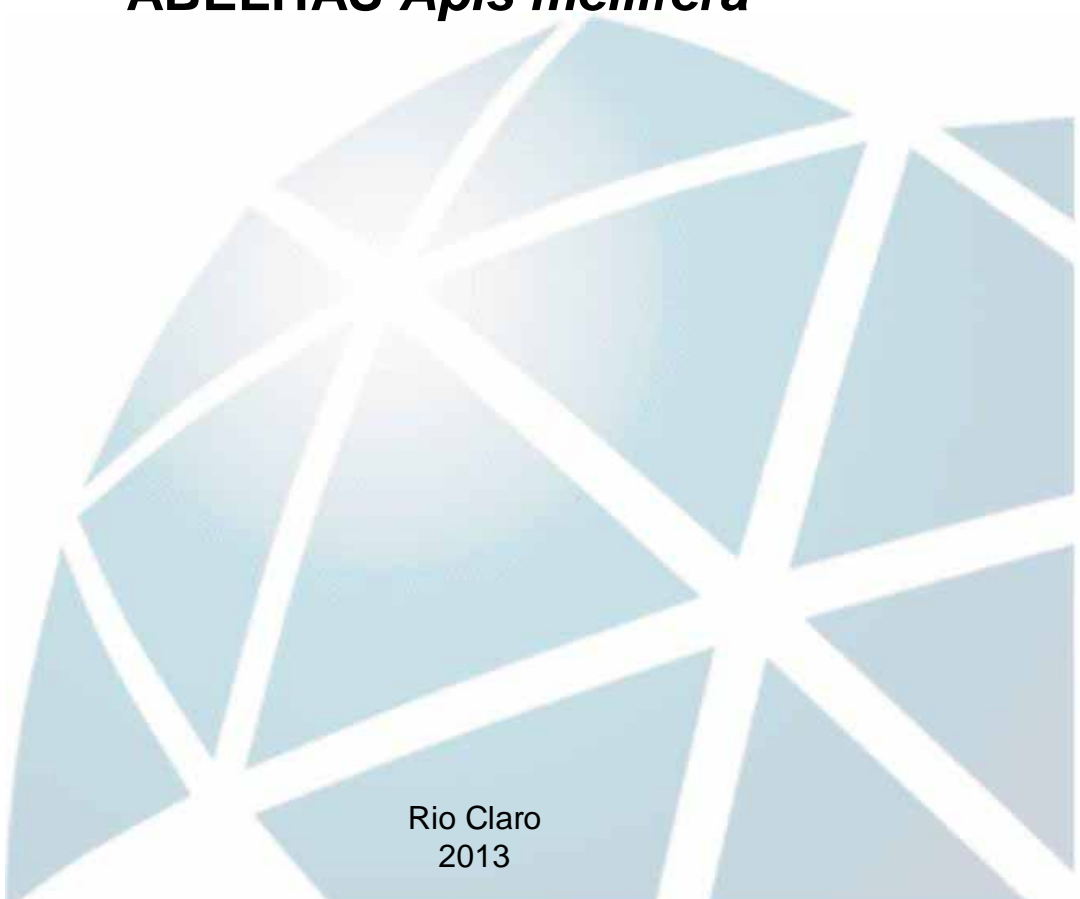

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NOTURNO

DIEGO SIMÕES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA
ANALÍTICA PARA ANÁLISE QUALITATIVA E
QUANTITATIVA DE PEPTÍDEOS DE CÉREBROS DE
ABELHAS *Apis mellifera***



Rio Claro
2013

DIEGO SIMÕES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA ANALÍTICA PARA
ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE PEPTÍDEOS DE
CÉREBROS DE ABELHAS *Apis mellifera*

Orientador: PROF DR MARIO SERGIO PALMA

Co-orientador: DR PAULO CESAR GOMES

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

Rio Claro
2013

595.799 Santos, Diego Simões dos
S237d Desenvolvimento de uma plataforma analítica para análise
qualitativa e quantitativa de peptídeos de cérebros de abelhas
Apis mellifera / Diego Simões dos Santos. - Rio Claro, 2013
41 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Mario Sergio Palma

Coorientador: Paulo Cesar Gomes

1. Abelha. 2. Neuropeptídeos. 3. Cromatografia líquida de
alta performance. 4. Espectrometria de massas. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Por meio deste espaço buscarei lembrar-me de todas as pessoas que fizeram parte de minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, perdoem-me as que forem esquecidas injustamente, agradecimentos são complicados...

Agradeço primeiramente à minha família. Agradeço especialmente à minha mãe, ao Luis e aos meus avós Luiz Antônio e Sueli; espero que saibam o quanto sou ciente de ser uma pessoa privilegiada por ter nascido em uma família tão incrível.

Agradeço à minha namorada Annelise, que nunca desistiu de mim (mesmo eu sendo uma pessoa tão chata) e sempre me apoiou e me ajudou com todas as forças possíveis, sem nunca ter poupado esforço algum.

Agradeço ao meu orientador Mario Sergio Palma, um grande homem, que me fez compreender valores que antes eu não entendia, que sempre me surpreendeu com ensinamentos diferentes quase todos os dias e que sempre me estendeu a mão para me ajudar em momentos de dificuldade. E ao Paulo, que com muita paciência me coorientou, ajudou-me e compartilhou comigo momentos de alegria e decepção.

Aos meus companheiros de laboratório Marcela, Nath, Bibi, Fernando, Kenny, Marcel, Anally, Beto, Ana Maria e Franciele pelos momentos de descontração e pelas conversas. E também ao Eduardo, no qual encontrei um verdadeiro amigo.

Ao Serjão, este trabalho não teria sido realizado sem a experiência e maestria de uma pessoa como ele.

Ao Kiko e ao Max que me deram aquele tipo de amor que só um animal de estimação pode dar.

Aos meus parceiros(as) Socorro, Pedrinho, Tiziu, Vakão, Samuel (que agora está longe) e Letícia.

Aos meus eternos amigos/irmãos Fábio, Renata, Dani, Cambiaghi, Nocilli, Gabi, André e Flávio pela confiança, lealdade e irmandade; por mais que o destino nos leve pra longe, vocês estarão vivos em minha memória pelo resto da minha vida.

À Necis que sempre está presente para o que der e vier.

Agradeço a todos os docentes, alunos e funcionários do CEIS pelas eventuais ajudas.

Agradeço a todos os professores, inclusive os que já não estão mais entre nós; todos me influenciaram positivamente e me ajudaram a ser a pessoa que sou hoje. Diferente de dinheiro e outros bens materiais, o conhecimento adquirido nunca nos é tirado.

Saibam que sou produto de todos vocês. Muito obrigado!

*“Não abandones as tuas ilusões. Sem elas podes
continuar a existir, mas deixas de viver.”*

(Mark Twain)

RESUMO

As abelhas da espécie *Apis mellifera* são conhecidas por sua organização social, comportamento devotado e aparente complexidade comportamental, sendo também consideradas excelentes sistemas-modelo para estudos de comunicação, aprendizado e formação de memória. Uma vez que o comportamento social dos insetos é resultante de interações complexas em diferentes níveis de organização biológica, torna-se importante estudar os peptídeos envolvidos nesse processo, já que estes são indispensáveis em muitos processos fisiológicos, funcionando como neurotransmissores, hormônios, toxinas, antibióticos, defensinas, neuromoduladores e neurohormônios. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi padronizar uma metodologia analítica visando à determinação do perfil peptídico do cérebro de abelhas da espécie *Apis mellifera* utilizando como ferramentas a espectrometria de massas e a cromatografia líquida. Foram coletadas operárias de *Apis mellifera* com 20 dias de idade, cujos cérebros foram dissecados e devidamente processados visando a posterior separação e identificação dos peptídeos. Foram testadas duas estratégias distintas para a separação e identificação dos peptídeos, denominadas on-line e off-line. Ambas baseavam-se na utilização de um sistema de cromatografia líquida sob fase reversa e um espectrômetro de massas do tipo electrospray/Ion Trap-Time of Flight, mas na primeira essas ferramentas estavam acopladas, enquanto na segunda os dois processos foram realizados separadamente. Tais procedimentos permitiram identificar 19 peptídeos pertencentes às principais famílias de neuropeptídeos de cérebros de abelhas já descritos na literatura, entre elas as Allostatina, Apidaecina, Corazonina e Taquicininas. Os resultados obtidos indicam que a estratégia off-line foi melhor em comparação à estratégia on-line, devido à possibilidade de se trabalhar com cada fração obtida separadamente para as análises espectrométricas, resultando em melhores espectros MS e MSMS. Sendo assim, tal metodologia mostrou-se mais adequada e é apropriada para estudos desta natureza, podendo ser empregada em estudos neuroptidômicos com cérebros de abelhas, que visem correlacionar peptídeos com diferentes comportamentos desses insetos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
2. REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1. Neuropeptídeos	08
2.1.1. Allostatina	08
2.1.2. Taquicinina	09
2.1.3. SIFamida	09
2.1.4. PBAN	10
2.1.5. FMRFamida e Miossupressina	10
2.1.6. IDLSRFYGHFNT	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Animais	13
4.2. Extração dos peptídeos	13
4.3. Estratégia On-Line	13
4.4. Estratégia Off-Line	14
4.4.1. Cromatografia em sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	14
4.4.2. Análise por Espectrometria de Massas	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1. Estratégia On-Line	16
5.2. Estratégia Off-Line	19
5.2.1. Análises Cromatográficas	19
5.2.2. Espectrometria de Massas	20
5.2.2.1. Análises MS.....	20
5.2.2.2. Análises MSMS	22
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* são conhecidas por sua notória organização social e comportamento devotado e aparentemente complexo dos indivíduos. Uma colônia de abelhas se divide em três castas: a fêmea fértil, a “rainha”; numerosas fêmeas estéreis, as “operárias”; e os machos, os “zangões”. Dentro do grupo de operárias destacam-se algumas abelhas que se tornam guardiãs depois de terem completado as tarefas de ninho e antes de começarem a coletar alimento (FREE, 1980). Para compreensão do comportamento agressivo das abelhas guardiãs de *A. mellifera*, é necessário entender que o ninho destes animais contém estoques de mel e de pólen e frequentemente uma abundância de cria, atraindo a atenção de saqueadores. Assim, o comportamento defensivo que as guardiãs demonstram é de total importância para a sobrevivência da colônia (FREE, 1980).

O comportamento social dos insetos é resultante de interações complexas em diferentes níveis de organização biológica. Genes originam proteínas e peptídeos que formam os sistemas musculares e nervosos, os quais regulam sua própria síntese e interagem entre si afetando o comportamento dos indivíduos (PAGE et al., 2002). Desta forma, o cérebro das abelhas tem sido considerado como ótimo sistema-modelo para estudos de comunicação, aprendizado e formação de memória (PREDEL et al., 2007).

Os peptídeos são importantes em muitos processos fisiológicos, funcionando como neurotransmissores, hormônios, toxinas, antibióticos, defensas, neuromoduladores e neuro-hormônios (LENT, 2005; BROCKMANN et al., 2009; PALMA, 2010). Neuropeptídeos são reguladores-chave em quase todos os eventos fisiológicos, ocupando uma alta posição hierárquica na coordenação desses eventos e estão envolvidos em processos relacionados ao comportamento em geral. Algumas famílias de neuropeptídeos de cérebros de abelhas têm sido descritos, entre eles a Allostatina (inibe produção de hormônio juvenil e inibe a ingestão de alimentos); Apidaecina (antimicrobiano); Corazonina (cardioativo); e um grupo mais abundante de peptídeos da família das Taquicininas, entre outros (PREDEL et al., 2007; BOERJAN et al., 2010).

A peptidômica é definida pela análise do conjunto de peptídeos encontrados no interior de organismos, tecidos, e células. Em contraste com dados de outras plataformas “ômicas”, como a genômica, a peptidômica pode fornecer dados precisos sobre processos fisiológicos ocorrentes no organismo. Os diferentes processos fisiológicos podem ser relacionados a diferentes perfis peptídicos, tanto qualitativos quanto quantitativos (HERRERO et al., 2008).

O presente projeto visou criar uma plataforma para o estudo do perfil peptídico da abelha *A. mellifera* com as ferramentas da peptidômica. Foram utilizadas as técnicas de cromatografia líquida para purificação da porção peptídica do cérebro da abelha e espectrometria de massas para elucidação e identificação dos peptídeos presentes nas amostras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuropeptídeos

Vários mensageiros químicos são produzidos e liberados pelos neurônios de insetos, sendo que tais substâncias podem ser quimicamente agrupadas em acetilcolina, aminas biogênicas, aminoácidos e peptídeos. Dentre esses, enfatiza-se os peptídeos, também conhecidos como neuropeptídeos, os quais são sintetizados no soma celular e transportados até pontos de liberação ao longo do axônio (CHAPMAN, 1998).

Neuropeptídeos em insetos agem como neuromodulares nos sistema nervoso periférico e central e como hormônios regulatórios lançados na circulação. Desta forma, podem estar envolvidos em uma miríade de processos como regulação da homeostase, organização de comportamentos, iniciação e coordenação de processos desenvolvimentares e modulação da atividade neuronal e muscular (NÄSSEL, 2002). Dentre a grande variedade de peptídeos descritos, alguns se destacam por sua detectabilidade e abundância em abelhas.

2.1.1 Allostatina

As allostatinas são consideradas uma família ubíqua de peptídeos em invertebrados, cuja função esta relacionada a regulação de vários processos fisiológicos importantes como a inibição da função endócrina, funções interneuronais, papéis neuromodulatórios, miomodulatórios e mioendócrinos, além da ação direta em retas biossintéticas (BANDENA et al., 2006).

As allostatina são membros da família 'FGLa', cuja sequência que dá nome à família é o C-terminal comum a todos os membros (COAST et al., 2011; WOODHEAD et al., 1989). Hoje são compreendidos mais de 400 peptídeos da família FGLa/Allostatinas (HULT et al., 2008), atuando em outras numerosas ações biológicas, incluindo atividade miotrópica, atividade enzimática no intestino e atuando também como neurotransmissores.

Peptídeos análogos a allostatina do tipo C foram identificados inicialmente somente em insetos holometábolos, sendo posteriormente encontrados também em lagosta, embora nesse caso com modificações estruturais como ausência de bloqueio N-terminal por piroglutamina e amidação C terminal. Em tais crustáceos, o peptídeo SYWKQCAFNAVSCFamida está fisiologicamente relacionado a modulação do circuito neural presente no gânglio estomatogástrico e tem também foi observada atividade deste sobre o ritmo cardíaco em *H. americanos* (DICKINSON et al., 2009).

Alatostatinas relacionadas à inibição da síntese de hormônio juvenil na corpora alata foram isoladas do cérebro de fêmeas virgens da espécie de barata *Diploptera punctata*. Uma das alatostatinas identificadas em tal estudo foi capaz de inibir a síntese de hormônio juvenil na corpora alata de fêmeas acasaladas e larvas de último instar de *D. punctata* e também na corpora alata de fêmeas adultas de baratas da espécie *Periplaneta americana* (WOODHEAD et al., 1989).

Da mesma forma que em muitas outras espécies, em abelhas os peptídeos da família das alatostatinas têm função inibitória (KREISSL et al., 2010). Além disso, diferenças quantitativas significativas relativas a peptídeos precursores da alatostatina C foram encontradas entre cérebros de abelhas forrageadoras de néctar e de pólen. (BOERJAN et al., 2010).

2.1.2 Taquicinina

As taquicininas são uma família constituída de peptídeos multifuncionais e estruturalmente variados presentes em sistemas nervosos, tratos intestinais, e vários outros tecidos de diversos organismos vertebrados e invertebrados. Os primeiros peptídeos de insetos com similaridade às Taquicininas foram identificados no gafanhoto *Locusta migratória* em 1990 (SCHOOFS et al., 1990). Takeuchi et al. (2003) encontraram um neuropeptídeo em *A. mellifera* relacionado à taquicinina de insetos, o qual expressou-se de forma significativamente diferente entre as diferentes castas, sugerindo função neuromoduladora ou hormonal associada à divisão do trabalho, sexo ou idade-específica. Os resultados sugeriram que AmTRP está envolvido em comportamentos específicos da fêmea como cuidado com a prole (enfermeira), forrageamento e ovoposição e também com fisiologias específicas como estímulo de secreção nas glândulas exócrinas.

As taquicininas foram o grupo de peptídeos mais abundantemente encontrados por Boerjan et al. (2010) no gânglio frontal de abelhas, cuja função está relacionada a regulação alimentar (AUDSLEY; WEAVER, 2009). Foram encontradas diferenças quantitativas significativas de taquicinina entre cérebros de forrageadores de néctar e de pólen (BOERJAN et al., 2010).

2.1.3 SIFamida

Peptídeos do tipo SIFamida possuem estrutura muito conservada entre os insetos holometábolos (VERLEYEN et al., 2004). Tais peptídeos são miotrópicos, agem, portanto sobre os músculos, estando relacionados a contração do intestino grosso e de ovidutos

(VERLEYEN et al., 2004). Adicionalmente, estudo realizado por Tarhaz et al. (2007) revelou que tal peptídeo tem efeitos que relacionam-se a modulação do comportamento sexual de *Drosophila*; quando a expressão de tais peptídeos foi bloqueada por meio de RNA de interferência, obteve-se machos que faziam corte indiscriminada direcionada para indivíduos de qualquer sexo e fêmeas sexualmente hiper-receptivas. Os padrões de imunorreatividade de tais peptídeos no cérebro também remetem a um papel neuromodulatório, combinando entrada de informações visuais, táteis e olfatórias (VERLEYEN et al., 2009).

2.1.4 PBAN

Peptídeos do tipo neuropeptídeo ativador da biossíntese de feromônio (PBAN), são conhecidos por serem produzidos no gânglio subesofágico (RAINA; KLUN 1984) e age diretamente sobre as glândulas de feromônios estimulando a biossíntese de feromônios (RAFAELI, 2002). Em estudos com *Lepidoptera*, foi constatado que peptídeos do tipo PBAN estão relacionados à indução da melanização cuticular em larvas (MATSUMOTO et al., 1990) e estímulo da produção de feromônios sexuais em adultos (ALTSTEIN et al., 1996), sendo que esta última pode ocorrer por várias rotas distintas (TEAL et al., 1996). Outros estudos demonstraram outras funções relacionadas a essa família de peptídeos, como estimula da contração muscular no intestino de baratas (HOLMAN et al., 1986), indução da diapausa embrionária em *Bombyx mori* (IMAI et al., 1991) e aceleração da formação de pupa em mosquitos (ZDAREK et al., 1997).

2.1.5 FMRFamida e Mioressupressina

O grupo de peptídeos FMRFamida, em abelhas, está distribuído em diversas áreas da neurópila, embora a sua presença possa ser atribuída a um número relativamente pequeno de neurônios, estando igualmente distribuído no corpo central de abelhas, sugerindo que tal grupo de peptídeos possa estar envolvido em diversos contextos funcionais. Foi encontrado em diferentes tipos de neurônios e também em células neuroendócrinas (SCHÜRMAN; ERBER, 1990 PREDEL et al., 2007)

A família das mioressupressinas parece estar restrita a insetos e crustáceos, sendo inicialmente sequenciadas como RFamida extendidas no N-terminal que tinham a propriedade de inibir contrações espontâneas no intestino posterior de *Leucophaea maderae* (ORCHARD; LANGE, 2013). Mioressupressinas pertencem a um grupo grande e estruturalmente diverso de peptídeos relacionado a FMRFamida (FaRPs) com efeitos múltiplos (NÄSSEL, 2002).

São amplamente conhecidas como inibidores de músculos viscerais, como intestino anterior, posterior, oviduto, coração e túbulos de Malpighi (LANGE et al., 1991; ORCHARD et al., 2001; SKONIECZNA; ROSINSKI, 2004). Adicionalmente, foi demonstrado que miossupressinas inibem a liberação de hormônios adipocinéticos da corpora cardíaca (VULLINGS et al., 1998) e estão envolvidas em regulação alimentar em insetos (AUDSLEY; WEAVER, 2009).

No intestino posterior de *L. maderae* VFLRFamida parece ser um centro inibidor da atividade biológica, enquanto no oviduto a amida é crítica tanto para a ligação com o receptor quanto para inibição da atividade biológica. Interessantemente, VFLRFamida é a sequência mínima requerida para a ligação com o receptor enquanto HVFLRFamida é a sequência mínima para atividade biológica inibitória comparável. Dessa forma, os receptores de miossupressina teriam ligação altamente específica (ORCHARD; LANGE, 2013).

Em bioensaios miotrópicos com coleópteros da espécie *Zophobas atratus*, a miossupressina Zopat-MS-2 mostrou capacidade de inibir a frequência de contrações de músculos viscerais, sendo tal efeito mais pronunciado no intestino posterior e menor no ducto ejaculatório, coração e oviduto (MARCINIAK et al., 2011). Peptídeos da família da miossupressina também foram encontrados por Audsley e Weaver (2006) em extratos de cérebro de *A. mellifera*.

2.1.6 IDLSRFYGHFNT

Peptídeos do tipo IDLSRFYGHFNT e suas variações possuem ampla distribuição no sistema nervoso central de abelhas operárias (BOERJAN et al., 2010). Em estudo realizado por Brockmann et al. (2009), tal tipo de peptídeos foi mais abundantes no cérebro de abelhas enfermeiras do que em forrageadoras, e também foi vista maior abundância destes nas abelhas que partiam para o forrageamento em relação as que chegavam, independente do tipo de alimento coletado.

Os precursores de IDLSRFYGHFNT assemelham-se a lipoproteína de *D. melanogaster* e ser RNAm é de 100 a 1000 vezes mais abundante na cabeça de abelhas do que qualquer outro neuropeptídeo transcrito estudado, fazendo de seu precursor um candidato a neuropeptídeo improvável. Além disso, embora o precursor como um todo seja bem conservado entre insetos, a sequência IDLSRFYGHFNT em si é menos preservada, sugerindo que este possa ser um peptídeo espaçador (HUMMON et al., 2006; BOERJAN et al., 2010).

3. OBJETIVOS

O trabalho teve por objetivo utilizar técnicas peptidômicas de separação e identificação, como cromatografia líquida e espectrometria de massas, para a padronização de uma metodologia de estudo do perfil peptídico do cérebro de abelhas da espécie *A. mellifera*, envolvido nos processos de agressividade e cognição. Foram estudados perfis peptídicos dos cérebros de abelhas que apresentaram comportamento agressivo, como também, daquelas que não apresentaram tal comportamento, sendo utilizadas como grupo controle. Desta forma, procurar inferir algo a respeito dos peptídeos envolvidos nestes processos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

As abelhas utilizadas nos testes consistiram de adultas de *A. mellifera* coletadas de uma colônia mantida no apiário do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro. A colônia escolhida apresentava condições fisiológicas normais, livre de doenças e uma rainha em franca postura.

Inicialmente, um favo da colônia livre de abelhas foi coletado e mantido em uma incubadora por 24 horas. Após esse período, todas as abelhas que nasceram foram marcadas com esmalte e devolvidas à colônia de origem e recoletadas após 20 dias, uma vez que a atividade de guarda é executada, frequentemente, com uma idade de 12 a 25 dias de vida (WINSTON, 2003).

A metodologia utilizada foi adaptada do teste de agressividade (Black-Ball) descrito por Stort (1975). Foram estudados dois grupos de abelhas guardiãs: grupo I (controle) foi formado por abelhas não submetidas ao teste de agressividade e o grupo II formado pelas abelhas que apresentaram comportamento agressivo durante o teste. As abelhas foram coletadas e imersas em nitrogênio líquido para devida preservação, após a coleta, tiveram seus cérebros dissecados com a ajuda de lupa e tesoura cirúrgica em presença de inibidor de proteases [fenilmetilsulfonilflúor (PMSF)]. Após dissecados, os cérebros foram transferidos para tubos eppendorf contendo PMSF. Todos os testes e análises foram realizados nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

4.2 Extração dos peptídeos

Os cérebros foram macerados em acetonitrila (MeCN)/água (H₂O) 50% (v/v) com o auxílio de um bastão de vidro para extração da porção peptídica dos cérebros. Depois de macerados, foram centrifugados em uma microcentrífuga de alta rotação 5415D (EPPENDORF) a 8000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante da amostra foi filtrado com a ajuda de seringas descartáveis (SR) acopladas a filtros (MILLEX) com poros de 0,45 µm de diâmetro. As amostras foram liofilizadas, pesadas e armazenadas em freezer -20°C para uso.

4.3 Estratégia On-Line

Foi utilizado um sistema UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) (SHIMADZU) acoplado diretamente (“*on-line*”) ao espectrômetro de massas. As análises cromatográficas

foram realizadas sob gradiente de MeCN de 5 a 95% (v/v), contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) por 95 minutos, utilizando-se uma coluna XBrigde™ BEH300 C18 (2,1x100mm; 3,5 µm) (Waters). A eluição dos componentes foi monitorada por absorbância ultravioleta a 214 nm, com fluxo de 0,2 mL/min.

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização “*electrospray*” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas “*Ion Trap*” e “*Time-of-Flight*” (IT-ToF) (SHIMADZU). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento. Durante toda a análise a temperatura da “*Curved Dissolvation Line*” (CDL) e da interface foi mantida a 200° C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/min. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 200 a 2500, com uma resolução de aproximadamente 15000.

As análises de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica em condições de Dissociação Induzida por Colisão (CID) (MS^2) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS^1 , exceto a varredura que foi feita num intervalo entre 50 e 2500 m/z . Foi utilizado argônio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. O software *LCMS solution* (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. A rotina descrita por Cantú et al. (2008) foi utilizada para a interpretação dos espectros de massas obtidos.

4.4 Estratégia Off-Line

4.4.1 Cromatografia em sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

O fracionamento da porção peptídica foi realizado por cromatografia líquida sob fase reversa num gradiente de 5 a 95% de solução B (MeCN) a um fluxo de 2 mL/min por 90 minutos. Foi utilizado um sistema HPLC modelo LC-10AD (SHIMADZU), constituído de um detector de luz ultravioleta modelo SPD-10A, equipado com duas bombas (A e B) LC-10AD, injetor Rheodyne modelo 7725i e “loop” de 500µL, sistema controlador modelo SCL-10A (SHIMADZU) e coluna semipreparativa C-18 (10 x 250mm, 5µm) (SHISEIDO). Para a fase móvel foram utilizados dois solventes, solvente A [H₂O contendo 0,1% TFA (v/v)] e solvente B [MeCN 100% contendo 0,1% TFA (v/v)]. A eluição das frações foi monitorada

por medidas de absorção luz ultravioleta em 214 nm. O controle de aquisição de dados foi feito através do software *LCSolution*.

4.4.2 Análise por Espectrometria de Massas

As frações obtidas por cromatografia líquida de alta performance foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo IT-ToF, sob os mesmos parâmetros e condições descritos anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram investigados até o momento os peptídeos pertencentes às principais famílias de neuropeptídeos já descritos em literatura (BOERJAN et al., 2010).

5.1 Estratégia On-Line

Foram coletadas, no total, 39 abelhas para a dissecação do cérebro, onde 24 abelhas eram do grupo II (teste de agressividade) e 15 do grupo I (controle). Foram utilizados 300 µg de cada grupo (I e II) para análise no sistema LCMS-IT-ToF. Os espectros obtidos foram analisados com as ferramentas do software *LCMS Solution*. Um exemplo da identificação através da metodologia aplicada pode ser visualizada na **figura 1 A-C** (resultados obtidos do grupo I). A **figura 1A** apresenta o cromatograma UV obtido do fracionamento da porção peptídica dos cérebros de abelhas *A. mellifera*. Na **figura 1B** são apresentados os cromatogramas de íons totais (TIC). Na **figura 1C** são apresentados os cromatogramas de íons individuais de alguns dos principais peptídeos identificados por LCMS/MS em cada intervalo de tempo e suas famílias e massas correspondentes de acordo com a literatura. Desta forma, é possível localizar a fração na qual se encontra o peptídeo pelo seu tempo de retenção. Na **tabela 1** são apresentados os resultados MS obtidos através da estratégia on-line com os peptídeos identificados, suas famílias, massas, sequências e grupos correspondentes e na **figura 2** está representado um Diagrama de Venn demonstrando a presença, ou não dos peptídeos identificados nas amostras dos grupos I e II.

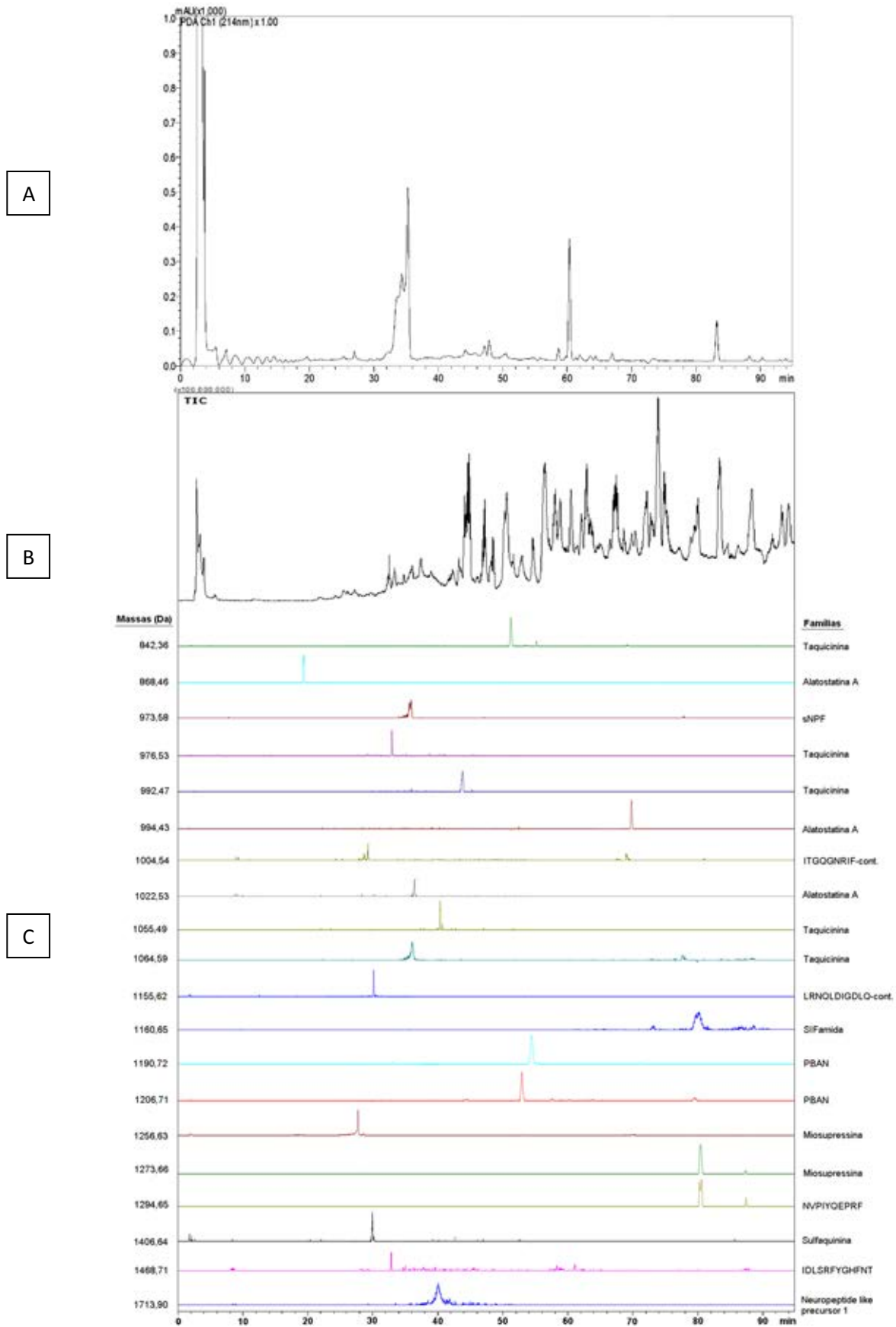


Figura 1: Análise on-line em sistema LCMS-IT-ToF: A) Cromatograma UV; B) Cromatograma de íons totais (TIC); C) Cromatogramas de íons individuais com a identificação das massas moleculares e as famílias pertencentes dos peptídeos já descritos na literatura.

Tabela 1: Peptídeos identificados pela estratégia online, apresentados por suas famílias, massas, sequências e grupos correspondentes.

Peptídeos identificados			Peptídeos presentes em cada grupo (x)	
Família	Massas	Sequência	Grupo I	Grupo II
<i>Alatostatina A</i>	868,46	RQYSFGLa	x	
	994,43	AYTYVSEY	x	
	1022,53	GRQPYSFGLa	x	
<i>Taquicinina</i>	842,36	APMGFYGT	x	x
	976,53	ALMGFQGVRa		x
	992,47	APMGFQGMRa	x	x
	1055,49	APMGFYGTRG		x
	1064,59	SPFRYLGARa	x	
<i>sNPF</i>	973,58	SPSLRLRFa	x	x
<i>ITGQGNRIF-cont.</i>	1004,54	ITGQGNRIF	x	x
<i>PBAN</i>	1190,72	IYLPLFASRLa	x	
	1206,71	RVPWTPSPRLa	x	
<i>Miossupressina</i>	1256,63	pQVDVHVFLRFa		x
	1273,66	QVDVHVFLRFa	x	-
<i>SIFamida</i>	1160,65	RKPPFNGSIFa		x
<i>LRNQLDIGDLQ-cont.</i>	1155,62	LRNQLDIGDL		x
<i>IDLSRFYGHFNT</i>	1468,71	IDLSRFYGHFNT	x	
<i>NVPIYQEPRF</i>	1294,65	GYPYQHRLVY	x	
<i>Neuropeptide like precursor 1</i>	1713,9	SVSSLARTGDLPVREQ	x	
<i>Sulfaquinina</i>	1406,64	pQQFDDYGHLRFa		x

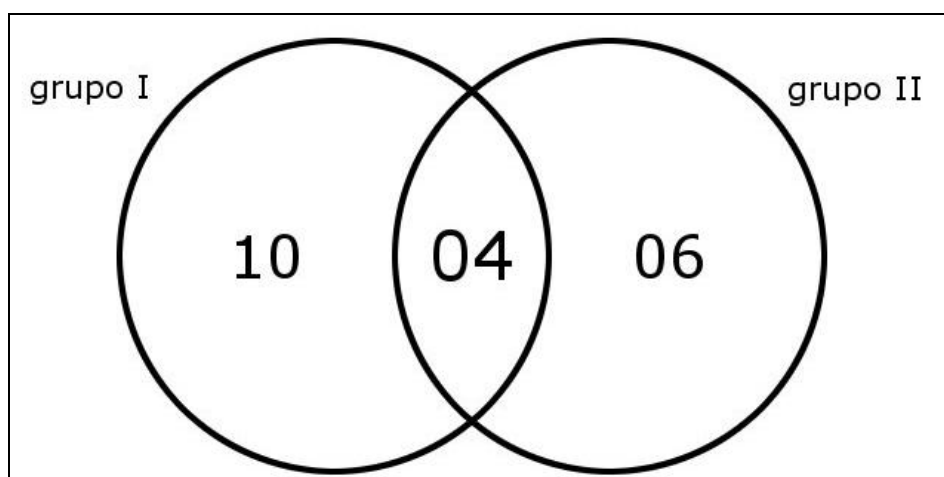


Figura 2: Diagrama de Venn demonstrando o número de peptídeos comuns e não comuns identificados nas amostras dos grupos I e II.

Pela tabela 1 e pelo diagrama de Venn pode-se observar os peptídeos comuns entre os dois grupos, bem como aqueles cuja a ocorrência foi influenciada pelo experimento de agressividade.

5.2 Estratégia Off-Line

Para a estratégia off-line foram coletadas um total de 100 abelhas para a dissecação dos cérebros e extração dos peptídeos, o que resultou em 49,1 mg de amostra.

5.2.1 Análises Cromatográficas

A cromatografia da porção peptídica foi realizada em sistema HPLC sob fase reversa, as frações foram manualmente coletadas em intervalos de tempo de 8 regiões distintas, como apresentado na **figura 3**.

As frações foram coletadas em tubos falcon de 50 mL, liofilizadas, pesadas e mantidas em freezer -20 °C até o uso.

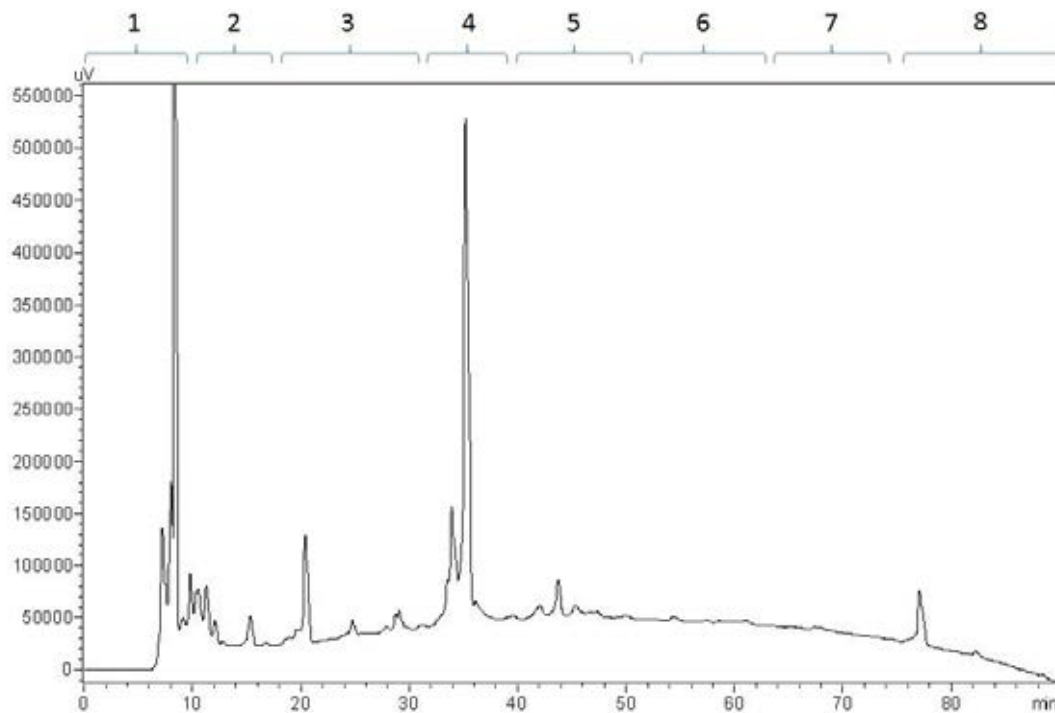


Figura 3: Perfil cromatográfico obtido do fracionamento da porção peptídica dos cérebros de abelhas *A. mellifera* em um sistema HPLC sob fase reversa, num gradiente de 5 a 95% de acetonitrila em coluna semipreparativa C-18 (10 x 250mm, 5 μ m) com a identificação das 8 frações coletadas.

A **tabela 2** apresenta as quantidades finais obtidas das frações coletadas.

Tabela 2: Quantidades finais obtidas de cada fração coletada.

Fração 1	36,2 mg
Fração 2	0,2 mg
Fração 3	1,0 mg
Fração 4	1,2 mg
Fração 5	0,9 mg
Fração 6	0,1 mg
Fração 7	0,0 mg
Fração 8	0,3 mg

Foi observado que a fração 1 apresentou 90,7% do material obtido da extração, sendo que a sua maioria corresponde a compostos de baixa massa molecular não peptídicos.

5.2.2 Espectrometria de Massas

5.2.2.1 Análises MS

Para a análise por espectrometria de massas, foram aplicados 300 μg de cada fração coletada. Na **tabela 3**, pode-se observar as massas dos peptídeos identificados e suas frações correspondentes e na **tabela 4** estão representados os peptídeos identificados, suas famílias, massas e sequências de AA correspondentes.

Tabela 3: Massas dos principais peptídeos identificados e suas frações cromatográficas correspondentes.

Frações	1	2	3	4	5	6	7	8
	1050,47	842,33	842,34	842	842,72	*	*	
	1055,49	992,41	868,37	868	920,13			868,46
		1050,66	920,46	912,45	1008,76			912,45
		1106,67	973,53	920,51	1050,68			994,43
		1162,7	992,41	992,47	1106,67			1050,47
		1273	994,36	994,43	1162,6			1106,55
		1294,52	1008,5	1050,47	1294,52			1162,66
		1322,73	1050,4	1055,49	1396,76			1254,58
			1060,62	1101,63	1455,58			1294,65
			1106,7	1106,55	1646,94			1396,72
			1162,46	1148,67	1713,96			
			1206,62	1187,63	2421,24			
			1254,78	1190,58	2447,34			
Massas			1294,53	1206				
			1396,76	1254,58				
			1972,96	1256,63				
				1261,65				
				1273,66				
				1283,68				
				1294,65				
				1359,77				
				1468,71				
				1605,79				
				1693,82				
				2181,13				
				2406,19				
				3040,39				

* Quantidade insuficiente de material para análise.

Tabela 4: Peptídeos identificados apresentados de acordo com suas famílias, massas e sequências de AA correspondentes.

Família	Massas	Sequência
<i>Alatostatina A</i>	868,46	RQYSFGLa
	912,45	GRDYSFGLa
	920,51	LPVYNFGla
	994,43	AYTYVSEY
	2181,13	AYTYVSEYKRLPVYNFGla
<i>Taquicinina</i>	842,36	APMGFYGT
	992,47	APMGFQGMRa
	1008,38	ASFDDEYY
	1055,59	APMGFYGTRG
	1060,52	ARMGFHGMRa
	1106,55	GVMDFQIGLQ
	1187,63	SLEEILDEIK
<i>Short Neuropeptide F (sNPF)</i>	1972,97	NSIINDVKNELFPEDIN
	973,58	SPSLRLRFa
<i>ITGQGNRIF-cont.</i>	2447,2	SDPHLSILSKPMSAIPSYKFDD
	1004,54	ITGQGNRIF
<i>Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN)</i>	1050,6	VPWTPSPRLa
	1101,63	QITQFTPRLa
	1190,72	IYLPFASRLa
	1206,71	RVPWTPSPRLa
	1693,82	TSQDITSGMWFGPRLa
<i>Periviscerokinin-like (CAPA)</i>	1148,67	AFGLLTYPRLa
<i>Apidaecina-1</i>	1162,66	PVYIPQPRPP
<i>IDLSRFYGHFNT</i>	1254,58	DLSRFYGHFN
	1468,71	IDLSRFYGHFNT
<i>Miossupressina</i>	1256,63	pQDVDHVFLRFa
	1273,66	QDVDHVFLRFa
<i>NVPIYQEPRF</i>	1261,65	NVPIYQEPRF
	1294,65	GYPYQHRLVY
<i>LRNQLDIGDLQ – Alatostatina C</i>	1283,68	LRNQLDIGDLQ
<i>Corazonina</i>	1322,57	pQTFTYSHGWTNa
<i>TWKSPDIVIRFa - FMRFa-like</i>	1359,77	TWKSPDIVIRFa
	2421,29	SVLTTLKTDGGLRIFKDAPNEF
<i>Neuropeptide like precursor 1</i>	1396,72	NVGSVAREHGLPYa
	1713,9	SVSSLARTGDLPVREQ
	2406,19	NIASLMRDYDQSRENRVPPa
	3040,39	SIATLAKNDDLPISLHDRMAENEDDEE
<i>MVPV</i>	1455,75	VPVPVHHMADELL
<i>Orcoquinina</i>	1605,79	NLDEIDRVGWSGFV

5.2.2.2 Análises MSMS

As interpretações dos espectros de massas MSMS foram realizadas utilizando a estratégia descrita por Cantú (2008), e as simulações de fragmentação utilizando-se do

software MassLynx. A tabela 5 apresenta os peptídeos cujas sequências de AA foram confirmadas até o momento.

Tabela 5: Peptídeos cuja sequência de aminoácidos foram determinadas por MSMS apresentados de acordo com suas massas, sequências, frações correspondentes e famílias pertencentes.

Massas	Sequências	Frações correspondentes	Famílias
842,34	A P M G F Y G T	CL9-4	<i>Taquicinina</i>
* 868,46	R Q/K Y S F G I/La	CL9-3-4-8	<i>Alatostatina A</i>
* 912,45	G R D Y S F G I/La	CL9-4	<i>Alatostatina A</i>
* 920,51	I/L P V Y N F G I/La	CL9-4	<i>Alatostatina A</i>
973,53	S P S I/L R I/L R Fa	CL9-3	<i>sNPF</i>
992,47	A P M G F Q/K G M Ra	CL9-4	<i>Taquicinina</i>
* 994,43	A Y T Y V S E Y	CL9-4	<i>Alatostatina A</i>
1050,47	V P W T P S P R I/La	CL9-4	<i>PBAN</i>
* 1060,62	A R M G F H G M Ra	CL9-4	<i>Taquicinina</i>
* 1106,67	G V M D F Q I/L G I/L Q/K	CL9-2-3-4-5-8	<i>Taquicinina</i>
1162,66	P V Y I/L P Q/K P R P P	CL9-2-3-5	<i>Apidaecina-1</i>
1187,63	S I/L E E I/L I/L D E I/L Q/K	CL9-4	<i>Taquicinina</i>
1254,58	D I/L S R F Y G H F N	CL9-3-4-8	<i>IDLSRFYGHFNT</i>

* Peptídeos com todos os íons fragmentos identificados.

Foi realizado o estudo de fragmentação para todos os peptídeos da **tabela 5**, abaixo estão apresentados os espectros dos peptídeos e o diagrama de fragmentação.

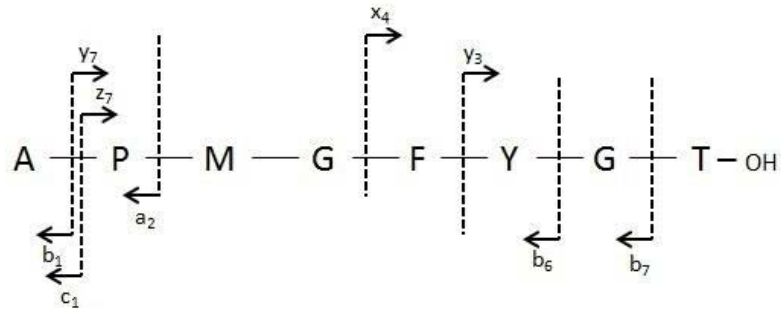
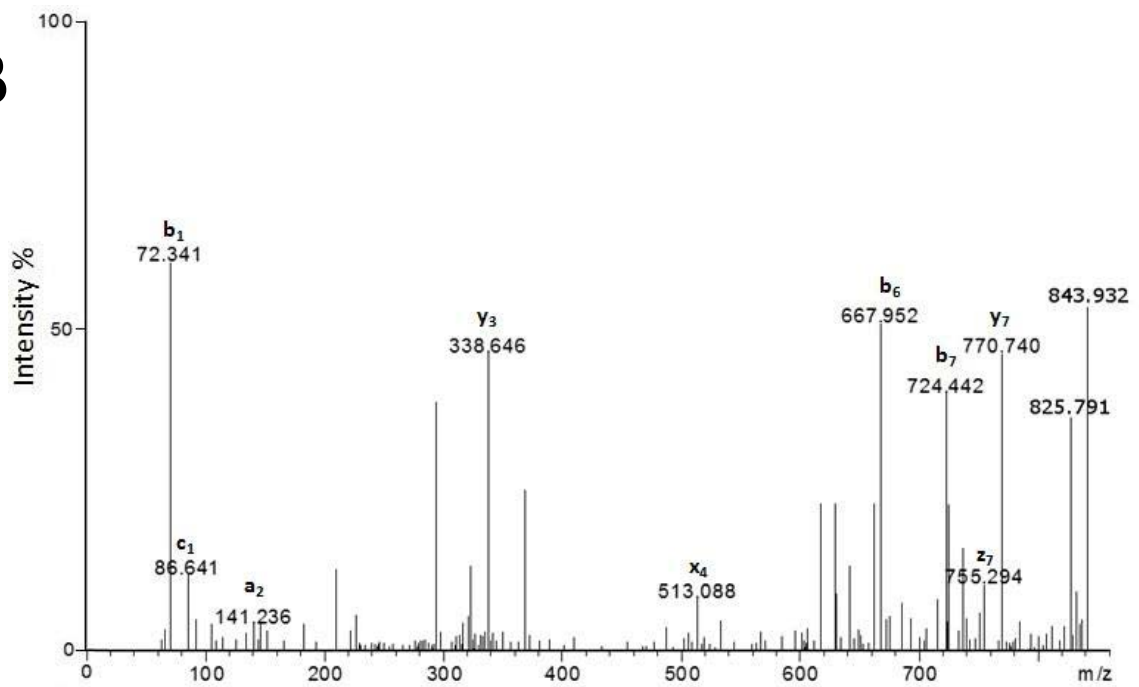
842,34**A****B**

Figura 4: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 843,34 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 72.341 (b₁), 86.641 (c₁), 141.236 (a₂), 338.646 (y₃), 513.088 (x₄), 667.952 (b₆), 724.442 (b₇), 755.294 (z₇) e 770.740 (y₇); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 842,34 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

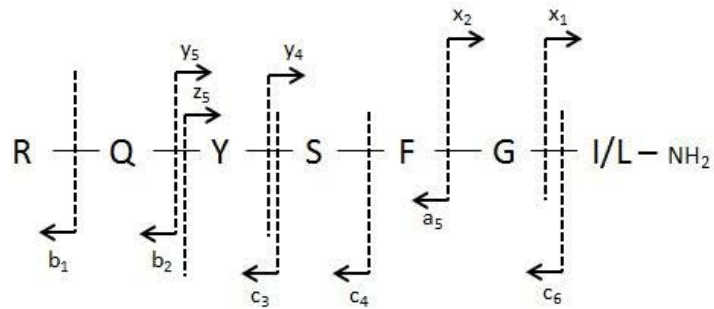
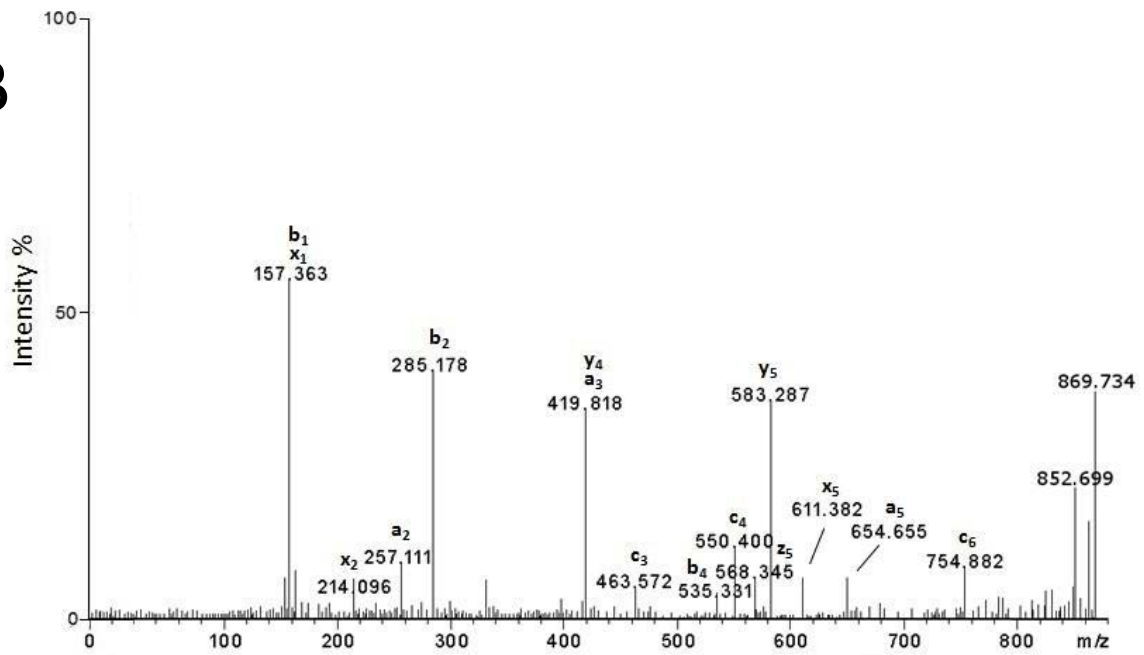
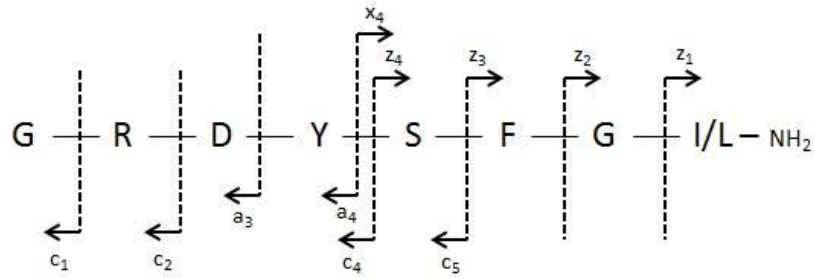
868,46**A****B**

Figura 5: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 869,46 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 157.363 (b₁ e/ou x₁), 214.096 (x₂), 285.178 (b₂), 419.818 (y₄), 463.572 (c₃), 550.400 (c₄), 568.345 (z₅), 583.287 (y₅) e 754.882 (c₆); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 868,46 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

912,45

A



B

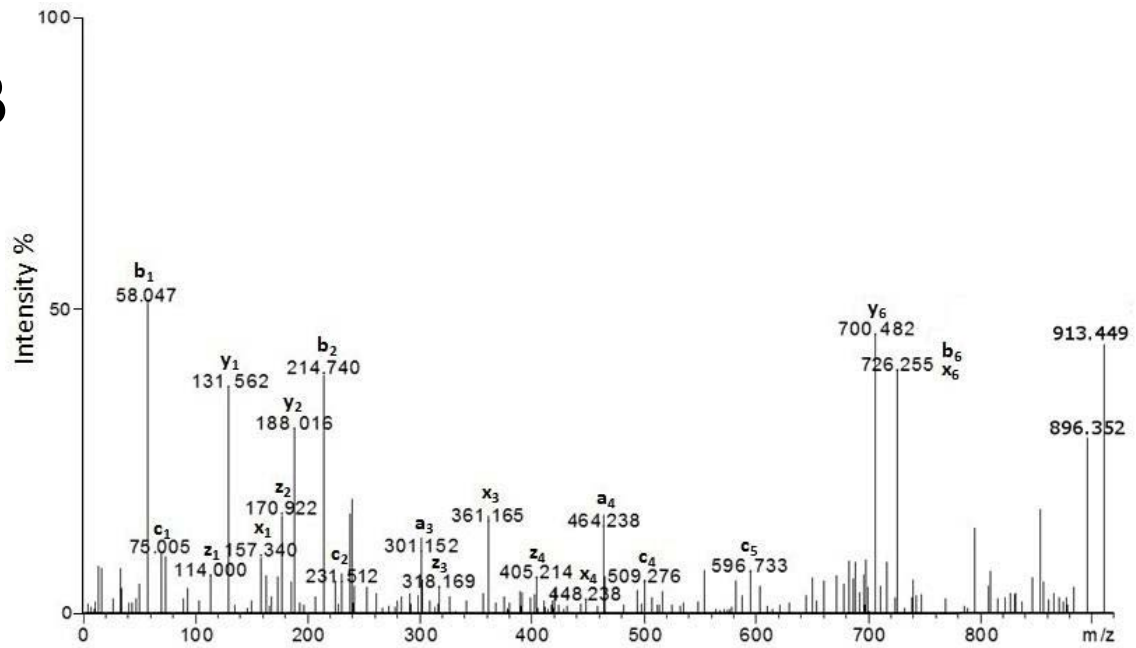


Figura 6: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 913,45 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 75.005 (c_1), 114.000 (z_1), 170.922 (z_2), 231.512 (c_2), 301,152 (a_3), 318,169 (z_3), 405,214 (z_4), 448,238 (x_4), 464,238 (a_4), 509,276 (c_4) e 596,733 (c_5); B) Espectro MS² deconvolvido de massa molecular 912,45 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

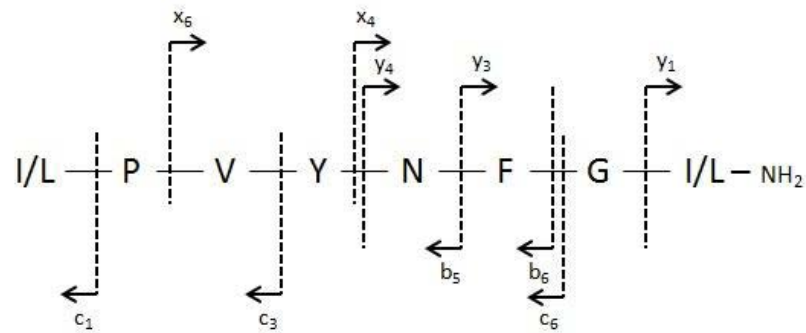
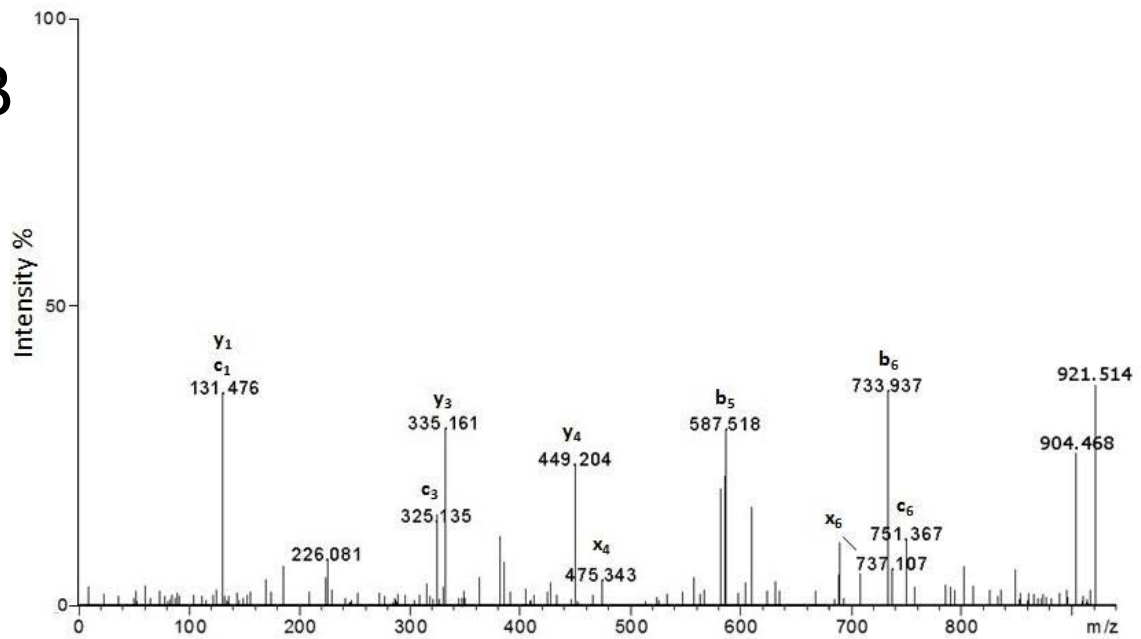
920,51**A****B**

Figura 7: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 921,51 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 131.476 (c₁ e/ou y₁), 325.135 (c₃), 335.161 (y₃), 449.204 (y₄), 475.343 (x₄), 587.518 (b₅), 733.937 (b₆), 737.107 (x₆) e 751.367 (c₆); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 920,51 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

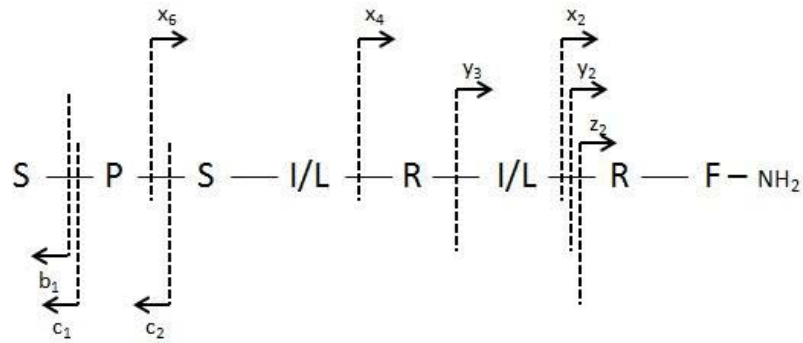
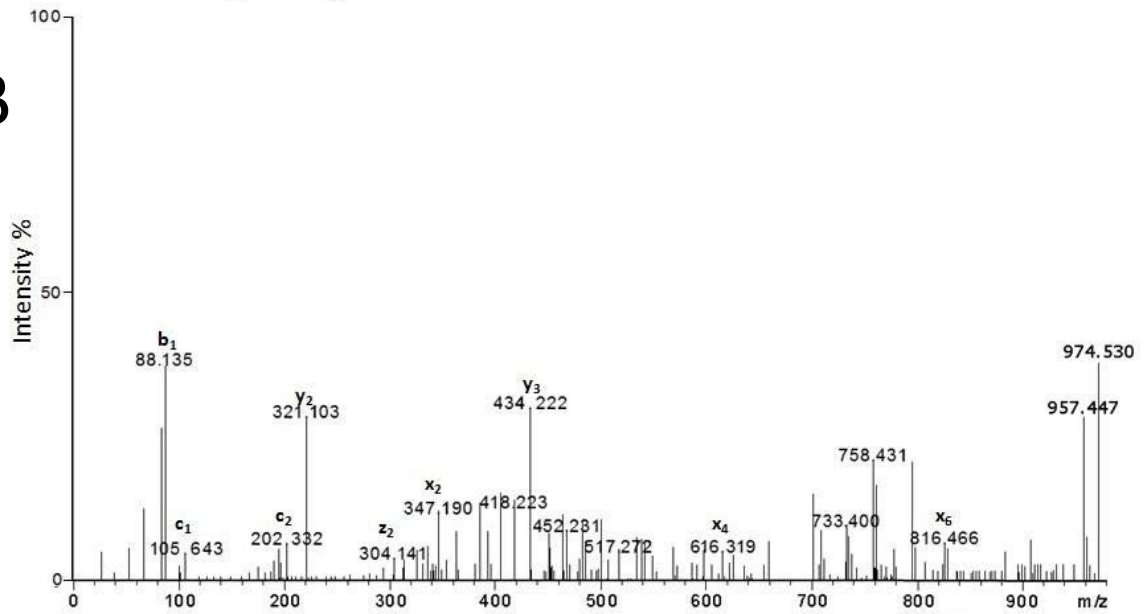
973,53**A****B**

Figura 8: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann, apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 974,53 na forma $[M+H]^+$, sendo eles: 88.135 (b₁), 105.643 (c₁), 202.332 (c₂) 321.103 (y₂), 304.141 (z₂), 347.190 (x₂), 434.222 (y₃), 616.319 (x₄) e 816.466 (x₆); B) Espectro MS² deconvolvido de massa molecular 973,53 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

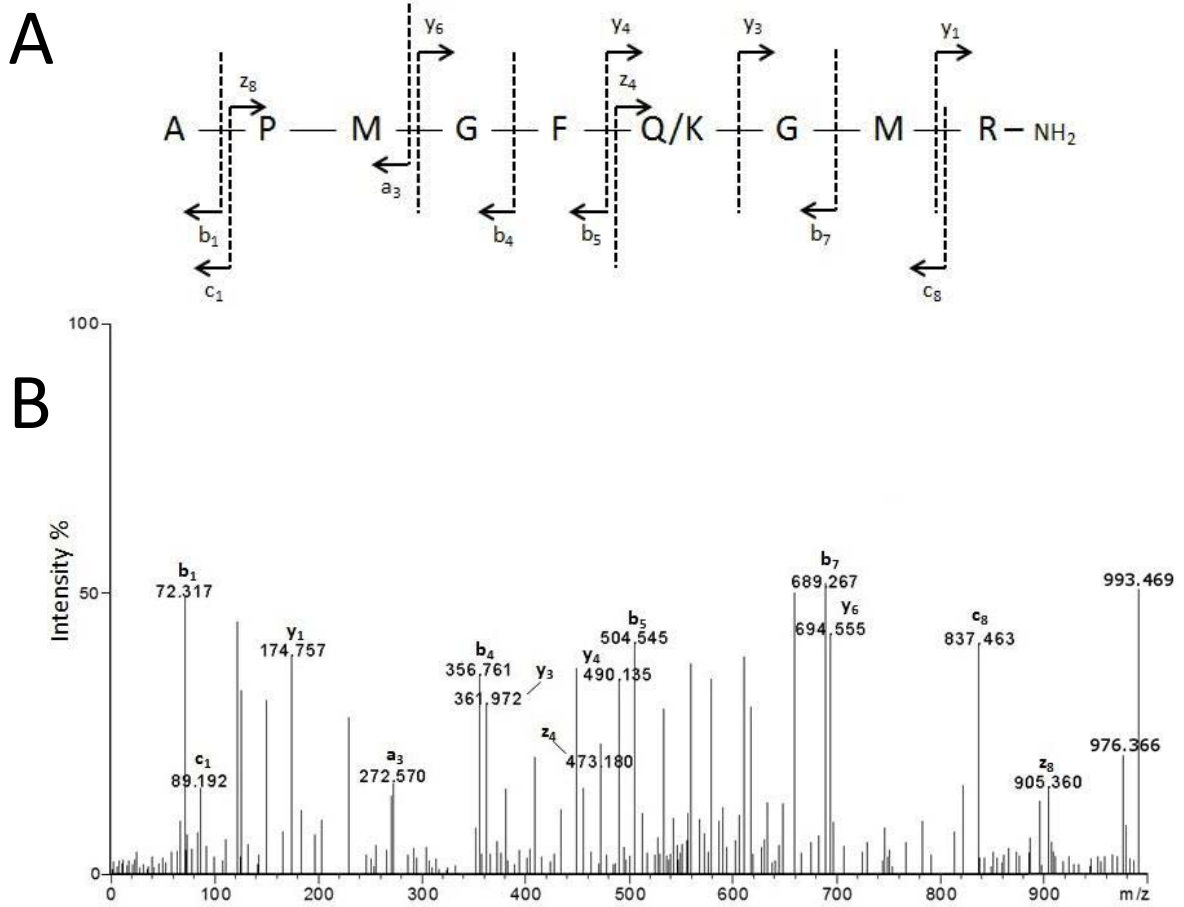
992,47

Figura 9: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 993,47 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 72.317 (b_1), 89.192 (c_1), 174.757 (y_1), 272.570 (a_3), 356.761 (b_4), 361.972 (y_3), 473.180 (z_4), 490.135 (y_4), 504.545 (b_5), 689.267 (b_7), 694.555 (y_6), 837.463 (c_8) e 905.360 (z_8); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 992,47 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

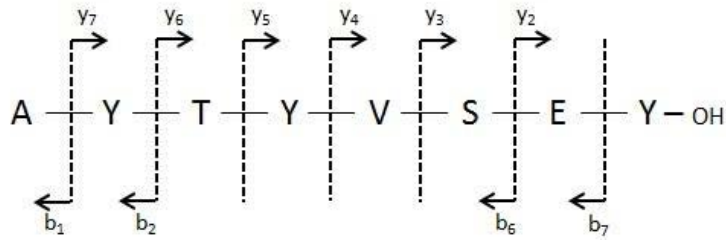
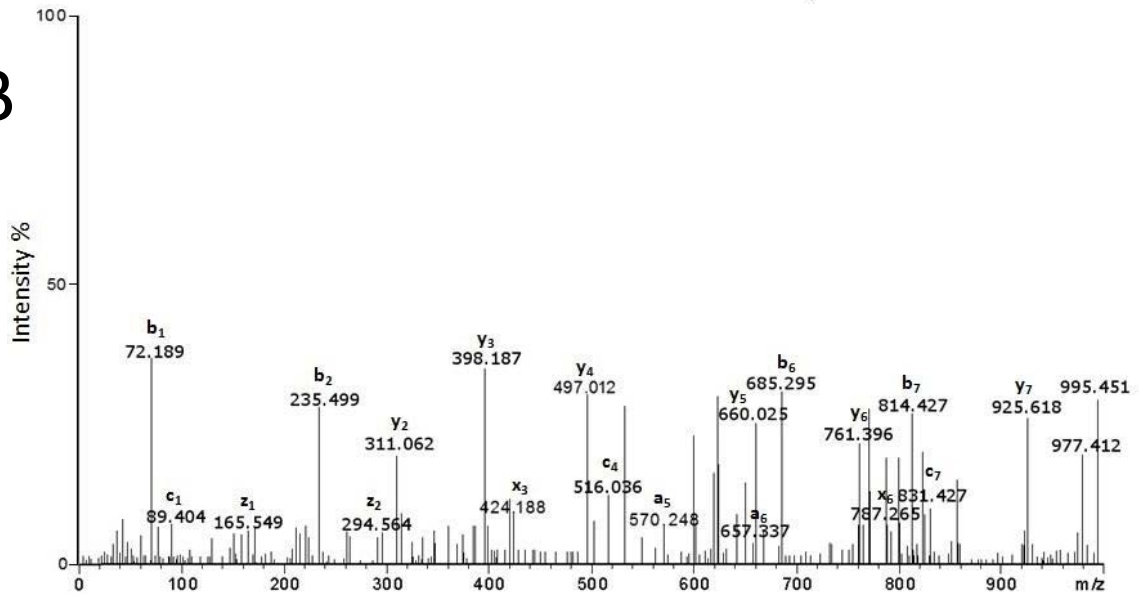
994,45**A****B**

Figura 10: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 995,45 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 72.189 (b_1), 235.499 (b_2), 311.062 (y_2), 398.187 (y_3), 497.012 (y_4), 660.025 (y_5), 685.295 (b_6), 761.396 (y_6), 814.427 (b_7) e 925.618 (y_7); B) Espectro MS^2 deconvoluído de massa molecular 994,45 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

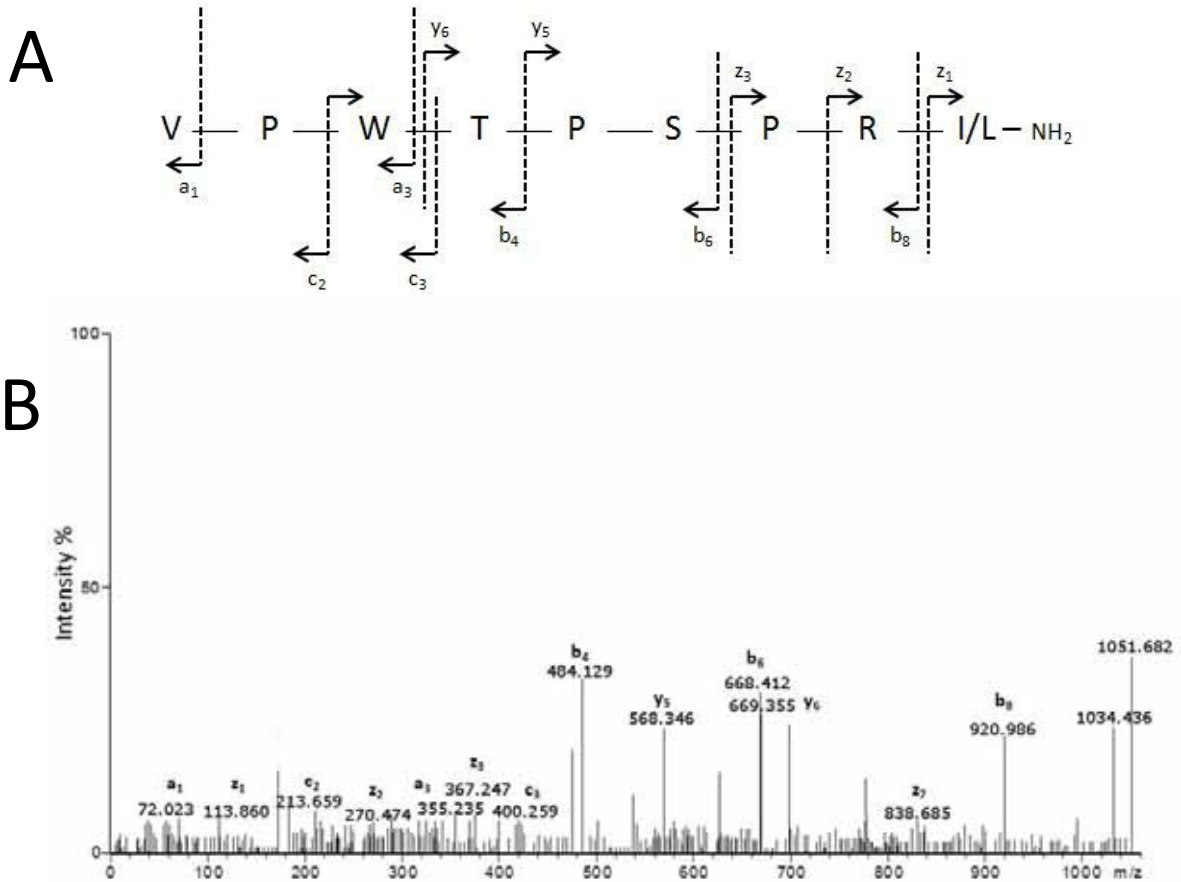
1050,68

Figura 11: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 1051,68 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 72.023 (a_1), 113.860 (z_1), 213.659 (c_2), 270.474 (z_2), 355.235 (a_3), 367.247 (z_3), 400.259 (c_3), 484.129 (b_4), 568.346 (y_5), 668.412 (b_6), 669.355 (y_6) e 920.986 (b_8); B) Espectro MS^2 deconvoluído de massa molecular 1050,68 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

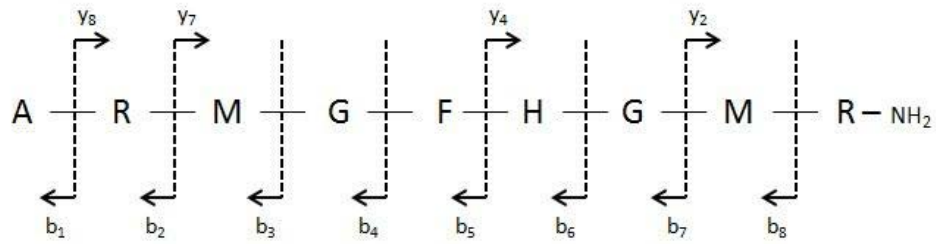
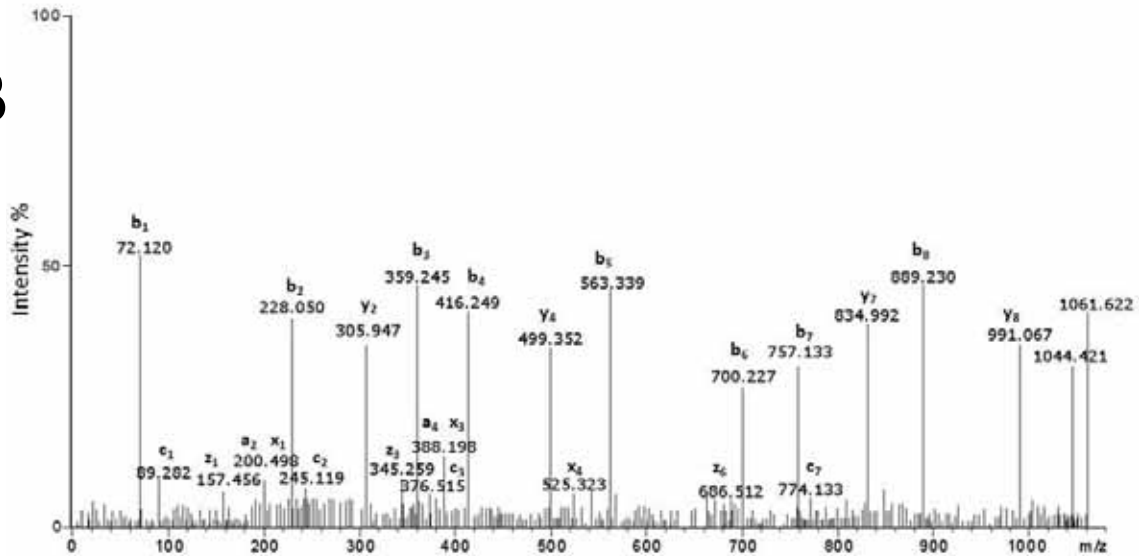
1060,62**A****B**

Figura 12: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 1061,62 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 72.120 (b₁), 228.050 (b₂), 305.947 (y₂), 359.245 (b₃), 416.249 (b₄), 499.352 (y₄), 563.339 (b₅), 700.227 (b₆), 757.133 (b₇), 834.992 (y₇), 889.230 (b₈) e 991.067 (y₈); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 1050,68 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

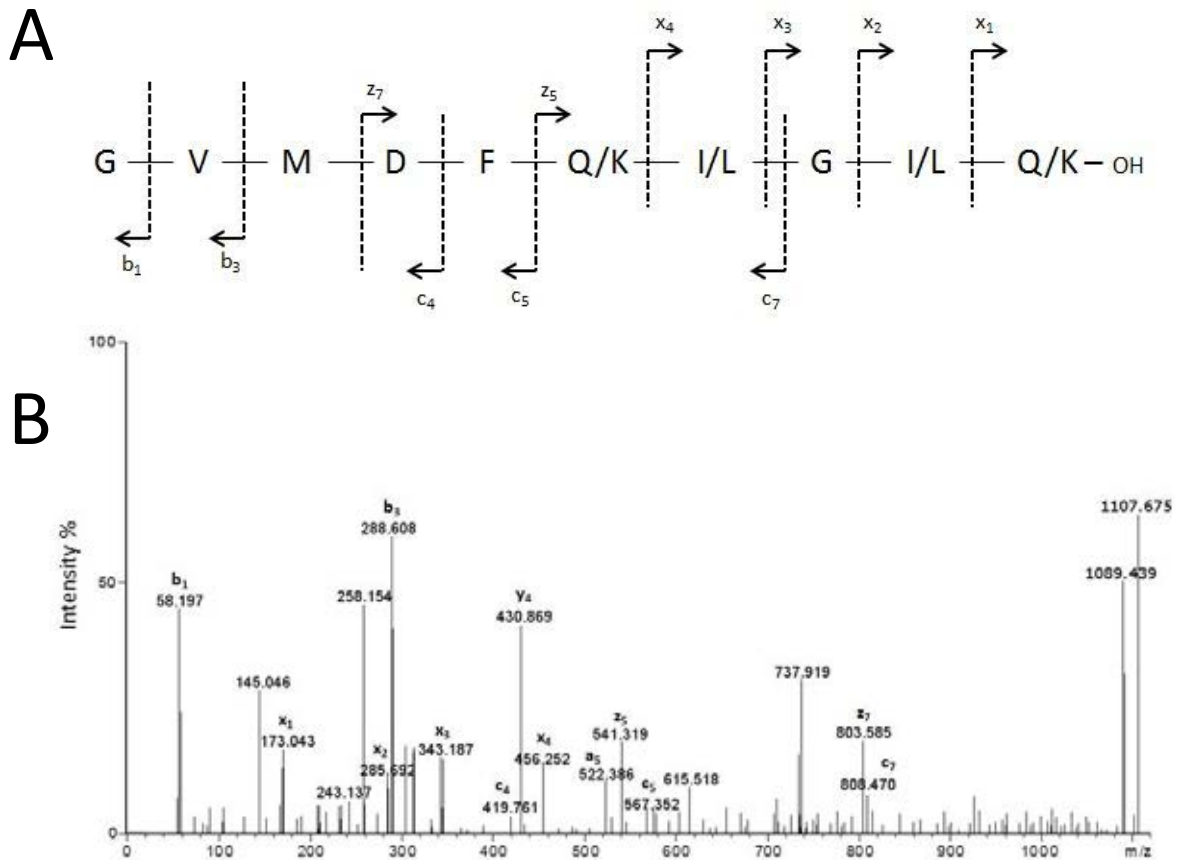
1106,67

Figura 13: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 1107,67 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 58.197 (b_1), 173.043 (x_1), 285.692 (x_2), 288.608 (b_3), 343.187 (x_3), 419.761 (c_4), 456.252 (x_4), 541.319 (z_5), 567.352 (c_5), 803.585 (z_7) e 808.470 (c_7); B) Espectro MS^2 deconvoluído de massa molecular 1106,67 Da (fração 3). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

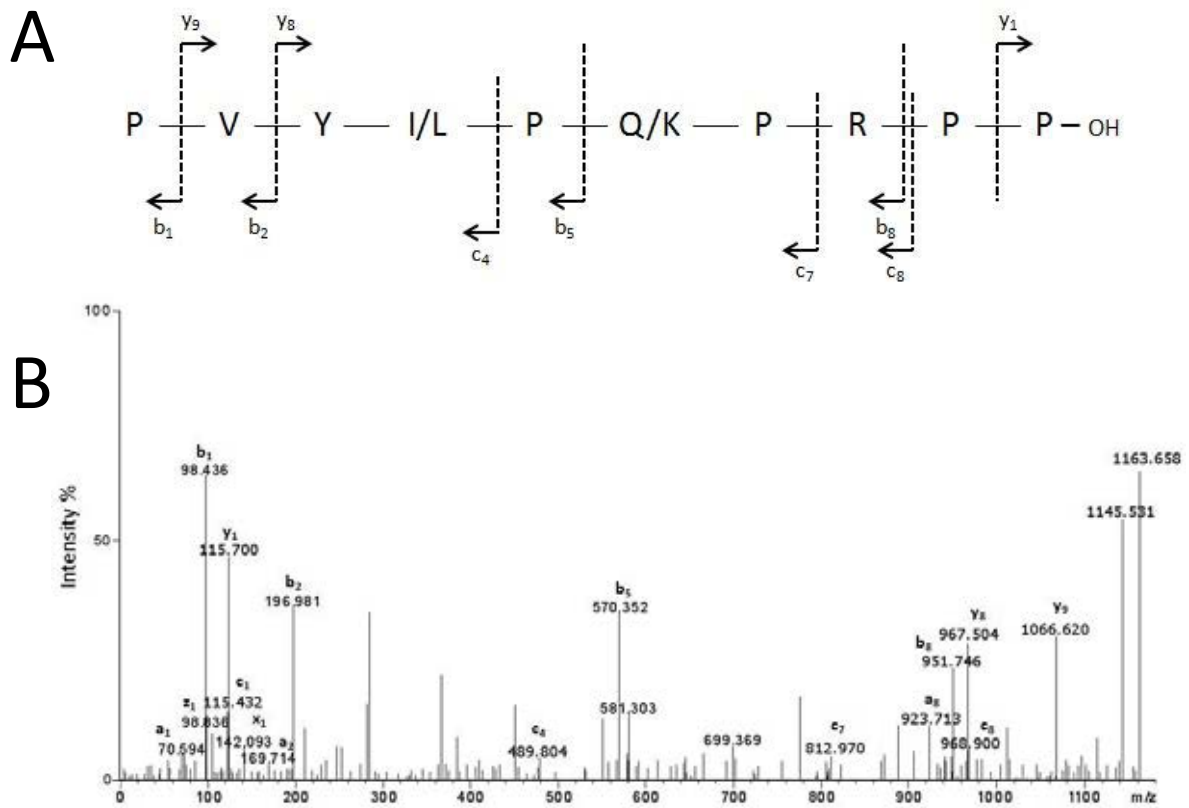
1162,66

Figura 14: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 1163,66 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 98.436 (b_1), 115.700 (y_1), 196.981 (b_2), 489.804 (c_4), 570.352 (b_5), 812.970 (c_7), 951.746 (b_8), 967.504 (y_8), 968.900 (c_8) e 1066.620 (y_9); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 1162,66 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

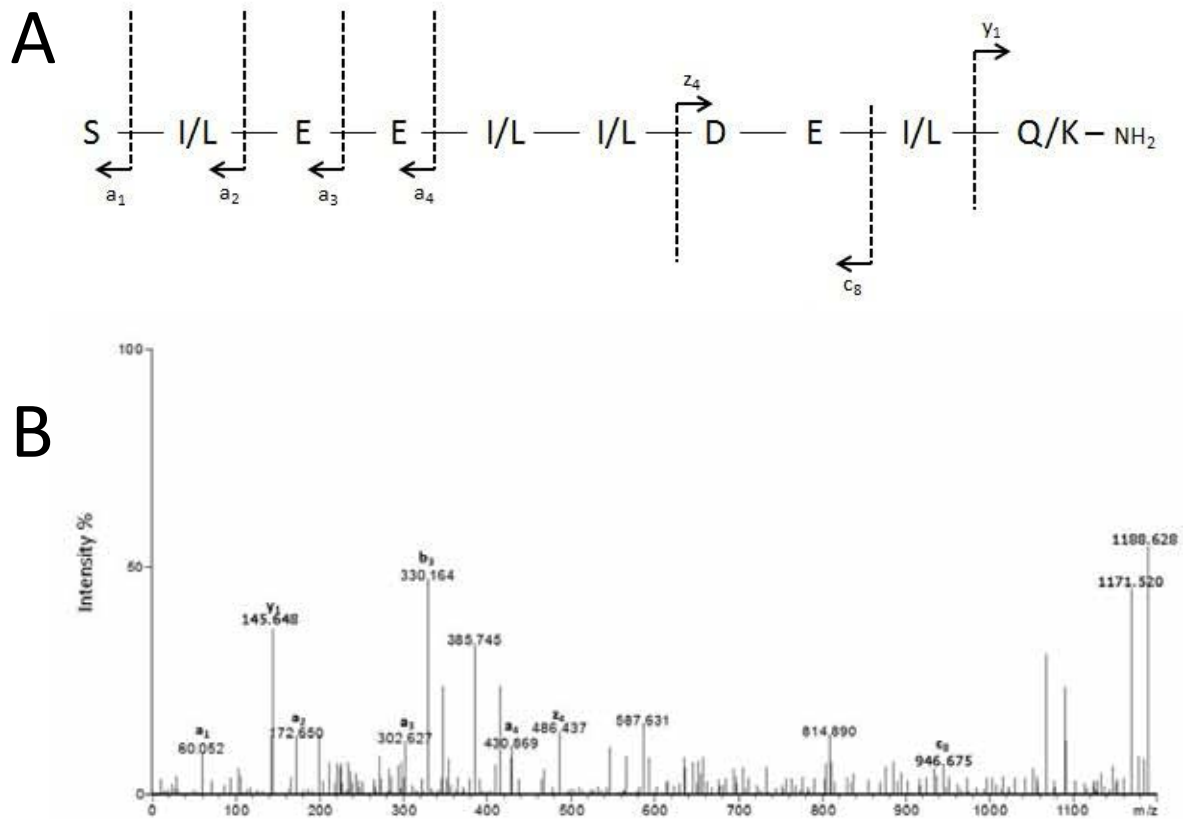
1187,63

Figura 15: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 1188,63 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 60.052 (a_1), 145.648 (y_1), 172.650 (a_2), 302.627 (a_3), 430.869 (a_4), 486.437 (z_4) e 946.675 (c_8); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 1187,63 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

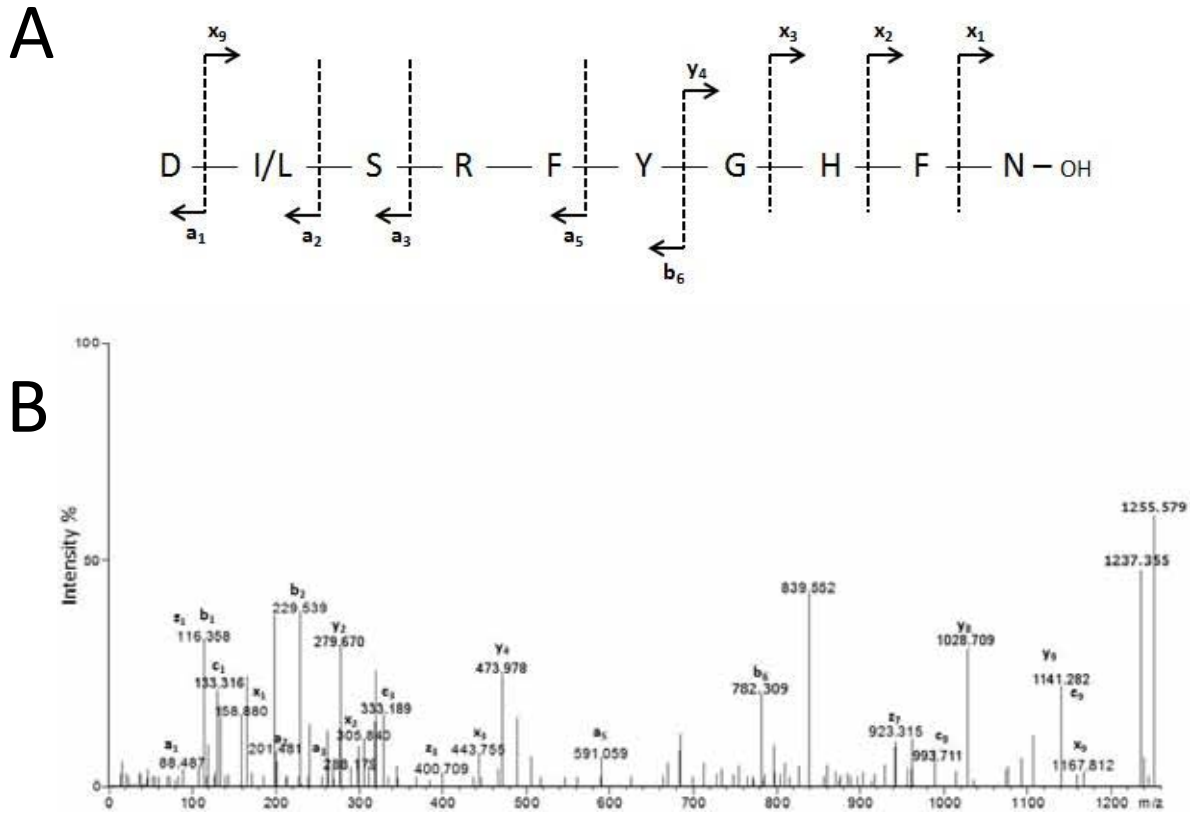
1254,58

Figura 16: A) Interpretação da sequência peptídica em diagrama de Roepstorff-Fohlmann apresentando os principais íons fragmentos do íon molecular de m/z 1255,58 na forma $[M + H]^+$, sendo eles: 88.487 (a_1), 158.880 (x_1), 201.481 (a_2), 288.175 (a_3), 305.840 (x_2), 443.755 (x_3), 473.978 (y_4), 591.059 (a_5), 782.309 (b_6) e 1167.812 (x_9); B) Espectro MS² deconvoluído de massa molecular 1254,58 Da (fração 4). O espectro ESI foi adquirido na forma contínua, em modo positivo.

6. CONCLUSÕES

Foi verificado que aproximadamente 10% do material extraído do cérebro era constituído de compostos peptídicos, já que a fração 1 que apresentou 90,7% deste material era constituída em sua maioria de compostos não peptídicos de baixa massa molecular. Desta forma, a estratégia off-line se mostrou mais adequada em comparação à estratégia on-line devido à possibilidade de se trabalhar com cada fração obtida separadamente para as análises espectrométricas, resultando em melhores espectros MS e MSMS. Os resultados obtidos até o momento indicam que a metodologia é apropriada para estudos desta natureza, e será utilizada na continuidade dos estudos neuropeptidômicos de cérebros de abelhas, correlacionando-os com diferentes comportamentos desses insetos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSTEIN, M; GAZIT, Y.; AZIZ, O. B.; GABAY, T.; MARCUS, R.; VOGEL, Z.; BARG, J. Induction of cuticular melanization in *Spodoptera littoralis* larvae by PBAN/MRCH: Development of a quantitative bioassay and structure function analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.31, p. 355-370, 1996.
- AUDSLEY, N.; WEAVER, R. J. Analysis of peptides in the brain and corpora cardiaca–corpora allata of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. **Peptides**, v.27, p. 512-520, 2006.
- AUDSLEY, N.; WEAVER, R. J. Neuropeptides associated with the regulation of feeding in insects. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, p. 93–104, 2009.
- BANDENA, W. G.; DONLY, B. C.; TOBE, S. S. Allatostatins: A growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 897, n.1, p. 311-329, 2006.
- BOERJAN, B.; CARDOEN D.; BOGAERTS, A.; LANDUYT, B.; SCHOOF, L.; VERLEYEN, P. Mass spectrometric profiling of (neuro)-peptides in the worker honeybee, *Apis mellifera*. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 248-258, 2010.
- BROCKMANN, A.; ANNANGUNDI, S. P.; RICHMOND, T. A.; AMENT, S. A.; XIE, F.; SOUTHEY, B. R.; RODRIGUES-ZAS, S. R.; ROBINSON, G. E.; SWEEDLER, J. V. Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 7, p. 2383-2388, 2009.
- CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WUÇFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- CHAPMAN, R. F. Nervous system. In:____. **The insects: Structure and function**. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press. Cap. 20, p.534-569, 1998.
- COAST, G. M.; SCHOOLEY, D. A. Toward a consensus nomenclature for insect neuropeptides and peptide hormones. **Peptides**, vol.32, p. 620-631, 2011.
- DICKINSON, P. S.; WIWATPANIT, T.; GABRANSKI, E. R.; ACKERMAN, R. J.; STEVENS, J. S.; CASHMAN, C. R.; STEMMLER, E. A.; CHRISTIE, A. E. Identification of SYWKQCAFNAVSCFamide: a broadly conserved crustacean C-type allostatin-like peptide with both neuromodulatory and cardioactive properties. **The Journal of Experimental Biology**, v.212, p.1140-1152, 2009.
- FREE, J. B. Defesa da colônia. In: FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: EPU, EDUSP, 1980. Coleção Temas de Biologia, v. 13. p. 34-40.
- HERRERO, M.; IBÁÑES, E.; CIFUENTES, A. Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics. **Electrophoresis**, v. 20, n. 10, p. 2148-2160, 2008.

- HOLMAN, G. M.; COOK, B. J.; NACHMAN, R. J. Isolation, primary structure and synthesis of a blocked neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p. 219–224, 1986.
- HULT, E. F.; WEADICK, C.J.; CHANG, B. S. W.; TOBE, S. S.. Reconstruction of ancestral FGLamide-type insect allatostatins: a novel approach to the study of allatostatin function and evolution. **Journal of Insect Physiology**, vol. 54, p. 959-968, 2008.
- HUMMON, A. B.; RICHMOND, T. A.; VERLEYEN, P.; BAGGERMAN, G.; HUYBRECHTS, J.; EWING, M. A.; VIERSTRAETE, E.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHOOF, L.; ROBINSON, G. E.; SWEEDLER, J. V. From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. **Science**, v. 314, p.647-649, 2006.
- IMAI, K.; KONNO, T.; NAKAZAWA, Y.; KOMIYA, T.; ISOBE, M.; KOGA, K.; GOTO, T.; YAGINUMA, T.; SAKAKIBARA, K.; HASEGAWA, K.; YAMASHITA, O. Isolation and structure of a diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the Japan Academy**, 67B, p. 98–107, 1991.
- KREISSL, S.; STRASSER, C.; GALIZIA, C. G. Allatostatin immunoreactivity in the honeybee brain. **The Journal of Comparative Neurology**, vol.518, p. 1391-1417, 2010.
- LANGE, A. B.; ORCHARD, I.; TE BRUGGE, V. Evidence for the involvement of a SchistoFLRF-amide-like peptide in the neural control of locust oviduct. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 168, p. 383–391, 1991.
- LENT, R. Os chips neurais. In: LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Editora Atheneu. cap. 4, p. 99-132, 2005.
- MARCINIAK, P.; KUCZER, M.; ROSINSKI, G. New physiological activities of myosupressin, sulfakinin and NVP-like peptide in *Zophobas atratus* beetle. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, p.721-730, 2011.
- MATSUMOTO, S.; KITAMURA, A.; NAGASAWA, H.; KATAOKA, H.; ORIKASA, C.; MITSUI, T.; SUZUKI, A. Functional diversity of a neuromone produced by the subesophageal ganglion: molecular identity of melanization and reddish colouration hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n.6, p. 427-432, 1990.
- NÄSSEL, D. R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neuromones. **Progress in Neurobiology**, v. 69, p. 1-84, 2002.
- ORCHARD, I.; LANGE A. B.; BENDENA, W. G. FMRFamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects. **Advances in Insect Physiology**, v. 28, p. 267–329, 2001.
- ORCHARD, I; LANGE, A. B. FMRFamide- like peptides (FLPs). In: KASTIN, A. (ed.). **Handbook of Biologically Active Peptides**. 2 ed. San Diego: Elsevier. Cap.35, p. 237-236, 2013.

PAGE, R.; ERBER, J. Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. **Naturwissenschaften**, v. 89, n.3, p. 91-106, 2002.

PALMA, M. S. Peptides as toxins/defensins. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 1-4, 2010.

PREDEL, R.; NEUPERT, S. Social behavior and the evolution of neuropeptide genes: lessons from the honeybee genome. **BioEssays**, v. 29, p. 416-421, 2007.

RAFAELI A. Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. **International Review of Cytology**, v. 213, p. 49-91, 2002.

RAINA, A. K.; KLUN, J. A. Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. **Science**, v. 225, p.531-533, 1984.

SCHOOFS, L.; HOLMAN, G.M.; HAYES, T.K.; NACHMAN, R.J.; DE-LOOF, A. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. **FEBS Letters**, vol.261, p. 397–401, 1990.

SCHÜRMAN, F. W.; ERBER, J. FMRFamide-like immunoreactivity in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). A light- and electron microscopical study. **Neuroscience**, vol.38, n.3, p.797-807, 1990.

SKONIECZNA, M.; ROSINSKI, G. Cardioactive effect of FMRFamide related peptides in beetles, *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. **Pesticides**, v. 3/4, p. 33-39, 2004.

STORT, A. C. Genetical study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brasil: V. number of stings in the leather ball. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 48, n. 3, p. 381-387, 1975.

TAKEUCHI, H.; YASUDA, A.; YASUDA-KAMATANI, Y.; KUBO, T.; NAKAJIMA, T. Identification of a tachykinin-related neuropeptide from the honeybee brain using direct MALDI-TOF MS and its gene expression in worker, queen and drone heads. **Insect Molecular Biology**, vol. 12, n.3, p.291-298, 2003.

TARHZAZ, S.; ROSAY, P.; GOODWIN, S.; VEENSTRA, J. A. The neuropeptide SIFamide modulates sexual behavior in *Drosophila*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, p.305-310, 2007.

TEAL, P. E. A.; ABERNATHY, R. L.; NACHMAN, R.; FANG, N.; MEREDITH, J. A.; TUMLINSON, J. H. Pheromone biosynthesis activating neuropeptides: functions and chemistry. **Peptides**, v. 17, n.2, p 337-344, 1996.

VERLEYEN, P.; HUYBRECHTS, J.; BAGGERMAN, G.; LOMMEL, A. V.; LOOF, A. D.; SCHOOFS, L. SIFamide is a highly conserved neuropeptide: a comparative study in different insect species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 334-341, 2004.

VERLEYEN, P.; HUYBRECHTS J.; SCHOOF, L. SIFamide illustrates the rapid evolution in Arthropod neuropeptide research. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, p. 27-35, 2009.

VULLINGS, H. G. B.; TEN VOORDE, S. E. E. G.; PASSIER, P. C. C. M.; DIEDEREN, J. H. B.; VAN DER HORST, D. J.; NÄSSEL, D. R. A possible role of SchistoFLRFamide in inhibition of adipokinetic hormone release from locust corpora cardiaca. **Journal of Neurocytology**, v. 27, p. 901–913, 1998.

WINSTON, M. L. **A biologia da Abelha**. Tradução de Osowski, Carlos A. – Porto Alegre: Magister, 2003. 276 pp.

WOODHEAD, A. P.; STAY, B.; SEIDEL, S. L.; KHAN, M. A.; TOBE, S. S. Primary structure of four allatostatins: Neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 5997-6001, 1989.

ZDAREK, J.; NACHMAN, R. J.; HAYES, T. K. Insect neuropeptides of the pyrokinin/PBAN family accelerate pupariation in the fleshfly (*Sarcophaga bullata*) larvae. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 814, p. 67–72, 1997.