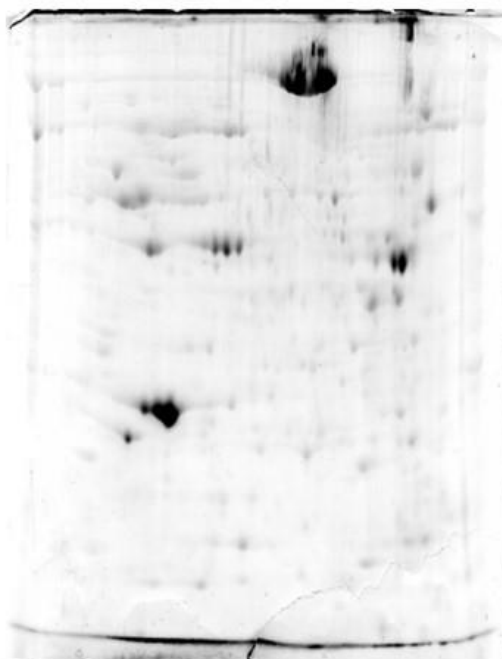


10-A

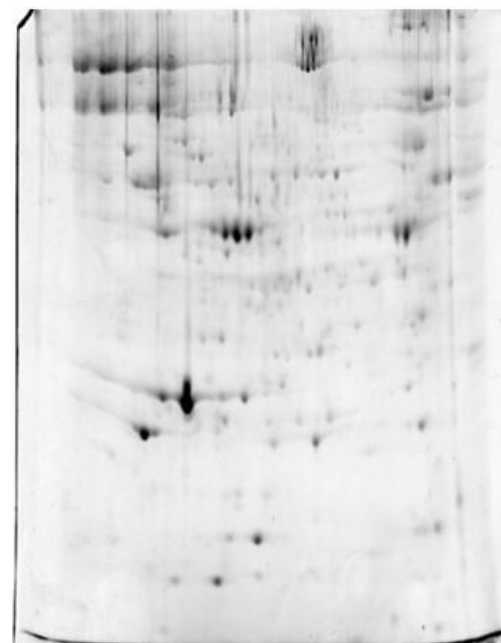
Operária -Strip 56531*
spots 329



Operária Strip 56532
spots 368



Operária Strip 58458
Spots 367



10-B

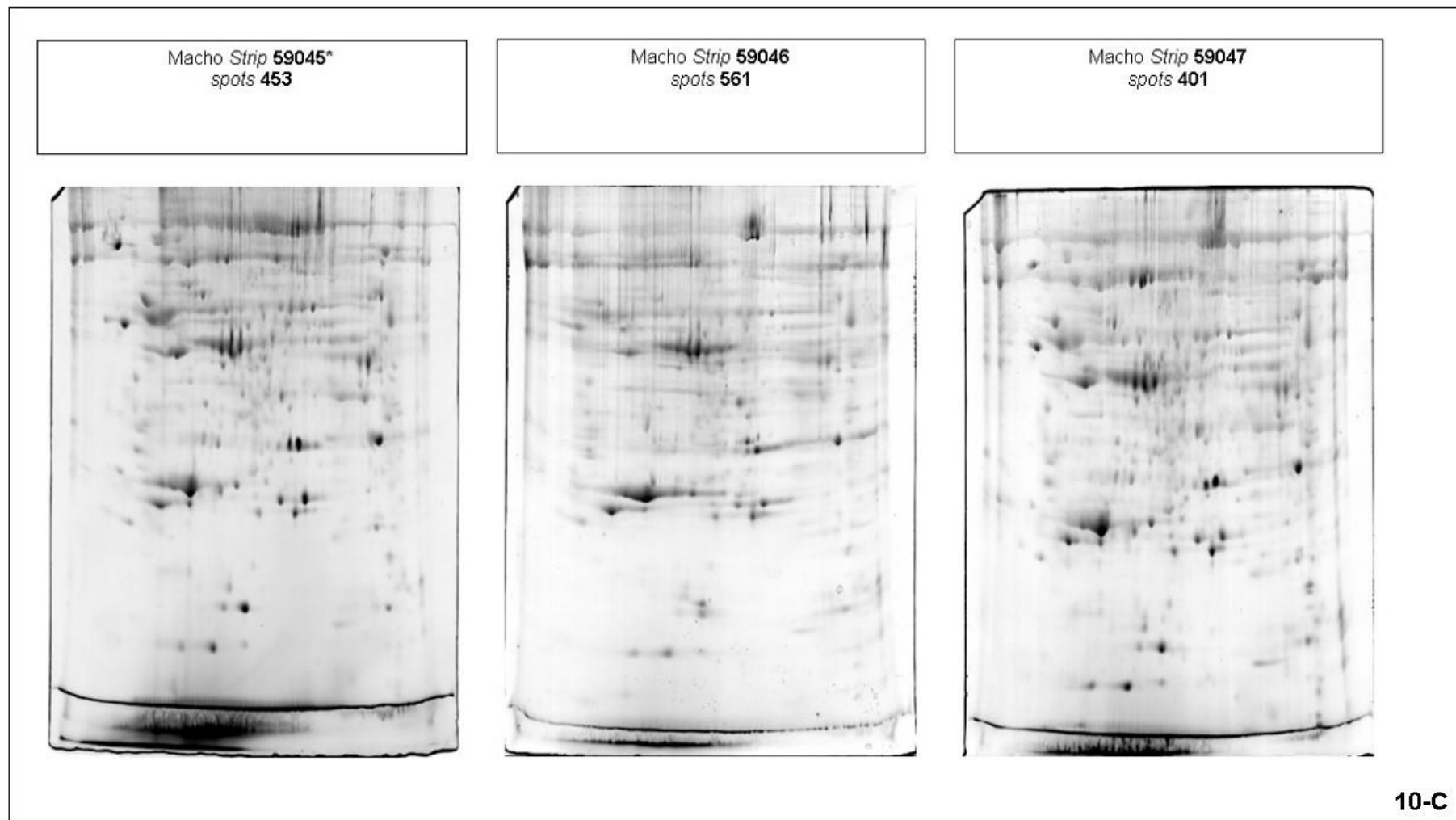


Figura 10: Perfil proteômico de rainha (A), operária (B) e macho (C). Para todas as condições foram usados 200 µg de proteínas. Primeira dimensão feita em faixa de pH 3-11 (13cm); Segunda dimensão em SDS-PAGE 12%; coloração em azul de Coomassie blue G-250; géis editados no *software* ImageMaster Platinum 7.0.

5.4 Espectrometria de massas

Após a análise do perfil proteico, seguiu-se com análise de massas. Foi aplicada a técnica de *shotgun*. Com os resultados obtidos pela tecnologia *shotgun*, das três condições (PM, POP, PR) quarenta e sete (47) proteínas foram identificadas por espectrometria de massas conforme mostrado abaixo na tabela (4), gerada com nome e número de acesso de cada uma das proteínas e das condições específicas.

#	Visible?	Starred?	Bio View: 51 Proteins in 47 Clusters	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	PM			POP			PR		
							PM1	PM2	PM3	POP1	POP2	POP3	PR1	PR2	PR3
1	☒	☒	Cluster of PREDICTED: tubulin beta-1 chain ...	gi 48095525 [3]	50 kDa	★	15	8	20	16	23	18	19	20	11
2	☒	☒	Cluster of PREDICTED: tubulin alpha-1 chain...	gi 66535209 [2]	50 kDa	★	12	14	15	10	11	13	9	16	10
3	☒	☒	Cluster of actin related protein 1 [Apis mell...	gi 297591985 [5]	42 kDa	★	7	13	8	6	5	7	9	3	6
4	☒	☒	hexamerin [Apis mellifera]	gi 149939401 (+2)	80 kDa		4		3	6	4	4	3	4	4
5	☒	☒	cuticular protein 1 precursor [Apis mellifera]	gi 399158374	22 kDa		3	1	5	6	3	7	5	6	5
6	☒	☒	PREDICTED: elongation factor 1-alpha isofo...	gi 571530983 (+4)	50 kDa		2	0	4	4	2	5	5	0	0
7	☒	☒	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolas...	gi 110748949 (+1)	40 kDa		4	10	3	4	2	2	2	2	3
8	☒	☒	heat shock protein 90 [Apis mellifera]	gi 226446415 (+1)	83 kDa		3		4	2	3	5	4	4	5
9	☒	☒	PREDICTED: beta-ureidopropionase-like iso...	gi 328778710	43 kDa		3	4	2	3	2	2	1	1	0
10	☒	☒	PREDICTED: 60 kDa heat shock protein, mit...	gi 66547450	60 kDa		2	1	2	4	3	4	2	2	4
11	☒	☒	PREDICTED: D-arabinitol dehydrogenase 1-L...	gi 66546988	37 kDa		3	3	3	2	4	3	4	3	3
12	☒	☒	PREDICTED: cofilin/actin-depolymerizing fa...	gi 571515702	17 kDa		2		3	4	4	4	3	3	
13	☒	☒	heat shock protein cognate 4 [Apis mellifer...	gi 229892210	71 kDa		2	2	4	4	1	3			
14	☒	☒	PREDICTED: heat shock protein beta-1-like ...	gi 110757651 (+1)	26 kDa		3	0	2	3	2	2	1	2	1
15	☒	☒	PREDICTED: 14-3-3 protein epsilon isoform ...	gi 571538231 (+1)	29 kDa		0	1	3	0	2	0	3	3	2
16	☒	☒	PREDICTED: histone H2B-like [Apis mellifera]	gi 110749558 (+3)	14 kDa		4		4	1	1	1	1	4	
17	☒	☒	PREDICTED: translation elongation factor 2...	gi 66508439	95 kDa		1	2	2	1	1	2	1		2
18	☒	☒	PREDICTED: fructose-1,6-bisphosphatase 1...	gi 571547142 (+2)	38 kDa		2	0	2	1	1	2	2	2	
19	☒	☒	ADP/ATP translocase [Apis mellifera]	gi 33642164 (+2)	33 kDa		2					2	2	2	3
20	☒	☒	heat shock protein cognate 3 precursor [A...	gi 229892214	73 kDa		1		1	1	1	2	1	1	
21	☒	☒	PREDICTED: myosin heavy chain, non-musc...	gi 571546724 (+1)	228 kDa		1	0	1	1	2	1	1	1	1
22	☒	☒	PREDICTED: WD repeat-containing protein ...	gi 571546465	69 kDa			1	0	0	0	0			0
23	☒	☒	PREDICTED: chitinase-like protein Idgf4-lik...	gi 571545713 (+3)	60 kDa		1		1	2	2	2		2	
24	☒	☒	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: anolino...	gi 571543905	374 kDa	-	0	-	2	2	-		1	1	1
25	☒	☒	PREDICTED: transaldolase [Apis mellifera]	gi 571501685	41 kDa		0		2			1	0	2	
26	☒	☒	PREDICTED: alpha,alpha-trehalose-phosph...	gi 328776871 (+1)	86 kDa			3	1			2			2
27	☒	☒	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase r...	gi 571521158	35 kDa		1		1	1	2	1	1	1	
28	☒	☒	superoxide dismutase 1 [Apis mellifera]	gi 295849268 (+1)	16 kDa		0			2	2			2	
29	☒	☒	PREDICTED: synaptic vesicle membrane pr...	gi 571531698	51 kDa		1		2		1				
30	☒	☒	PREDICTED: mesencephalic astrocyte-deriv...	gi 66533332	20 kDa				1		0		1	1	1
31	☒	☒	PREDICTED: 14-3-3 protein zeta-like isofo...	gi 571554783 (+6)	28 kDa			1			1				0
32	☒	☒	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: sorbito...	gi 571536203	39 kDa					1	2				
33	☒	☒	PREDICTED: rab GDP dissociation inhibitor b...	gi 110751295	50 kDa							2		2	
34	☒	☒	PREDICTED: NADP-dependent malic enzym...	gi 328778238 (+2)	71 kDa				1			1	1		
35	☒	☒	PREDICTED: histone H2A-like [Apis mellifera]	gi 110749621 (+4)	13 kDa	★	2	0				0		0	
36	☒	☒	arginine kinase, partial [Apis mellifera]	gi 124264768 (+7)	22 kDa				1				2		
37	☒	☒	PREDICTED: putative deoxyribose-phospha...	gi 328786659 (+1)	33 kDa			2						0	
38	☒	☒	PREDICTED: FK506-binding protein 5 [Apis ...	gi 328792562	48 kDa			2							
39	☒	☒	PREDICTED: annexin-B9-like [Apis mellifera]	gi 571531564	34 kDa			2							1
40	☒	☒	PREDICTED: 40S ribosomal protein S7 [Apis ...]	gi 571576123	25 kDa			0							1
41	☒	☒	PREDICTED: kinesin-like protein K39-like is...	gi 328786800 (+2)	35 kDa									2	
42	☒	☒	PREDICTED: ATP synthase subunit gamma, ...	gi 571565099 (+1)	33 kDa			1							
43	☒	☒	PREDICTED: eukaryotic initiation factor 4A-...	gi 66551115	48 kDa						2				
44	☒	☒	PREDICTED: ATP-citrate synthase isoform X...	gi 571571517 (+1)	120 kDa			0							1
45	☒	☒	PREDICTED: proteasome subunit beta type...	gi 328787541	23 kDa			2							
46	☒	☒	PREDICTED: FGGY carbohydrate kinase do...	gi 571530033 (+3)	60 kDa										1
47	☒	☒	PREDICTED: muscle-specific protein 20 [Api...	gi 571545919	20 kDa		1								

Tabela 4: Tabela com as proteínas identificadas. (PM-Pupa de Macho, POP-Pupa de operária e PR-Pupa de Rainha). A tabela foi gerada especificamente com o nome das proteínas, seguido do número de acesso, o tamanho molecular e a quantidade de vezes que foram detectadas em cada uma das condições. Este experimento foi realizado em triplicata onde o número PM, POP, PR 1, 2 e 3 são correspondentes aos números de repetições de cada amostra, e isso vale para as demais.

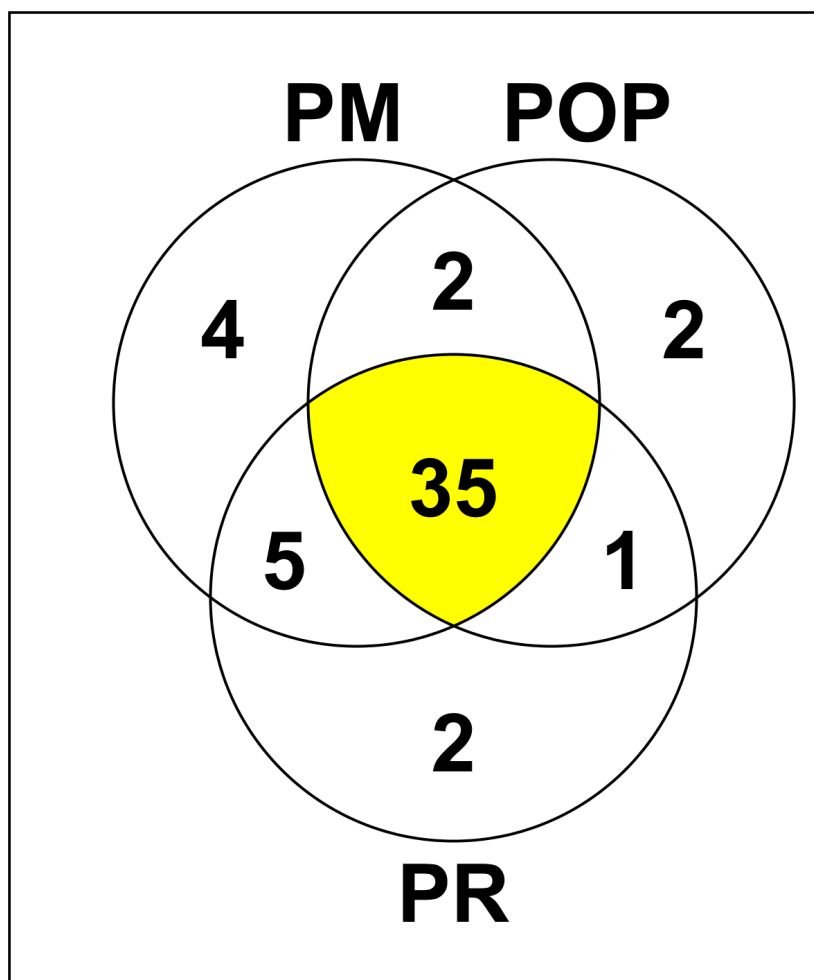


Diagrama de Venn 1: Distribuição das proteínas identificadas de acordo com o sexo e casta em pupa *M. interrupta*. Este diagrama foi gerado utilizando o software, *Scaffold* com base na tabela de proteínas detectadas ao qual foram detectadas 47 proteínas estatisticamente validas.

Das 51 proteínas encontradas apenas porém 47 destas aparecem na tabela por serem estatisticamente validas, algumas foram exclusivas de cada condição: 4 foram encontradas somente em Pupa de macho, 2 em Pupa de operária e 2 em pupa de Rainha, 35 destas foram comuns a todas as três condições, 5 foram encontradas em Pupa de Macho e Pupa de rainha, 1 foi comum para pupa de Rainha e Pupa de operária e 2 foram encontradas tanto em pupa de macho quanto de operária.

Numa visão geral as proteínas encontradas em sua grande maioria são participantes dos processos metabólicos, participando das sínteses de carboidratos,

transporte e produção de energia, atividades ligantes, estes dados são confirmados por outros estudos que mostraram que grande parte do que é expresso está relacionado a processos metabólicos (ERBAN, 2013).

Este estudo foi direcionado à identificação de proteínas de diferenciação sexual e casta em *Melipona interrupta*. Como já dito a grande maioria das proteínas identificadas são participantes do metabolismo. Estudos demonstram uma grande participação de proteínas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos e produção de energia em fase de desenvolvimento larval (FENG et al, 2009; DI et al, 2009).

A justificativa para tal participação deve-se à demanda dessas como combustível chave para o desenvolvimento de abelhas operárias para forrageamento (NEUKICH A.,1982) e como nutrientes para os neurônios, contribuindo nos processos de aprendizagem e memorização. (GARCIA et al , 2009, Tsacopoulos & magisthethi, 1996).

A alta expressão das proteínas envolvidas com metabolismo sugerem também uma alta demanda energética para agrantie a formação de tecidos e órgãos, desenvolvimento da cabeça do sistema nervoso e metamorfose (ZHENG et al, 2011) como por exemplo as que participam da organização de proteínas citoesquelética, como actina e tubulina, são fundamentais para o desenvolvimento celular, representando um ponto crucial na formação do folículo ovariano e na determinação do ovócito, assim como, na diferenciação casta específica do ovário de rainhas e operárias de *Apis mellifera* nas fases larvais (HIME et al., 1996; SCHMIDT-CAPELLA e HARTFELDER, 1998; 2002; CRUZ-LANDIM et al., 2009). Este estudo também mostrou a relação destas proteínas sendo comprovado com a aplicação tópica do hormônio juvenil (HJ), ao qual já foi comprovado o seu importante papel na regulação da metamorfose (NIJHOUT E WHEELER, 1982; RIDDIFORD, 1994), na regulação da fertilidade das fêmeas estimulando a síntese de vitelogenina, nos corpos gordurosos, desenvolvimento dos oócitos (WYATT e DAVEY, 1996), e na regulação da maturação sexual nos machos onde a presença de β -tubulina no núcleo das células investigadas demonstrando o provável papel da tubulina nuclear na proliferação celular e seu papel juntamente com o hormônio juvenil em machos de *A. mellifera*. O que corrobora com os dados encontrados, tanto em relação à fase específica de pupa, por se tratar de proteínas do citoesqueleto e participantes em outros mecanismos que estão presentes

em grandes quantidades no corpo gorduroso do desenvolvimento destes indivíduos e na diferenciação de castas e maturação de gônadas.

As enzimas Peptidil-Prolil Isomerase (PPIases) são divididas em três famílias: ciclofilinas, FKBP e parvulinas. Essas famílias apesar de suas sequências e suas estruturas diferenciadas se assemelham em relação a sua função de peptidil-prolil isomerase. A proteína FK506 (FKBP) são proteínas de ligação, que tem atividade peptidilprolil cis/trans isomerases. Essas enzimas tem a capacidade de isomerização de ligações peptídicas entre uma prolina e um aminoácido qualquer (ligação Xaa-Pro) como mostra a (Figura 10). Porém a ação destas proteínas não se limita a sua atividade de isomerase, algumas destas podem agir como chaperonas são responsáveis por modificações moleculares, variando em tamanho molecular 12-135 kDa e são um grupo com alto grau de conservação (GALAT 1993, 2003, 2004, BELL et al.,2006; KANG et al.,2008). São expressas em todos os organismos e são envolvidas em diversos processos bioquímicos (STANDAERT 1990; SOMARELLI JÁ, 2008)

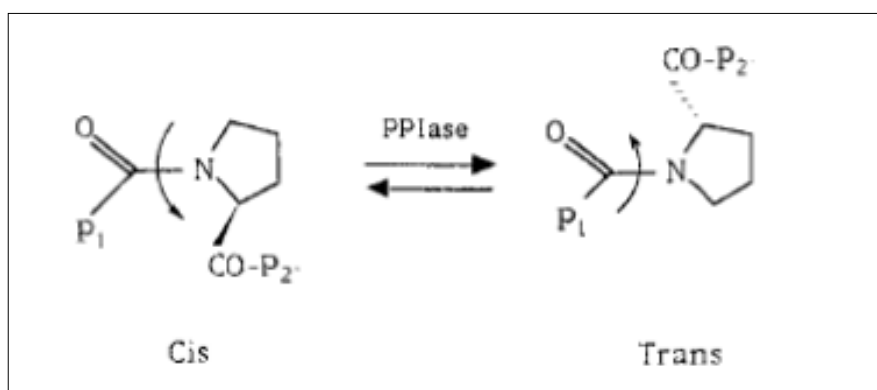


Figura 11: Exemplo de Isomerização cis-trans de uma ligação peptídica Xaa-Pro (GALAT A., 1993).

O TOR (*targed of rapamycin*) é uma quinase que atua como um componente central de uma via de sinalização em eucariotos, regulando o crescimento celular e do organismo em resposta as condições nutricionais (OLDHAM et al. 2003, COLOMBANI et al. 2003). O complexo rapamicina-FK506 (FKBP) inibe a cinase TOR, que é essencial para diversos processos. (revisado por BARIK, 2006). A produção deste análogo de rapamicina a FK506 *binding protein* encontrada em uma das

amostras de macho, pode ter relação direta com a diferenciação morfológica, e sexual. Devido a participação e competição pelo mesmo sítio ativo de ambas as proteínas, o que nos induz a crer que a quantidade de proteínas FK506, altera de alguma forma o desenvolvimento de características de fêmea nestes insetos, considerando o fato de que a diferença nas quantidades de rapamicina no estudo de Patel 2007 que mostrou uma diferença drástica de rainhas que se diferenciaram morfológicamente e adquiriram características de operárias como o desenvolvimento de cobicula que exclusiva de operárias. O que mostra uma relação com esta proteína denominada TOR que já foi descrita anteriormente como participante na diferenciação de castas em *Drosophila* em *Apis mellifera*. e, estudada em insetos (POWERS et al 1999; COLOMBANI et al, 2003; GUERTIN et al 2006; PATEL et al, 2007). As hexamerinas foram também detectadas em todas as três condições.

As Hexamerinas são proteínas de armazenamento com funções primordiais em metamorfose do inseto. As hexamerinas são sintetizadas principalmente por o corpo gorduroso na fase larval e segregadas na hemolinfa. Em geral, a quantidade destas proteínas na hemolinfa é maior ao fim da fase de alimentação das larvas, mas a quantidade diminui a progressão do desenvolvimento do indivíduo, devido à sua absorção pelo organismo durante e após a metamorfose. (ESBAN, 2014).

As hexamerinas são proteínas que estão relacionadas a processos metabólicos, são usadas como fonte de aminoácidos durante a fase de metamorfose em abelhas (LOTÉRIO,2011). Estas proteínas são de grande massa molecular sendo em sua maioria de 75 e 90 kDa (SCHELLER et al, 1990; TELFER e KUNKEL,1991). A síntese destas proteínas ocorre no corpo gorduroso na fase larval, devido a constante ingestão de alimento, posteriormente as proteínas hexamerinas são secretadas na hemolinfa onde sofrem um acúmulo (SCHELLER et al.,1990; HAUNERLAND,1996; MARTINS, 2011). Quando a etapa de alimentação da larva é interrompida para que a mesma, passe para a pós – larval (pupa), ocorre então o sequestro das hexamerinas pelas células do corpo gorduroso onde são sintetizadas por estas células e armazenadas para posterior uso nos processos metabólicos, servindo de reserva de aminoácidos e energia para a construção de tecidos e órgãos durante a metamorfose. Estudo realizados por Martins (2011) demonstrou o envolvimento de hexamerinas com a maturação das gônadas em abelhas, pois as mesmas foram encontradas tanto em ovários como nos testículos em

desenvolvimento o que demonstra a associação desta proteína com os núcleos das linhagens germinativas, além desta relação estas proteínas podem ter um papel considerável na replicação do DNA (MARTINS, 2011). Algumas dessas tem ação “protetora” como as HSPs ou *Heat shock proteins*.

As proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - HSPs) são proteínas de respostas a estresses, auxiliam no reparo ou na remoção de moléculas “comprometidas” ou “danificadas” assim mantendo a integridade celular (SCHLESINGER et al, 1994, FRYDMAN 2001, KREGEL 2002). São extremamente conservadas e podem ser encontradas em procariotos e eucariotos (SARKAR et al., 2006; ELEKONICH, 2009). As proteínas HSPs são parte da família das chaperonas e de proteases, e são classificadas de acordo com sua massa molecular como por exemplo HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 que são algumas das principais proteínas descritas, (PARSELL et al, 1994, SARKAR et al., 2006). As HSPs foram descobertas e estudadas primeiramente em *Drosophila* em resposta ao estresse térmico e ao estresse oxidativo, desde então a *Drosophila* tem sido fundamental para a compreensão da regulação da resposta ao choque térmico e ao estudo da relação das HSPs em outros processos, como por exemplo ao processo de envelhecimento (RITOSSA, 1962, TOWER, 2011). Em nosso resultado foi identificadas proteínas de choque térmico nas pupas de operária e pupas de macho, estudos mostram que em abelhas as formas imaturas podem apresentar mudanças nas diferentes condições ambientais, seus mecanismos de defesa podem evoluir mesmo nas fases larvais e de pupa. (CHACON-ALMEIDA et al. 2000)

Em indivíduos adultos as proteínas de choque térmico parecem ter uma maior importância em resposta aos estímulos externos, principalmente para abelhas forrageiras, pois durante o voo, a temperatura corpórea destes indivíduos sofre um aumento, principalmente na região abdominal, que pode chegar a 47°C (SOUTHWICK et al, 1993).

MANF (Fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos) é uma proteína que é produzida pelo organismo de forma natural, em mamíferos, está excepcionalmente relacionada com a proteção dos neurônios prevenindo a apoptose (morte celular programada) em resposta a uma lesão ou doença (AIRAVAARA et al 2010, LINDAHL et al 2014). Estudos em invertebrados apontam esta como um dos fatores neurotróficos identificados com sequência de aminoácidos conservada.

Consideram a DmManf que é uma molécula homóloga de MANF, encontrada em *Drosophila*, necessária para manutenção celular de neurônios dopaminérgicos embrionários e larvais que não expressam DmManf, demonstrando que a função trófica extracelular é conservada para o sistema dopaminérgico. (LINDHOLM et al 2007, Lindholm e SAARMA et al 2010). Em nossas análises, MANF foi identificado exclusivamente nas amostras de rainha, o que indica ser um forte candidato a desempenhar um papel fundamental em abelhas na mediação dos eventos anti-apoptóticos em células cerebrais destes indivíduos.

6 CONCLUSÃO

A análise proteômica realizada com pupa de *Melipona interrupta* gerou 47 proteínas identificadas nas três condições propostas. A grande contribuição deste trabalho foi à detecção de proteínas que estão envolvidas de forma indireta com a diferenciação morfológica. Estudos futuros que envolvam as proteínas por nós identificadas poderão ser utilizados. Contudo, mais estudos deverão ser realizados para melhor caracterização de cada uma das proteínas e de suas interações com as vias de diferenciação sexual e casta, o que nos induz a mais estudos e de um aperfeiçoamento quanto à técnica e uso de mais *software* que nos possibilitem verificar a maior relação destas proteínas. Um aspecto limitante para a identificação das proteínas se relaciona com o fato da possibilidade de um banco genômico de *M. interrupta* para estudos comparativos.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD R; MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. Mar 13;422(6928):198-207. 2003.

AIRAVAARA M, CHIOCCO MJ, HOWARD DB, ZUCHOWSKI KL, PERÄNEN J, LIU C, FANG S, HOFFER BJ, WANG Y, HARVEY BK. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury. *Experimental Neurology*. 2010; vol 225 :104 - 13

ANDERSON, N.G; ANDERSON, N. L. *Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future* .*Electrophoresis*, v. 17, p. 443-453, 1996.

APOLLONIO, L. G.; PIANCA, D. J.; WHITTALL, I. R.; MAHER, W. A.; KYD, J.M.; *J.Chromatogr., B::Anal. Technol.Biomed. Life Sci.* 2006, 836, 111. *approach*. Signpost, Trivandrum, India, 43-60.

BEYE, M. The dice of fate: the csd gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays*, 26: 1131-1139. 2004.

BEYE, M.; HASSELMANN, M.; FONDRK, M. K.; PAGER, R. E.; OMHOLT, S. W. The gene csd is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an srtype protein. *Cell*, v. 114, n. 4, p. 419-429, 2003.

BOSCOLLI B. P; KERR, W. E. Levantamento do Número de alelos do Gene Complementary Sex Determiner, (Csd) Em Uma População Finita De *Melipona Scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). 2008.

BUZZI, Z.J.; MIYAZAKI, R.D. *Entomologia didática*. Curitiba: UFPR, 262p. 1993.

CAMARGO, J.M.F; PEDRO, S.R.M. *Meliponini* Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. e Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. 2007.

CAMPOS L. A. O; PERUQUETTI, R. C; COELHO, C.D. P; ABRANTES, C. V. MAACHADO; L.C. O.L. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revta bras. Zool.* 16 (Supi.2): 101 – 118. 1999.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático – Nota técnica. *Química Nova*, v. 31 (3), p. 669-675. 2008a.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático - Material Suplementar. Química Nova, v. 31 (3), p. S1-S5. 2008b.

CHACON-ALMEIDA Virginia Maria Lopes, Zil'a Luz Paulino Simões, M'arcia Maria Gentile Bitondi. Induction of heat shock proteins in the larval fat body of *Apis mellifera* L. bees. Apidologie, Springer Verlag, 2000, 31 (4), pp.487-501.

CORTHALS, G. L.; WASINGER, V. C.; HOCHSTRASSE, D. F.; SANCHEZ, J. C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research.

COSTA, M.A.; DEL LAMA, M.A.; MELO, G.A.R; SHEPPARD, W.S. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. Apidologie, 34 (1): 73-84. 2003.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massas de proteínas: o papel-chave da espectrometria de massas na era pós-genômica. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 36, p. 40-46. 2006.

DE SOUSA, M. V; FONTES,W.; RICART, C. A. Análise de Proteomas: O despertar da era pós-genômica. Revista on line-Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 2, n. 7, p. 12-14,1999.

DUTT, M. J.; LEE, K. H. Proteomic analysis. Curr. Opin. Biotechnol. v. 11, n. 2, p. 176-179, abril 2000.

ELECTROPHORESIS, v. 17, p. 813-829, 1996.

ELECTROPHORESIS, v. 21, p. 1104-1115, 2000.

ELEKONICH M. M. Extreme thermotolerance and behavioral induction of 70-kDa heat shock proteins and their encoding genes in honey bees. Cell Stress Chaperones. 2009 Mar; 14(2): 219–226. Published online 2008 Aug 12. doi: 10.1007/s12192-008-0063-z

ENGEL, M.S. Monophyly and extensive extinction of advanced eusocial bees: insights from a unexpected Eocene diversity. PNAS, 98(4): 1661-1664. 2001.

FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. Two- dimensional gel electrophoresis. Curr. Opin. Chemistry & Biology, v.5, n.1, p.26-33, 2001.

FRAZÃO,R. Abelhas Nativas da Amazônia e Populações Tradicionais. Manual de Meliponicultura,1ª Edição, Belém do Pará. 2013.

FREOUR, T., Com, E., Barriere, P., Bouchot, O., Jean, M., Masson, D., Pineau, C., 2013. Comparative proteomic analysis coupled with conventional protein assay as a strategy to identify predictors of successful testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. Andrology U. S. 1, 414 e 420

FRYDMAN, J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 603–647.

GALDOS, A. C. R. Análise proteômica do saco vitelino de bovinos. [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GEMPE, T.;HASSELMANN, M.; SCHIOTT, M.; HAUSE, G.;OTTE, M.;BEYE,M. Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *PLOS Biology* 7(10):e1000222.doi:10.1371/journal.pbio.1000222. 2009.

GORG,A.;KLAUS, A.; LUCK, C.; WEILAND, F. *Two-dimensionalelectrophoresiswith immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual*.Disponível em: <<http://www.wzw.tum.de/blm/deg/>>. Acesso em: 17 janeiro 2016.

GULLAN, P. J. e CRASTON, P. S. Os insetos: um resumo de entomologia. Terceira edição. São Paulo: Editora Rocca, 456 p. Hagerdon, H. H. & Kunkel, J. G. 2007.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. Os insetos: um resumo de entomologia. Terceira edição.Editora Roca, São Paulo, SP, Brasil. 456pp. 2008.

HARTFELDER, K.; MAKERT, G.R.; JUDICE, C. C.; PEREIRA, G. A. G.; SANTANA, W. C.; DALLACQUA, R.; BITONDI, M. M. G. Physiology and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, v. 37, n. 2, p. 144-163. 2006.

HASSELMANN, M.; GEMPE, T.; SCHIOETT, M.; NUNES-SILVA, C.; OTTE, M.; BEYE, M. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway. *Nature*, London. 2009.

HERNÁNDEZ, LIUDY GARCIA. Análise proteômica aplicada à ontogenia, comportamento e aprendizagem em abelhas. 2009. 68 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) -Universidade de Brasília, Brasília.2009.

HESKETH, A. R.; CHANDRA, G.; SHAW, A. D.; ROWLAND, J. J.; KELL, D. B.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F. Primary and secondary metabolism, and posttranslational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, v. 46 (4), p. 917-932. 2002.

HOOGLAND C., SANCHES J.C., TONELLA L, BINZ PA, BAIROCH A, HOCHSTRASSER DF, Appel RD The SWISS-2DPAGE database update. *Nucleic Acids Res.* 28: 286-288. 2000.

IMPERATRIZ-FONSECA VL, SARAIVA AM and De Jong D. Bees as Pollinators in Brazil: Assessing the Status and Suggesting Best Practices. *Holos*, Ribeirão Preto. 2006.

JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics*, v. 30, p. 279-331, 1997.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

KERR WE, CARVALHO G.A, SILVA A.C, ASSIS M.G.P .Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, 12:20-41. 2001

KERR WK, CARVALHO G.A, Nascimento VA 1996. Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. Paracatu: Acangaú.

KERR, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 35: 143- 152.

KERR, W.E. Numbers of chromosomes in some species of bees. *Journal of Kansas Entomology Society*, 45: 11–122. 1972.

KOKOT, Z.J., Matysiak, J., Urbaniak, B., Derezinski, P., 2011. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2487e2494

KREGEL, K. C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92(5): 2177-2186.

LINDAHL M, DANILOVA T, PALM E, LINDHOLM P, VÕIKAR V, HAKONEN E, USTINOV J, ANDRESSOO J-O, HARVEY B, OTONKOSKI T, ROSSI J, SAARMA M. MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic β cells. *Cell Rep.* 2014;7:366–75

LINDHOLM P, VOUTILAINEN MH, LAURÉN J, PERÄNEN J, LEPPÄNEN V-M, ET AL. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 2007 vol 448: 73–77.

LINDHOLM PÄIVI, SAARMA MART. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* 2010, 70: 360–371.

MALDANER LIANE, JARDIM ISABEL CRISTINA SALES FONTES. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica* 2012.014 ISSN 1984-4433

MICHENER, C. D. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 pp. 2007.

MICHENER, C. *The bees of the world*. [S.I.]: Johns Hopkins University Press, 2000.

MOORE, K.E., Carlson, S.M., Camp, N.D., Cheung, P., James, R.G., Chua, K.F., Wolf-Yadlin, A., Gozani, O., 2013. A general molecular affinity strategy for global detection and proteomic analysis of lysine methylation. *Mol. Cell* 50, 444e456.

MOURE J. S. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apidae), *Studia Entomol.* v. 4, p.181-242. 1961.

MOURE, J.S.;URBAN, D.; MELO G.A.R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058pp. 2007.

NOGUEIRA-FERREIRA FH, Soares AEE. Male aggregations and mating flight in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia, Série Zoológica*; 84:141-4. Porto Alegre.1998.

NOGUEIRA-NETO P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Editora Nogueirapis, São Paulo, SP, 446 pp. 1997.

NOVÁKOVÁ, L.;MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P.;*Talanta*2006,68,908.

NUNES-SILVA, C.G. Mecanismo molecular da determinação de sexo e casta em *Melipona compressipes* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 59 pp. 2008.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. *The*

OLIVEIRA,F. F. B.; RICHERS T. T.; SILVA J. R, FARIAS R.C; MATOS T. A.L..Guia Ilustrado das Abelhas "Sem-Ferrão Hymenoptera, Apidae, Meliponini" das Reservas Amanã e Mamirauá. Tefé Brasil: IDSM. 2013.

PARSELL D.A, Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto R.I, Tissières A, Georgopoulos C, editors. *The Biology of Heat Shock Proteins Molecular Chaperones*.Vol. 26. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. pp. 457–494.

POSEY, D. A.; CAMARGO, J. M. F. Additional Notes on the Classification and Knowledge of Stingless Bees (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera) by Kayapó Indians of Gorotire, Pará, Brazil. *Annals of Carnegie Museum*54 (8): 247-274. 1985.

QUALTIERI, A.; PERA, M. L.; URSO, E.; BONO, F.; VALENTINO, P.; SCORNAIENCHI, M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 159, p. 125-133, 2007.

QUALTIERI,A.;PERA,M.L.;URSO,E.;BONO,F.;VALENTINO,P.;SCORNAIENCHI,M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 159, p. 125-133, 2007

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analysis.

REES, M.A., Smith, A.I., Coppel, R.L., 2013. A proteomic strategy to compare surface expressed proteins in pathogenic and benign bacteria. *Respirology* 18, 34e34

RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*.1962;18:571–573.

SANTOS, A B. Abelhas Nativas: Polinizadores em declínio. ESFA ISSN1806-7409. 2010.

SARKAR, S.; Arya, R.; Lakhota, S.C. 2006. Chaperonins: in life and death. *In*: SCHLESINGER M.J., How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins, *Pediat. Res.* 36 (1994) 1–6.

SCHWARZ, H.F. The genus *Melipona*. The type genus of the Meliponidae of stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 63:231-460. 1932.

SILVA E SILVA, A. M., CORRÊA G. C; REIS, E. M. Proteômica-Uma abordagem Funcional do estudo do Genoma. Universidade do Grande Rio UNIGRANRIO Saúde e Ambiente em Revista, Duque de Caixias. v.2, n.2,p.01-10.. Jul-Dez .2007.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 253 pp. 2002.

SIZOVA, D.; CHARBAUT, E.; DELALANDE, F.; POIRIER, F.; HIGH, A. A.; PARKER, F.; DORSSELAER, A. V.; DUCHESNE, M.; DIU-HERCEND, A. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiology of Aging*, v. 28, p. 357-370, 2007.

SLAA, E.J.; Sánchez Chaves, L.A.; Malagodi-Braga, K.S.; Hofstede, F.E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37 (2): 293-315. 2006.

SOARES, L. A., ZANETTE, L. R. S., PIMENTA, H. R., GONÇALVES, A. M; MARTINS, R. P. Nesting Biology of *Isodontia costipennis* (Spinola) (Hymenoptera: Sphecidae). *Journal of Hymenoptera Research*, Sofia, v. 10, n. 2, p. 245-250, 2001.

SOUTHWICK E.E., Physiology and social physiology of the honey bee, in: Graham J.M. (Ed.), *The hive and the honey bee*, Dadant and Sons, Illinois, 1993, pp. 171–196.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO C.A.L.; ALVES R.M. de O. Notas sobre a bionomia de *Melipona asilvai* (Apidae: Meliponini) como subsídio à sua criação racional. *Archivos de Zootecnia*, 57 (217): 53-62. 2008.

SOUZA, Maria trindade de Identifica de abelhas sem ferrão da Amazônia. Manaus. Dissertação (mestrado), INPA.2010.

SREEDHAR A.S.; SRINIVAS U.K. (Eds). *Stress responses: a molecular biology*
STULTS, J. T.; ARNOTT, D. Proteomics. *Methods Enzymology*, v. 402, p. 245–
289,2005.

SWARTZ, M.E.;*J.Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*2005,28,1253.

TOWER,JOHN,.HEAT Heat shock proteins and Drosophila aging. HHS Author
Manuscripts ,PMC3018744, 2011.

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; NAKAZAWA, K. Two-dimensional electrophoresis of
protein from cultured postimplantation rat embryos for development toxicity
studies.*Toxicology in Vitro*, v. 21, p. 521-526, 2007.

VENTURIERI G. C.Criação de abelhas indígenas sem ferrão. Belém, Embrapa
Amazônia Oriental. 2008.

WANG, X.Q., HAN, F., YANG, M.F., YANG, P.F., SHEN, S.H. Exploring the
response of rice (*Oryza sativa*) leaf to gibberellins: a proteomic strategy. *Rice* 6. 2013

WHITING, P. Multiple alleles in complementary sex determination in *Habrobracon*.
Genetics, v. 24. P. 110-111, 1943.

WILKINS, M.R., Appel, R.D., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., 2007. *Proteome
Research. Concepts, Technology and Application*, second ed. Springer, Heidelberg.

WILKINS, M.R., Appel, R.D., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., 2007. *Proteome
Research. Concepts, Technology and Application*, second ed. Springer, Heidelberg.

WILSON, E. O. & Hölldobler, B. Eusociality: origin and consequences. *PNAS*, 102
(38):13367-13371. 2005.

WINSTON, M.L.. *A biologia das abelhas*. Porto Alegre, Magister, pp 276. 2003.

XIMENES, L. J. F. Manejo Racional de Abelhas Africanizadas e de Meliponíneos no
Nordeste do Brasil.. (Série BNB Ciência e Tecnologia, 06). Fortaleza, CE: Banco do
Nordeste do Brasil, 386 p.2011.

YATES, J.R. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. *Journal of Mass
Spectrometry*, 33: 1-19. 1998.

YU, Y.Y., Pan, X.W., Ding, Y., Liu, X.H., Tang, H.L., Shen, C.P., Shen, H.L., Yang,
P.Y., 2013. An iTRAQ based quantitative proteomic strategy to explore novel
secreted proteins in metastatic hepatocellular carcinoma cell lines. *Analyst* 138,
4505e4511