


---

Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular

---

**Análise metabolômica do cérebro de abelhas (*Apis mellifera*)  
Submetidas a Ensaio de Reflexo de Extensão de Probóscide (REP)**

**Marcel Pratavieira**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Fevereiro - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO

Instituto de Biociências

*Campus* Rio Claro

Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular

**Marcel Pratavieira**

**Análise metabolômica do cérebro de abelhas (*Apis mellifera*)  
Submetidas a Ensaio de Reflexo de Extensão de Probóscide (REP)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Rio Claro

São Paulo – Brasil

2016

573.8 Pratavieira, Marcel  
P912a Análise metabólica do cérebro de abelhas (*Apis mellifera*) submetidas a ensaio de Reflexo de Extensão de Probóscide (REP) / Marcel Pratavieira. - Rio Claro, 2016  
173 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Neurobiologia. 2. Neurociência. 3. Hymenoptera. 4.  
Espectrometria de massas. 5. MALDI MSI. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Análise metabolômica do cérebro de abelhas (*Apis mellifera*) Submetidas a Ensaio de Reflexo de Extensão de Probóscide (REP).**

**AUTOR: MARCEL PRATAVIEIRA**

**ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA  
CEIS / IB Rio Claro

  
Prof. Dr. ZILA LUZ PAULINO SIMÕES  
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

  
Prof. Dr. NORBERTO PEPORINE LOPES  
Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP /  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Rio Claro, 23 de fevereiro de 2016

*Dedico esse trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam arduamente para que eu pudesse realizá-los, meus pais,  
Manoel e Meire.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Manoel e Meire, que são meus maiores exemplos. Todo o carinho e apoio que vocês me deram foram fundamentais para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Obrigado pela dedicação, amizade, companheirismo, incentivo e por todos os momentos inesquecíveis que passamos e que ainda vamos passar juntos. Agradeço, também, meu irmão Murilo. Obrigado por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Agradeço a Anally por todo afeto, amor, carinho e atenção. Obrigado por estar sempre ao meu lado me apoiando e por fazer parte da minha vida. Você me ensina a cada dia como amar, e resalta a importância de se ter uma companheira para todas as horas. Agradeço, também, por toda ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho; sua participação foi fundamental.

A todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Agradeço em especial o meu primo, Rafael, que sempre esteve muito presente em minha vida me proporcionando momentos muito engraçados.

Aos meus tios Daniel e Sandra, pelo total apoio, convivência e bons momentos proporcionados.

Agradeço ao Sandro, Lilian, Dirce e Arthur. Obrigado por todos os bons momentos que passamos juntos, e por toda atenção dedicada.

Agradeço a toda a galera do CBI09, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Agradeço especialmente aos meus melhores amigos, Laranja, Boi e Noé. Tenho certeza que mesmo estando longe, nossa amizade jamais será perdida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela oportunidade, ensinamentos, orientação e pela paciência. Obrigado pela confiança em mim depositada.

Aos demais professores que participaram da minha pós-graduação, e que foram responsáveis por me fazer aprender e crescer muito durante esses dois anos.

Agradeço também ao grupo do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (Anally, Franciele, Beto, Helen, Bibiana, Nathalia) por toda ajuda direta ou indiretamente concedida.

Agradeço, também, a todas as pessoas do centro de estudos de insetos sociais (CEIS) e, em especial, as pessoas do laboratório do prof. Malaspina.

Agradeço à Universidade pela infraestrutura e pelo apoio acadêmico.

A FAPESP, pelo suporte financeiro concedido durante o desenvolvimento deste projeto.

A todos os funcionários da UNESP-Rio Claro, pelos serviços prestados.

A todas as eventuais pessoas que eu possa ter esquecido de mencionar aqui. A todos, muito obrigado!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

As abelhas têm sido utilizadas como modelos robustos e influentes para o estudo de memória e aprendizagem, contribuindo para o melhor entendimento das bases da cognição. Nesse contexto, diferentes metabólitos foram caracterizados por desempenharem funções distintas no processo de aprendizagem e formação de memória em insetos. Considerando que pouco se sabe sobre os metabólitos em relação ao desenvolvimento das habilidades cognitivas em *A. mellifera*, ou mesmo em relação aos comportamentos reflexos (condicionados e/ou não condicionados), o presente estudo teve como objetivo a análise metabolômica do cérebro de abelhas submetidas ao ensaio comportamental de reflexo de extensão de probóscide (REP). Para isto, foi padronizada a técnica de análise metabolômica com o uso do sistema LC-ESI-MS e MS<sup>n</sup>, construindo-se inicialmente uma biblioteca de compostos característicos de cérebro de abelhas (neurotransmissores, aminoácidos livres, poliaminas, nucleotídeos, nucleosídeos, ácidos orgânicos, etc). Nesta primeira abordagem, dentre os 112 compostos da biblioteca, 48 foram identificados e quantificados; alguns destes compostos foram únicos para o grupo controle (cadaverina, espermina, glicose, uracila e n-acetil-L-glutamato 5-semialdeído), enquanto que outros foram únicos para o grupo REP (fenilalanina, betaína, espermidina, serina e creatina). Dentre os compostos identificados em ambos os grupos, apenas 5 compostos apresentaram diferenças quantitativas estatisticamente significantes (arginina, asparagina, guanosina monofosfato, putrescina e 4-guanitinobutanoato). Visando o estudo dos perfis metabólicos regionais (em cada região do cérebro), foi também padronizado o protocolo experimental utilizando-se a estratégia MALDI *Spectral Imaging* e o desenvolvimento de um método semi-quantitativo de metabólitos. Esta estratégia permitiu o mapeamento e o estudo da distribuição espacial dos metabólitos identificados em cortes de cérebro de abelhas, bem como uma melhor compreensão da distribuição dessas moléculas nas diferentes estruturas do cérebro e sua correlação com o comportamento ensaiado. As duas estratégias aplicadas mostraram-se complementares e fundamentais para a compreensão da cognição em abelhas. De modo geral, o ensaio de REP parece estimular intensa atividade cerebral, alto gasto energético, intensa sinalização química e a ativação de algumas cascatas metabólicas específicas, tais como a rota metabólica da prolina e arginina. Nos indivíduos do grupo REP a arginina provavelmente foi catabolizada nas sínteses de creatina, 4-guanidinobutanoato, putrescina e espermidina. Esses processos bioquímicos provavelmente foram importantes para coordenar o reconhecimento da molécula de sacarose, e associar esse odor com um comportamento reflexo para a extensão da probóscide (estímulo não condicionado).

**PALAVRAS-CHAVE:** metabolômica, neurociência, *Apis mellifera*, espectrometria de massas e MALDI MSI

## ABSTRACT

The honeybee *Apis mellifera* has long served as an invertebrate model organism for learning and memory research, contributing to a better understanding of cognition bases. In this context, different metabolites (especially neurotransmitters) were characterized by play distinct roles in learning process and in memory formation in insects. Whereas little is known about the metabolites in relation to the development of cognitive skills in *A. mellifera*, the present study aims to perform a metabolomic analysis of the honeybee brains submitted to the behavioral test of proboscis extension reflex (PER). For this, has been standardized a metabolomic analysis technique through the use of LC-ESI-MS and MS<sup>n</sup> system. Initially a low molecular weight compounds library was created, containing characteristic compounds of bee brain (neurotransmitters, free amino acids, polyamines, nucleotides, nucleosides, organic acids, etc.). In this first approach, from the library of 112 compounds, 48 compounds were identified and quantified; some of these compounds were only identified in the control group (cadaverine, spermine, glucose, uracil and N-acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde), while others were only identified in PER group (phenylalanine, betaine, spermidine, serine and creatine). Among the compounds identified in both groups, only five compounds showed statistically significant differences in quantitative results (arginine, asparagine, guanosine monophosphate, putrescine and 4-guanidinebutanoate). In order to study the metabolic profiles by regions (within each brain region) it was also standardized an experimental protocol using a novel semi-quantitative method of MALDI Spectral Imaging strategy. This strategy allowed the study and the mapping of the spatial distribution of metabolites identified in honeybee brain sections, as well as a better understanding of the distribution of molecules in the different brain structures and their correlation with the behavior tested. Both strategies applied proved to be complementary and essential to the understanding of cognition in bees. Overall, in this study the PER test seems to stimulate intense brain activity, high energy expenditure, intense chemical signaling and activation of some specific metabolic pathways, such the arginine and proline metabolic pathway. In individuals of PER group arginine was probably catabolized in the synthesis of creatine, 4-guanidinobutanoato, putrescine and spermidine. This biochemical process were probably important to coordinate the recognition of sucrose molecule and associate this odor with a reflex behavior for the proboscis extension (unconditioned stimulus).

**KEYWORDS:** metabolomics, neuroscience, *Apis mellifera*, mass spectrometry and MALDI MSI.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Forrageira de *A. mellifera* submetida ao este de REP, aprisionada, mantendo-se a cabeça e as peças bucais livres. (A) oferecimento de água – sem extensão da probóscide. (B) oferecimento de solução de sacarose (80% (m/v)) – com extensão da probóscide..... 39
- Figura 2.** Estratégia geral adotada para imageamento por espectrometria de massas dos metabólitos em cérebro de *A. mellifera*..... 52
- Figura 3.** Cromatograma de íons extraídos para os seguintes metabólitos: ácido aspártico ( $m/z$  134,04), ácido glutâmico ( $m/z$  148,05), ácido caínico ( $m/z$  214,09), epinefrina ( $m/z$  184,09), GABA ( $m/z$  104,07), tiramina ( $m/z$  138,09), dopamina ( $m/z$  154,08) e octopamina ( $m/z$  154,08), todos na forma  $[M+H]^+$ . Para essa análise foram utilizadas as condições cromatográficas padronizadas na tabela 3 [contendo ácido fórmico 0,1% (v/v)]. Coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m); fluxo utilizado de 0,2 ml/min..... 57
- Figura 4.** Cromatograma de íons extraídos para os seguintes metabólitos: ácido aspártico ( $m/z$  134,04), ácido glutâmico ( $m/z$  148,05), ácido caínico ( $m/z$  214,09), epinefrina ( $m/z$  184,09), GABA ( $m/z$  104,07), tiramina ( $m/z$  138,09), dopamina ( $m/z$  154,08) e octopamina ( $m/z$  154,08), todos na forma  $[M+H]^+$ . Para essa análise foram utilizadas as condições cromatográficas padronizadas na tabela 4 [contendo HFBA 0,1% (v/v)]. Coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m); fluxo utilizado de 0,2 ml/min..... 59
- Figura 5.** Cromatograma de pico base (BPC) obtidos a partir de 10 $\mu$ g do extrato de cérebros de abelhas *A. mellifera* (grupo **controle**) por IPC-RP-LCMS [coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m), utilizando-se as fases móveis (A) H<sub>2</sub>O contendo HFBA 0,1% (v/v), e (B) MeCN contendo HFBA 0,1% (v/v); gradiente de 2 a 95% de B em 90 minutos, com fluxo de 0,2 ml/min]... 65
- Figura 6.** Cromatograma de pico base (BPC) obtidos a partir de 10 $\mu$ g do extrato de cérebros de abelhas *A. mellifera* (grupo **REP**) por IPC-RP-LCMS [coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m), utilizando as fases móveis (A) H<sub>2</sub>O/HFBA 0,1% (ácido heptafluorobutírico), e (B) MeCN/HFBA 0,1%; gradiente de 2 a 95% de B em 90 minutos, com fluxo de 0,2 ml/min]..... 67
- Figura 7.** Comparação do perfil global de metabólitos identificados nos grupos controle (azul) e REP (vermelho). Foram utilizados os valores médios de concentração (ng/cérebro) para a representação gráfica. As diferenças de concentração estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) foram marcadas com “\*”..... 71
- Figura 8.** Comparação do perfil global de metabólitos identificados nos grupos controle (azul) e REP (vermelho), através da utilização da biblioteca criada sem padrão sintético. Foram utilizados os valores médios de concentração (ng/cérebro) para a representação gráfica. As diferenças de concentração estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) foram marcadas com “\*”.... 77
- Figura 9.** Representação do plano sagital em cabeças de abelhas *A. mellifera*, indicando o plano de secção do cérebro (A). Vista frontal da secção do cérebro no plano sagital da cabeça de abelhas, mostrando as diferentes regiões do cérebro, que são indicadas por números de 1 a 12, com suas respectivas legendas (B). Adaptado de Pratavieira et al., 2014..... 80
- Figura 10.** Imagem gerada por espectrometria de massas da histamina ( $m/z$  112,08 na forma  $[M+H]^+$ ) comparando uma análise sem a deposição de padrão interno (A), e uma análise com aplicação de 2-feniletilamina como padrão interno e normalização dos dados (B)..... 84
- Figura 11.** Definição de janela de valores de  $m/z$  com o uso do algoritmo MsiReader, para selecionar um valor de intensidade. No método *Max of Window (Max)* a intensidade

selecionada é aquela de maior intensidade dentro de uma mesma janela de  $m/z$ ; todavia, no método *Sum of Window (Sum)* é realizado a soma das intensidades dos picos dentro de uma mesma janela..... 85

**Figura 12.** Imagens geradas por espectrometria de massas com a aplicação de diferentes graus de interpolação, criadas a partir do algoritmo MSiReader v0.05. (A) Não foi aplicado um método de interpolação (grau 0). (B) Aplicação do método de interpolação de grau 1. (C) Aplicação do método de interpolação de grau 2. (D) Aplicação do método de interpolação de grau 3. (E) Aplicação do método de interpolação de grau 4. (F) Aplicação do método de interpolação de grau 5..... 87

**Figura 13.** Imagens geradas por espectrometria de massas da glicose identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  181.07, na forma  $([M+H]^+)$ ..... 88

**Figura 14.** Imagens geradas por espectrometria de massas da arginina, cadaverina e putrescina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. A e B – imagens geradas por espectrometria de massas da arginina, obtidas a partir da molécula protonada de  $m/z$  175.11, na forma  $([M+H]^+)$ ; C e D – imagens geradas por espectrometria de massas da cadaverina, obtidas a partir da molécula protonada de  $m/z$  103.17, na forma  $([M+H]^+)$ ; E e F – imagens geradas por espectrometria de massas da putrescina, obtidas a partir da molécula protonada de  $m/z$  89.15, na forma  $([M+H]^+)$ ..... 90

**Figura 15.** Imagens geradas por espectrometria de massas da fenilalanina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  166.08, na forma  $([M+H]^+)$  ..... 91

**Figura 16.** Imagens geradas por espectrometria de massas da guanosina monofosfato identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  364.06, na forma  $([M+H]^+)$  ..... 91

**Figura 17.** Espectros de massas do ácido caínico ( $m/z$  214.23) obtido em diferentes regiões do cérebro de *A. mellifera* submetidas ao ensaio de REP, a partir da análise de MALDI MSI. Observa-se também os íons-fragmento de  $m/z$  196.09; 168.10; 150.09; 122.09, todos na forma  $[M+H]^+$ ..... 93

**Figura 18.** Imagens geradas por espectrometria de massas de compostos identificados exclusivamente pela análise de MALDI MSI, comparando os cérebros de abelhas do grupo controle (coluna da esquerda) e REP (coluna da direita). A e B – imagens geradas por espectrometria de massas do ácido caínico, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  214.23, 196.09 e 168.10, na forma  $[M+H]^+$ ; C e D – imagens do 1,3-diaminopropano, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  75.09 e 58.06, na forma  $[M+H]^+$ ; E e F – imagens da epinefrina, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  184.11 e 166.09, na forma  $[M+H]^+$ ; G e H – imagens da serotonina, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  177.1, 160.07 e 146.06, na forma  $[M+H]^+$ ; I e J – imagens da tiramina, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  138.09, 121.06 e 107.05, na forma  $[M+H]^+$ . Essas imagens foram geradas no algoritmo MSiReader v0.05..... 96

**Figura 19.** Espectro médio da região do lobo antenal esquerdo (grupo controle), gerados a partir do EIC, através do software MSiReader v0.05. Nesse espectro estão representados os principais neurotransmissores e neuromoduladores identificados nessa região. Os valores de intensidade do eixo y está expresso em unidades arbitrárias definidas pelo próprio algoritmo.... 98

**Figura 20.** Espectro médio da região do gânglio sub-esofágico (grupo controle) gerados a partir do EIC, através do software MSiReader v0.05. Nesse espectro estão representados os principais neurotransmissores e neuromoduladores identificados nessa região. Os valores de

intensidade do eixo y está expresso em unidades arbitrárias definidas pelo próprio algoritmo....	99
<b>Figura 21.</b> Delimitação de uma região de interesse (ROI) no software MSiReader v0.05.....	100
<b>Figura 22.</b> Mapa de calor representando a distribuição dos metabólitos nas 18 diferentes regiões do cérebro de <i>A. mellifera</i> comparando os grupos controle e REP. A coloração azul indica que um composto estava mais presente no grupo controle do que no grupo REP em uma determinada região do cérebro, e a coloração vermelha indica que a concentração desse composto é maior no grupo REP do que no grupo controle.....	104
<b>Figura 23.</b> Representação da rota biossintética das poliaminas, adaptado de ROJE (2006); SHANTZ e PEGG (1999).....	108
<b>Figura 24.</b> Representação da via metabólica da fenilalanina, envolvida com a síntese de dopamina (adaptado de COLEMAN e NECKAMEYER (2005).....	112
<b>Figura 25.</b> Metabolismo da serina no cérebro, adaptado de SCHELL, 2004.....	116
<b>Figura 26.</b> Biossíntese da asparagina a partir de oxaloacetato.....	117
<b>Figura 27.</b> Segmento da rota metabólica da biossíntese da arginina. Os círculos em vermelho representam as mudanças metabólicas que são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), de acordo com os dados metabolômicos obtidos por LC-ESI-MS/MS, para abelhas submetidas ao ensaio comportamental de extensão da probóscide e os indivíduos controle. Em azul são os metabólitos que diminuíram de concentração; em cinza são os metabólitos que não sofreram alteração significativa de concentração; o círculo vermelho representa os compostos identificados apenas no grupo REP; o círculo azul representa os compostos identificados apenas no grupo controle; os restantes dos compostos não foram monitorados (metabólitos sem círculos). Os dados estatísticos utilizados nessa figura foram obtidos das tabelas 10 e 14...	120
<b>Figura 28.</b> Segmento da rota metabólica da arginina e prolina. Os círculos em vermelho representam as mudanças metabólicas que são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), de acordo com os dados metabolômicos obtidos por LC-ESI-MS/MS, para abelhas submetidas ao ensaio comportamental de extensão da probóscide e os indivíduos controle. Em azul são os metabólitos que diminuíram de concentração; em cinza são os metabólitos que não sofreram alteração significativa de concentração; o círculo vermelho representa os compostos identificados apenas no grupo REP; o círculo azul representa os compostos identificados apenas no grupo controle; os restantes dos compostos não foram monitorados (metabólitos sem círculos). Os dados estatísticos utilizados nessa figura foram obtidos das tabelas 10 e 14...	121
<b>Figura 29.</b> Distribuição dos diferentes neurotransmissores e neuromoduladores no AL-D: lobo antenal direito (em azul) e AL-E: lobo antenal esquerdo (em vermelho).....	125

## LISTA DE TABELAS

<p><b>Tabela 1.</b> Esquema de classificação dos parâmetros avaliados. dRT – Diferença entre o tempo de retenção medido e esperado (minutos); RTT1 – Valor de tolerância no tempo de retenção subcrítico; RTT2 – Valor de tolerância no tempo de retenção crítico; <math>dm/z</math> – Diferença entre o valor de <math>m/z</math> calculado e medido (em mDa); MT1 – Valor de tolerância de massa subcrítico; MT2 – Valor de tolerância de massa crítico; S – Valor de mSigma ; ST1 – Valor de mSigma subcrítico; ST2 – Valor de <math>mSigma</math> crítico.....</p>	44
<p><b>Tabela 2.</b> Esquema geral de escores das identificações baseado nos parâmetros analíticos considerados na Tabela 1.....</p>	45
<p><b>Tabela 3.</b> Esquema geral de escore das identificações obtidas através da biblioteca criada sem a utilização de padrões sintéticos, baseado nos parâmetros analíticos considerados na Tabela 1</p>	47
<p><b>Tabela 4.</b> Condição cromatográfica utilizando-se ácido fórmico como reagente de pareamento iônico.....</p>	55
<p><b>Tabela 5.</b> Condição cromatográfica utilizando-se HFBA como reagente de pareamento iônico.</p>	56
<p><b>Tabela 6.</b> Relação dos padrões utilizados para a construção da biblioteca de metabólitos, com seus respectivos valores de <math>m/z</math> na forma <math>[M+H]^+</math>, o tempo de retenção em minutos (RT) para cada composto, a fórmula molecular e os íons-fragmento (Q1, Q2, Q3).....</p>	61
<p><b>Tabela 7.</b> Tabela contendo os coeficientes de correlação das curvas de calibração, e os valores de coeficientes angulares das curvas de calibração para os diferentes compostos da biblioteca..</p>	63
<p><b>Tabela 8.</b> Compostos identificados no cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> (Controle 1 e Controle 2) por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos [<b>Escore</b> – Escore da identificação (de acordo com a tabela 2); <b>RT meas.</b> – tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); <b>RT esp.</b> – tempo de retenção esperado para o composto (em minutos); <b>d RT</b> – variação no tempo de retenção (em minutos); <b><math>m/z</math> calc.</b> – <math>m/z</math> teórico; <b><math>m/z</math> meas.</b> – <math>m/z</math> medido experimentalmente; <b>ng/cérebro</b> – valor resultante da média entre Controle 1 e Controle 2; <b>Desvio Padrão</b> – calculado a partir dos valores das concentrações do composto por cérebro obtidos no Controle 1 e Controle 2; <b>Q1, Q2 e Q3</b> – íons-fragmento considerados para a biblioteca (de acordo com a tabela 5); <b>Área</b> – média das áreas cromatográficas obtidas para o mesmo composto no Controle 1 e Controle 2].....</p>	66
<p><b>Tabela 9.</b> Compostos identificados no cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> (REP 1 e REP 2) por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos [<b>Escore</b> – Escore da identificação (de acordo com a tabela 2); <b>RT meas.</b>– tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); <b>RT esp.</b> – tempo de retenção esperado para o composto (em minutos); <b>d RT</b> – variação no tempo de retenção (em minutos); <b><math>m/z</math> calc.</b> – <math>m/z</math> teórico; <b><math>m/z</math> meas.</b> – <math>m/z</math> medido experimentalmente; <b>ng/cérebro</b> – valor resultante da média entre REP 1 e REP 2; <b>Desvio Padrão</b> – calculado a partir dos valores das concentrações do composto por cérebro obtidos em REP 1 e REP 2; <b>Q1, Q2 e Q3</b> – íons-fragmento considerados para a biblioteca (de acordo com a tabela 5); <b>Área</b> – média das áreas cromatográficas obtidas para o mesmo composto em REP 1 e REP2].....</p>	68
<p><b>Tabela 10.</b> Resultado do teste estatístico <i>t</i> de <i>Student</i>. para a comparação entre os resultados dos grupos controle e REP. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de <math>p &lt; 0,05</math> (Valores assinalados com *)......</p>	70
<p><b>Tabela 11.</b> Metabólitos que compõem a biblioteca construída sem a utilização de padrões sintéticos, com suas respectivas fórmulas moleculares e valores de <math>m/z</math> na forma <math>[M+H]^+</math>.....</p>	73

<b>Tabela 12.</b> Compostos identificados no cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> (Controle 1 e Controle 2) por LC-ESI-MS e MS <sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos criada sem a utilização de padrões sintéticos [ <b>Escore</b> – Escore da identificação (de acordo com a tabela 3); <b>RT meas.</b> – tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); <b>m/z calc.</b> – m/z teórico; <b>m/z meas.</b> – m/z medido experimentalmente; <b>ng/cérebro</b> – valor resultante da média entre Controle 1 e Controle 2; <b>Desvio Padrão</b> – calculado a partir dos valores das concentrações do composto por cérebro obtidos no Controle 1 e Controle 2; <b>Área</b> – média das áreas cromatográficas obtidas para o mesmo composto no Controle 1 e Controle 2].....	74
<b>Tabela 13.</b> Compostos identificados no cérebro de abelhas <i>A. mellifera</i> (REP 1 e REP 2) por LC-ESI-MS e MS <sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos [ <b>Escore</b> – Escore da identificação (de acordo com a tabela 2); <b>RT meas.</b> – tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); <b>RT esp.</b> – tempo de retenção esperado para o composto (em minutos); <b>d RT</b> – variação no tempo de retenção (em minutos); <b>m/z calc.</b> – m/z teórico; <b>m/z meas.</b> – m/z medido experimentalmente; <b>ng/cérebro</b> – valor resultante da média entre REP 1 e REP 2; <b>Desvio Padrão</b> – calculado a partir dos valores das concentrações do composto por cérebro obtidos em REP 1 e REP 2; <b>Q1, Q2 e Q3</b> – íons-fragmento considerados para a biblioteca (de acordo com a tabela 5); <b>Área</b> – média das áreas cromatográficas obtidas para o mesmo composto em REP 1 e REP2].....	75
<b>Tabela 14.</b> Resultado do teste estatístico <i>t</i> de Student, para os compostos identificados a partir da biblioteca criada sem a utilização de padrões comerciais. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$ (valores assinalados com *)......	76
<b>Tabela 15.</b> Média das intensidades* dos metabólitos (incluindo a média da intensidade do IS) nas 18 diferentes regiões do cérebro de <i>A. mellifera</i> para o grupo controle.....	101
<b>Tabela 16.</b> Média das intensidades dos metabólitos (incluindo a média da intensidade do IS) nas 18 diferentes regiões do cérebro de <i>A. mellifera</i> para o grupo REP.....	101
<b>Tabela 17.</b> Normalização dos valores de intensidade média dos metabólitos nas 18 regiões do cérebro com base no valor de intensidade do IS, para os indivíduos do grupo controle. Para cada ROI, o valor da intensidade média dos metabólitos foi dividido pelo valor de intensidade média do IS dentro do mesmo ROI. Os valores de intensidade normalizado para os compostos não detectados por MALDI MSI receberam o valor 0,0.....	102
<b>Tabela 18.</b> Normalização dos valores de intensidade média dos metabólitos nas 18 regiões do cérebro com base no valor de intensidade do IS, para os indivíduos do grupo REP. Para cada ROI, o valor da intensidade média dos metabólitos foi dividido pelo valor de intensidade média do IS dentro do mesmo ROI. Os valores de intensidade normalizado para os compostos não detectados por MALDI MSI receberam o valor 0,0.....	102
<b>Tabela 19.</b> Divisão entre os valores normalizados de intensidade obtidas para o grupo REP pelos valores normalizados de intensidade obtidos para o grupo controle.....	103
<b>Tabela 20.</b> Logarítmo na base 10 do resultado da divisão entre os valores normalizados de intensidade obtidas para o grupo REP pelos valores normalizados de intensidade obtidos para o grupo controle.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
[M+H] <sup>+</sup>	Molécula protonada
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µLC	Micro cromatografia líquida
µm	Micrômetro
µs	Micro segundo
2-FEA	2-feniletilamina
5-HT	Serotonina
Ach	Acetilcolina
ADC	Arginine decarboxylase
AIH	Agmatina deiminase
AMP	Adenosine monofosfato
ATP	Adenosine trifosfato
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand Incubator
bbCID	<i>Broadband Collision Induced Dissociation</i>
BPC	Cromatograma do pico base
C <sub>18</sub>	Ocatdecil
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada com espectrômetro de massas
ChIP	Chemical inkjet printer
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CPA	N-carbamoilputrescina
D-	Destrógiro
DA	Dopamina
Da	Daltons
DDC	Decarboxylase DOPA
DHB	ácido 2,5-dihidroxi benzóico
<i>dm/z</i>	Diferença entre o valor de <i>m/z</i> calculado e medido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOPA	Dihidroxi fenilalanina
dRT	Diferença entre o tempo de retenção medido e esperado
EC	Estímulo condicionado
EIC	cromatograma de íon extraído
eV	Eletrovolts
GABA	Ácido gama-aminobutírico

GC/MS	Cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massas
GDP	Guanosina difosfato
Glu	Glutamato
Glu-Cl	Glutamato-cloro
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
H&E	hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O	Molécula de água
HA	Histamina
HFBA	Ácido heptafluorbutírico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HUPO-PSI	<i>Human Proteome Organization-Proteomics Standards Initiative</i>
Hz	Hertz
IPC	cromatografia de par-iônico
IR	Espectroscopia infravermelho
kDa	Quilo Daltons
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	Litro
L-	Levógiro
LC/ESI-MS	Cromatografia líquida combinada com Espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo eletrospray
LC-RMN	Cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear
LDC	Lysine decarboxylase
LTP	<i>Long term memory</i> ou memória de longo prazo
M	Molar
m/v	Massa por volume
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MALDI	Ionização a laser assistida por Matriz
max	Max of window
mDa	Mili Daltons
MeCN	Acetonitrila
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	mililitro
mm	milímetros
Mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
MRI	imagens por ressonância magnética
MS	Espectrometria de massas

MS <sup>2</sup>	Espectrometria de massas sequencial
MSI	MALDI Spectral Imaging
MT1	Valor de tolerância de massa subcrítico
MT2	Valor de tolerância de massa crítico
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NC	Estímulo não condicionado
NIR	Infravermelho próximo
nL	Nanolitro
OA	Octopamina
ODC	Ornitina decarboxylase
ON	Óxido nítrico
ONS	ON syntetase
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PI	Padrão interno
pL	picolitro
ppm	Partes por milhão
Q	Íon-fragmento
REP	Reflexo de extensão de probóscide
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	ácido ribonucléico
ROI	região de interesse
RP-HPLC	cromatografia líquida de fase reversa
RT	Tempo de retenção
RTT1	Valor de tolerância no tempo de retenção subcrítico
RTT2	Valor de tolerância no tempo de retenção crítico
S	Valor de mSigma
S/R	Relação sinal/ruído
SAM	s-adenosilmetionina
SNC	Sistema nervoso central
SPDS	Espermidina sintase
SPMS	Espermine sintase
SR	Serina racemase
ST1	Valor de mSigma subcrítico
ST2	Valor de mSigma crítico
TA	Tiramina
TCA	Ácido tricarbóxico
TFA	ácido trifluoroacético

TH	Tirosina hidroxilase
ToF	Time of flight
UFLC	cromatografía líquida ultrarrápida
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 A importância do comportamento Reflexo de Extensão de Probóscide em estudos de aprendizagem e memória em abelhas.....	20
1.2 Metabolômica.....	23
1.3 Metabólitos envolvidos em processos cognitivos em abelhas.....	26
1.4 Imageamento por espectrometria de massas.....	28
1.4.1 Algoritmos e formato de dados para realização de MALDI MSI.....	29
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Material biológico.....	38
3.2 Reflexo de Extensão da Probóscide (REP).....	38
3.3 Preparação dos extratos de metabólitos para análise em LC-ESI-MS e MS <sup>2</sup> ..	39
3.4 Cromatografia líquida ultra rápida (UFLC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução.....	40
3.5 Construção da biblioteca e quantificação dos metabólitos.....	41
3.6 Identificação dos Metabólitos.....	42
3.7 Construção de nova biblioteca sem a utilização de padrões sintéticos.....	46
3.8 Análise dos dados de LC-ESI-MS e MS <sup>2</sup> ..	47
3.9 MALDI Imaging.....	48
3.9.1 Obtenção de secções histológicas de cérebro de <i>Apis mellífera</i> .....	48
3.9.2 Imageamento dos metabólitos por MALDI MSI.....	49
3.9.3 Processamento dos dados de MALDI MSI.....	50
3.9.4 Análise das Imagens.....	50
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Ensaio Comportamental de Reflexo de Extensão da Probóscide (REP).....	53

4.2 Análises em micrOToF-QIII: método de preparação de amostra e construção da biblioteca de metabolitos.....	53
4.3 Desenvolvimento do método de cromatografia líquida ultrarrápida (UFLC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução.....	54
4.3.1 A cromatografia de par-iônico (IPC) e o aumento no tempo de retenção dos compostos.....	54
4.3.2 Análise de espectrometria de massas de alta resolução.....	60
4.4 Construção da biblioteca de metabólitos utilizando-se padrões sintéticos.....	60
4.4.1 Compostos identificados.....	65
4.4.2 Análise estatística.....	69
4.5 Construção de biblioteca de metabólitos sem a utilização de padrões sintéticos.....	72
4.6 Resultados das análises de MALDI MSI: Método de preparação de amostra para MALDI MSI, distribuição de metabolitos no cérebro, e análise do perfil metabolômico.....	78
4.7 Desenvolvimento do método de MALDI MSI semi-quantitativo.....	82
4.8 Parâmetros de processamento dos dados de MALDI MSI no algoritmo MSiReader.....	84
4.9 Compostos identificados exclusivamente por MALDI MSI.....	91
4.10 Semi-quantificação de neurotransmissores e neuromoduladores por MALDI-MSI.....	97
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	105
5.1 Perfil metabólico do cérebro de abelhas.....	105
5.1.1 Papel da glicose no metaboloma do cérebro de abelhas.....	106
5.1.2 Arginina e algumas poliaminas no metaboloma do cérebro de abelhas.....	107
5.1.3 Fenilalanina no metaboloma do cérebro de abelhas.....	112
5.1.4 Betaína no metaboloma do cérebro de abelhas.....	113
5.1.5 Uracila no metaboloma do cérebro de abelhas.....	114

5.1.6 Serina no metaboloma do cérebro de abelhas.....	114
5.1.7 Asparagina no metaboloma do cérebro de abelhas.....	116
5.1.8 Guanosina Monofosfato no metaboloma do cérebro de abelhas.....	117
5.2 Principais rotas metabólicas no cérebro de abelhas envolvidas no comportamento REP.....	119
5.3 Aplicação da técnica de MALDI MSI semi-quantitativo na compreensão da distribuição regionalizada de metabólitos no cérebro de abelhas.....	122
6 CONCLUSÕES.....	127
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
ANEXO I - Curvas De Calibração.....	144
ANEXO II – Imagens Geradas por Espectrometria de Massas dos Metabólitos .....	167

## 1 INTRODUÇÃO

Décadas de estudos com invertebrados têm estabelecido alguns animais, tais como algumas moscas e abelhas, como modelos robustos, confiáveis e influentes para o estudo da neurobiologia. Ao longo das últimas décadas, pode-se observar um aumento significativo da aceitação desses animais, por diversas razões, como modelos de elevado potencial para o entendimento de questões básicas na biologia, particularmente no nível comportamental, neural e molecular, o que tem proporcionado à adoção de novas ideias e conceitos no estudo do comportamento e da neurobiologia. Depois de um prolongado ceticismo, pode-se observar que o tipo de contribuição de alguns invertebrados para o desenvolvimento da neurociência está mudando e ganhando importância (MENZEL e ERBER, 1978; MENZEL e GIURFA, 2001; SATTELLE e BUCKINGHAM, 2006).

As abelhas (*Apis mellifera*) são organismos caracterizados por apresentarem um sistema nervoso estruturado de forma simples, com poucos neurônios, por apresentarem uma riqueza comportamental e uma impressionante capacidade cognitiva (MENZEL e GIURFA, 2001). Dotados de um cérebro com volume menor que 1 mm<sup>3</sup>, as abelhas apresentam aproximadamente 950.000 neurônios e, apesar de aparentarem ter uma capacidade cognitiva limitada, esses organismos apresentam um repertório comportamental extremamente complexo, plástico e rico (MENZEL, LEBoulLE e EISENHARDT, 2006).

A maior parte dos estudos realizados com este grupo animal e que objetivam a compreensão do aprendizado e da memória, são realizados a partir de ensaios comportamentais em que a capacidade de cognição é analisada. Abelhas são capazes de aprender uma série de tarefas, se treinadas para tal. Além disso, observa-se que atualmente as abelhas têm sido amplamente utilizadas como modelos de aprendizagem e memória, destacando a sua utilidade para a neurociência, em particular para o melhor entendimento das bases da cognição (MENZEL e GIURFA, 2001; GIURFA, 2003; MENZEL et al., 2006; MENZEL, 2012).

### 1.1 A importância do comportamento Reflexo de Extensão de Probóscide em estudos de aprendizagem e memória em abelhas

As abelhas são os animais que apresentam a estrutura social melhor organizada, de modo que as interações entre os indivíduos produzem uma estruturada divisão de trabalho, que se correlaciona com a idade do indivíduo e com mudanças na fisiologia e

na expectativa de vida. Esses organismos, assim como os demais animais sociais, necessitam de uma refinada capacidade cognitiva, que por sua vez é fundamental para a intensa comunicação entre os indivíduos da colônia, para o reconhecimento espacial, para a navegação durante o comportamento de exploração, para o forrageamento, para a defesa da colônia, dentre outras funções executadas por esses animais (MENZEL e GIURFA, 2001; GIURFA, 2003).

Apresentando um sofisticado sistema sensorial e uma boa capacidade de aprendizagem e memória, as abelhas possuem mecanismos essenciais de funcionamento do sistema nervoso que não diferem drasticamente daqueles de vertebrados. Processos comportamentais que variam da coleta de informações através da percepção e da tomada de decisão, até a adoção de ações adequadas permitem ao animal lidar com um ambiente em mudança, corroborando para o grande sucesso evolutivo desses animais (MENZEL e GIURFA, 2001). Além disso, as abelhas são excelentes modelos, porque a capacidade de aprendizado pode ser avaliada tanto no campo quanto em condições laboratoriais, permitindo sua utilização concomitante em análises fisio-farmacológicas (MENZEL e GIURFA, 2001; MENZEL, LEBoulLE e EISENHARDT, 2006).

Segundo Menzel e colaboradores (2006) o aprendizado envolve o reconhecimento de odores, cores, formas e texturas, sendo que os odores desempenham o papel mais proeminente, uma vez que são prontamente associados ao néctar ou ao pólen.

Inicialmente, as habilidades olfativas das abelhas foram reconhecidas experimentalmente por Karl von Frisch (1919), que desenvolveu ensaios nos quais esses insetos voavam livremente e visitavam um alimentador artificial que continha vários óleos essenciais (misturas de odores). Von Frisch observou pela primeira vez que depois da aprendizagem e associação de um odor com uma solução de sacarose, as abelhas preferiam esse odor aos demais, mostrando claramente a discriminação de odores. No entanto, esse experimento com abelhas de voo livre não permitiu reprodutibilidade suficiente para um entendimento preciso da percepção olfativa. Foi o desenvolvimento do “experimento de condicionamento da extensão da probóscide por reflexo” (REP) que permitiu pela primeira vez, o estudo preciso do percentual de relação entre os odores, em uma escala muito maior em termos de número de odores testado e de animais (KRISTON, 1971; LASKA et al., 1999).

Uma abelha faminta estende sua probóscide por reflexo quando os receptores de sacarose da antena, ou de partes da boca são estimulados. No condicionamento Pavloviano da extensão da probóscide por reflexo (REP), um odor (estímulo

condicionado - EC) é associado a uma solução de sacarose (estímulo não condicionado - NC) (BITTERMAN et al., 1983; GIURFA, 2007). Mais recentemente, um novo protocolo de aprendizagem olfativa aversiva foi desenvolvido, no qual o odor (estímulo condicionado) é associado com um leve choque elétrico (estímulo não condicionado), avaliando-se o reflexo de ferrear das abelhas (VERGOZ et al., 2007).

Nesse contexto, o sistema nervoso opera decodificando/associando estímulos oriundos do ambiente, que após serem processados formando a percepção, permitem ao animal tomar decisões complexas e adaptar seu comportamento. Na natureza esse processamento de informações é utilizado para diversas tarefas, tais como identificações de fontes de alimento, detecção de predadores, reconhecimento de parceiros em potencial, para a interação social, dentre outras. Os aspectos que envolvem a transformação, da detecção química até a geração da percepção, tanto em insetos como em vertebrados, tem sido alvo de intensa investigação (GIURFA, 2007).

Para o estímulo olfativo sabe-se que o primeiro processamento é o mapeamento do espaço físico de moléculas odoríferas através dos receptores olfativos. Esse processo envolve a detecção de características particulares das moléculas de odor por receptores proteicos dedicados, que conduzem, através de transdução do sinal, a ativação de grupos de células receptoras. Este conjunto de sinais funciona como um código, que será então transportado para uma série de estruturas cerebrais, e ficarão sujeitas a tratamento e decodificação do odor. Posteriormente, essas representações serão mapeadas para o espaço perceptivo, envolvido na decisão comportamental, associando a qualidade do odor com o valor prazeroso e assim, aprendendo as relações existentes entre os odores e os resultados fisiológicos e comportamentais (SANDOZ, 2012).

Em abelhas, assim como em outras espécies, a indução de diferentes fases da memória depende de diversos parâmetros, tais como o número e a sucessão de tentativas de treino. De acordo com Müller (2012), através do emprego de técnicas para monitorar e manipular a atividade de cascata de sinalização em abelhas, parâmetros de treinamento podem estar ligados à modulação temporal da cascata de sinalização que contribuem para as diferentes fases da memória. Há diversas indicações de que exista uma rede dinâmica de eventos de sinalização, que ocorrem nos lobos antenais e corpos pedunculados, necessários para a indução e a manutenção da memória em fases distintas (MÜLLER, 2012).

No nível comportamental, pelo menos três fases da memória distintas podem ser identificadas: a *memória de curto prazo* - em nível de minutos; a *memória de médio prazo* - em nível de horas; e *memória de longo prazo* - em nível de dias e semanas

(MÜLLER, 2012). Através do condicionamento por REP, por exemplo, um único treinamento (um estímulo condicionante e outro estímulo não condicionante) leva a uma resposta que dura algumas horas em mais de 50% dos animais. Vários estágios de treinamento induzem a formação da memória de médio prazo, em seguida essa memória é consolidada, dando origem à memória de longo prazo, que dura por dias (NGUYEN et al., 1994).

De modo geral, o processamento olfativo segue diferentes passos, da detecção das moléculas, via processamento primário nas redes neurais dos lobos antenais, até o estabelecimento de representações olfativas em regiões centrais do sistema nervoso (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). Nesse processo, diversas biomoléculas são fundamentais, tais como proteínas (receptoras) e metabólitos (transmissores). Diversos experimentos têm demonstrado as diferentes funções do sistema de transmissão na modulação da cognição. No cérebro de abelhas, pelo menos dois tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina foram identificados; um está envolvido com o processo de recuperação da memória e outro está relacionado com o processo de formação da memória de longo prazo (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). A via de processamento de recompensa depende muito da neuromodulação octopaminérgica (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012); a serotonina prejudica a resposta condicionada durante a aquisição da memória (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). As funções da dopamina mediando o comportamento aversivo, e da octopamina mediando a aprendizagem apetitiva ainda precisam ser analisados (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). Vários estudos indicam que os receptores de GABA (ácido gama-aminobutírico) desempenham um papel central durante a aprendizagem olfativa, porém a função específica da inibição/ativação dos mesmos ainda não está clara (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). Os receptores de glutamato, tanto excitatórios quanto inibitórios, são necessários para algumas formas de aprendizagem e para a recuperação da memória (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

## **1.2 Metabolômica**

O termo metabolômica foi introduzido pela primeira vez na literatura científica por Oliver et al. (1998), que cunharam esse termo e definiram que a medida da mudança nas concentrações relativas dos metabólitos, como sendo o resultado da deleção ou super-expressão de um gene, permitindo a localização de um novo produto gênico (ou inibidor) em um mapa metabolômico.

Os estudos no campo da genômica, transcriptômica e proteômica são baseados na análise química de biopolímeros compostos de quatro diferentes nucleotídeos (genômica e transcriptômica) ou 20 aminoácidos (proteômica). Esses compostos são altamente similares quimicamente, facilitando sua análise. Dentro da metabolômica, no entanto, existe uma grande variação nas estruturas e propriedades químicas (massa molecular, polaridade, solubilidade), e físicas (volatilidade) dos diferentes metabólitos (DUNN e ELLIS, 2005; DUNN et al., 2012). Desse modo o perfil metabolômico consiste-se de compostos químicos de baixas massas moleculares, altamente diversos, que vão desde compostos iônicos a carboidratos, álcoois e cetonas, aminoácidos, lipídeos hidrofóbicos, e produtos naturais complexos, que estão presentes em uma célula e que são participantes de reações metabólicas gerais, exigidas para a manutenção, crescimento e função normal da célula (DUNN e ELLIS, 2005; DUNN et al., 2012). Essa complexidade torna virtualmente impossível determinar simultaneamente o metaboloma completo. Todavia, o metaboloma tem sido estudado com métodos de preparação de amostras eficientes, e com extrações seletivas acopladas a técnicas analíticas modernas, para a aquisição do máximo de informação possível.

Em um experimento de metaboloma (obtenção e preparação da amostra, análise instrumental, processamento de dados e interpretação dos resultados), geralmente, procura-se identificar e quantificar um conjunto de metabólitos em um sistema celular, que pode ser definido como um tipo celular ou tecido em um determinado estado, em um determinado tempo. Uma característica importante dessas análises é que a análise metabolômica não é espécie-específica, portanto, a partir do momento em que os parâmetros de análise são otimizados, esses mesmos parâmetros serão aplicáveis a procariotos, fungos, plantas e animais (HOLLYWOOD, BRISON e GOODACRE, 2006). Nesse contexto, devemos considerar, também, que a expressão de metabólitos varia de acordo com as necessidades de um determinado organismo em relação às condições ambientais e ao período em que esse organismo foi obtido, ou está sendo mantido.

Historicamente, a maior parte dos estudos de metabólitos foi realizada utilizando-se da combinação das técnicas de Cromatografia Gasosa Capilar de alta resolução, combinada com Espectrometria de Massas (GC/MS) (WANT et al, 2006; RAAD, FISCHER e NORTHEN, 2016). O sistema de GC/MS é composto de um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (geralmente com ionização por impacto eletrônico), e a um analisador de massas quadrupolo. O cromatógrafo gasoso utiliza uma coluna capilar, onde os compostos serão separados a partir de uma mistura

complexa, que serão analisados pelo detector de massas, permitindo a identificação de moléculas-chave, incluindo ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos em biofluidos e provendo informações diagnósticas para diversas desordens metabólicas (SCHAUER et al., 2005; WANT et al, 2006).

Apesar de ser uma técnica mais antiga, a técnica de GC/MS é ainda muito empregada, particularmente em metabolismo de plantas, porém existem algumas limitações em relação ao tamanho e tipo do metabólito que pode ser analisado por essa técnica, e a preparação extensiva necessária a tal finalidade. Isso levou a utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como uma ferramenta de análise de perfil metabólito, em especial de compostos desconhecidos; porém, em detrimento de ser muito informativa em relação à estrutura química de moléculas, a RMN possui sensibilidade limitada e baixa resolução, fazendo com que somente os compostos mais abundantes da amostra possam ser identificados. Em contraste, a espectrometria de massas, em particular a interface LC/ESI-MS, oferece a habilidade de se analisar uma ampla gama de compostos, bem como uma excelente quantificação, reprodutibilidade e sensibilidade (WANT et al, 2006). Essas características fornecem a possibilidade de confirmar a presença de compostos presentes em amostras biológicas complexas e, em muitos casos, possibilita identificar compostos desconhecidos e inesperados. Nesse contexto, a combinação de técnicas de separação (cromatografia) com a espectrometria de massas expande imensamente a capacidade da análise química de amostras biológicas extremamente complexas (VILLAS-BÔAS et al, 2005).

Segundo revisão de Birkemeier e colaboradores (2005) as abordagens metabolômicas estão em desenvolvimento dinâmico e uma grande variedade de plataformas analíticas tem sido introduzida, incluindo espectroscopias em diversas faixas de comprimentos de ondas eletromagnéticas, como estudo do perfil metabólico com a utilização de espectroscopia no infravermelho (IR), infravermelho próximo (NIR) ou ultravioleta (UV), além de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização do tipo “eletrospray” (LC-ESI-MS), eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas (CE-MS) ou cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear (LC-RMN), somente mencionando algumas dessas abordagens. Não existe uma única abordagem que permita a análise do metaboloma completo, que inclui a ampla gama de biomoléculas que são quimicamente diferentes (BIRKEMEYER et al., 2005; RAAD, FISCHER e NORTHEN, 2016).

De acordo com Hollywood e colaboradores (2006), após escolhido a metodologia de análise metabolômica, o próximo passo deve ser a escolha entre as diversas estratégias de análise que estão sendo desenvolvidas dentro do campo da metabolômica. Fiehn e colaboradores (2002) definiram algumas dessas diferentes abordagens para a análise metabolômica: (i) análise do alvo metabolômico; (ii) perfil de metabólitos; (iii) metabolômica propriamente dita; (iv) *fingerprinting* metabólico, dentre outros. Para Villas-Bôas e colaboradores (2005), do ponto de vista metodológico existem apenas duas diferentes estratégias: (i) análise do alvo metabolômico e (ii) a análise do perfil de metabólitos. A análise do alvo metabolômico é restrita a análise quantitativa de classes de compostos que estão relacionados com uma ou mais vias metabólicas e que são produzidos em uma célula/tecido. Essa análise é muito útil para o estudo do efeito primário de uma alteração gênica, e os procedimentos analíticos devem incluir a identificação e quantificação absoluta dos metabólitos de interesse (VILLAS-BÔAS et al, 2005). A análise do perfil de metabólitos, por outro lado, envolve uma análise, normalmente não quantitativa, de um grande número de diferentes metabólitos com o objetivo de identificar um perfil específico que caracterize uma dada amostra (VILLAS-BÔAS et al, 2005). No presente estudo a estratégia adotada foi a da análise do alvo metabolômico.

### **1.3 Metabólitos envolvidos em processos cognitivos em abelhas**

Os neurônios presentes no cérebro de abelhas utilizam os mesmos neurotransmissores que estão presentes no cérebro de mamíferos. Os neurotransmissores clássicos, tais como a acetilcolina (ACh), glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), e neuromoduladores como a serotonina (5-HT) e a dopamina (DA), estão presentes tanto em insetos quanto em mamíferos. Os neurotransmissores excitatórios são o ACh no sistema nervoso central (SNC) e o glutamato (Glu), nas junções neuromusculares (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). A modulação inibitória é mediada por GABA e por canais de glutamato-cloro (receptores Glu-Cl) (GALIZIA, EISENHARDT e GIURFA, 2012). A DA, 5-HT, octopamina (OA), tiramina (TA), Histamina (HA) são conhecidas como aminas biogênicas, e estão presentes no sistema nervoso central de insetos (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). Para os diferentes transmissores, funções distintas durante a aprendizagem e a formação da memória foram identificadas em moscas e abelhas (SCHEINER, BAUMANN e BLENAU, 2006).

Diversos estudos demonstram que as aminas biogênicas estão crucialmente envolvidas com a aprendizagem, modulando funções cerebrais de várias formas (SCHEINER, BAUMANN e BLENAU, 2006; GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). A dopamina e a serotonina estão presentes em altas concentrações no cérebro, enquanto octopamina e tiramina são pouco abundantes (SCHEINER, BAUMANN e BLENAU, 2006). A octopamina é uma molécula chave no controle do comportamento em abelhas; geralmente apresenta efeito excitatório e aumenta a sensibilidade dos *inputs* sensoriais, melhorando o desempenho na aprendizagem e aumentando o comportamento de forragear (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012). Experimentos demonstram que a octopamina seja um transmissor neuromodulador chave na mediação da recompensa durante a aprendizagem apetitiva clássica em abelhas (HAMMER, 1993; HAMMER e MENZEL, 1998). Sugere-se que a tiramina atue de forma antagônica a octopamina, todavia poucas informações estão disponíveis para essa amina. A DA e a 5-HT normalmente apresentam efeito antagônico ou inibitório quando comparadas com OA (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

O neurotransmissor acetilcolina encontra-se amplamente distribuído no cérebro de abelhas. Experimentos demonstraram a existência de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, ambos apresentando papéis diferentes durante a aprendizagem associativa e não-associativa, durante a recuperação e formação da memória (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012; GAUTHIER, 2010).

Em abelhas, assim como nos demais insetos, o glutamato é um neurotransmissor excitatório nas junções neuromusculares, todavia, há evidências consideráveis que indicam que essa molécula possa atuar como um neurotransmissor no SNC de insetos (GALIZIA, EISENHARDT e GIURFA, 2012). Sugere-se, também, que os receptores de glutamato estejam envolvidos nos processos de aquisição de memória e aprendizagem. Em cultura de neurônios, o glutamato normalmente induz inibição pós-sináptica através da ativação de receptores GluCl (LEBOULLE, 2012). A função desses receptores inibitórios de glutamato na aprendizagem olfativa foi investigada através da injeção no cérebro de antagonista desses receptores, denominado ivermectina (LEBOULLE, 2012). Baixas doses de ivermectina diminuíram a memória de longo prazo, enquanto que altas doses reestabelece o desempenho da mesma. Esse reestabelecimento provavelmente ocorreu através da ativação de receptores GABA (EL HASSANI et al., 2008).

De modo semelhante ao que ocorre no SNC de vertebrados, a neurotransmissão inibitória em insetos é proporcionada principalmente por receptores de ácido gama-

aminobutírico tipo A (receptores GABA<sub>A</sub>). Através da imuno-histoquímica, a presença de GABA foi identificada em todas as principais áreas nervosas de abelhas, concentrando-se mais em interneurônios dos lobos antenais e em neurônios de *feedback* dos corpos pedunculados (BICKER, 1999). Em abelhas, os receptores GABA<sub>A</sub> parecem ser necessários para uma discriminação fina de odores (STOPFER et al., 1997); a inibição desses receptores pode prejudicar o papel dos mesmos na aprendizagem olfativa dos insetos (SACHSE e GALIZA, 2002). Estudos farmacológicos com o inseticida fipronil, que age bloqueando os canais de cloro, demonstraram que esse inseticida prejudica a memória tátil (BERNADOU et al., 2009) e a memória olfativa (EL HASSANI et al., 2005; EL HASSANI et al., 2009), a habilidade de orientação em labirintos (DECOURTYE et al., 2009), e o voo de retorno para a colônia (DECOURTYE et al., 2011).

#### **1.4 Imageamento por espectrometria de massas**

O imageamento por espectrometria de massas (*Mass spectrometry imaging* - MSI) tem emergido como uma importante ferramenta analítica na última década, mostrando informações valiosas em vários campos do conhecimento devido a sua capacidade única de fornecer informações multicomplexas sem a necessidade de marcação ou coloração (WU et al., 2013). A espectrometria de massas pode gerar perfis que contêm centenas de biomoléculas diretamente a partir de um tecido, e através da correlação espacial, revela como cada biomolécula varia entre amostras de tecidos, podendo ser representadas na forma de mapas bidimensionais - 2D - ou tridimensionais - 3D (SCHWAMBORN e CAPRIOLI, 2010a; GREER; STURM e LI, 2011; WU et al., 2013).

Ao longo dos últimos anos diversos de métodos para o estudo de moléculas *in situ* têm sido desenvolvidos, possibilitando a análise de uma variedade de moléculas por MSI (RUBAKHIN e SWEEDLER 2010). Essa tecnologia tem sido rotineiramente aplicada para análise de diversos compostos biológicos e não biológicos, tais como: proteínas, peptídeos, lipídeos, compostos de baixa massa molecular, nucleotídeos, metabólitos, cosméticos, dentre outros, devido a sua capacidade única de identificar e resolver espacialmente diferentes compostos simultaneamente (GREER; STURM e LI, 2011; ELEANOR et al.; 2013; YE et al, 2013a; OLIVEIRA et al, 2013; SCHWAMBORN e CAPRIOLI, 2010a).

Atualmente, a técnica de MALDI MSI vem sendo aplicada para o estudo de diferentes substâncias químicas, visando investigar os mais diversos mecanismos

neurobiológicos existentes. Sugiura e colaboradores (2011), por exemplo, utilizaram a técnica de MALDI MSI no estudo de metabólitos para investigar o metabolismo energético na região do hipocampo em cérebro de rato. Foram analisados os padrões de distribuição do ATP (trifosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina) e AMP (monofosfato de adenosina) em neurônios do hipocampo, assim como as mudanças na concentração relativa e distribuição dessas moléculas em ratos com convulsão induzida por Kainato (potente estimulador do sistema nervoso central). Os resultados demonstram uma redução considerável dos níveis de ATP e ADP (especialmente em células da camada CA3), mas não de AMP. Observou-se, também, uma diminuição na recuperação da energia após as convulsões, sugerindo um metabolismo específico das células CA3. Nesse estudo, a abordagem MALDI MSI revelou com sucesso a relação espaço-temporal do metabolismo energético no hipocampo de ratos com elevada resolução.

Um estudo recente utilizou o imageamento por espectrometria de massas na investigação da distribuição de neuropeptídeos, tais como as taquicininas e alostatinas no cérebro de abelhas *Apis mellifera* (Pratavieira et al., 2014). Nesse trabalho os neuropeptídeos AmTRP-5 e AST-1 foram monitorados via MALDI-MSI para o estudo do efeito dessas moléculas na ontogenia das abelhas. Esse estudo sugere que o AmTRP-5 age nos corpos pedunculados do cérebro de abelhas de 0-15 dias de idade possivelmente regulando atividades de limpeza e de cuidados dentro dos ninhos. A ocorrência do AmTRP-5 e AST-1 nos lobos antenais, gânglio subesofágico, medula, lobula e lobos  $\alpha$  e  $\beta$  em ambos os hemisférios cerebrais em abelhas de 20-25 dias sugere que a função desses neuropeptídeos possa estar relacionada com suas ações localizadas nessas regiões, regulando as atividades de forrageamento e de guarda. Desse modo, esses neuropeptídeos parecem ter funções no cérebro das abelhas que são especificamente relacionadas com a idade e com a divisão de trabalho dentro da colônia.

Em suma, o imageamento por espectrometria de massa é uma técnica poderosa com grande potencial para a investigação da dinâmica espaço-temporal dos processos bioquímicos em curso nos sistemas neurobiológicos e, embora ainda esteja em desenvolvimento, essa técnica mantém a promessa de inúmeras novas aplicações em neurociências.

#### **1.4.1 Algoritmos e Formato de dados para realização de MALDI MSI**

Com a evolução do imageamento por espectrometria de massas ao longo dos anos, o total de dados de alta resolução gerados nesses experimentos aumentou

significativamente. Dependendo de variações no tamanho da amostra, na resolução da imagem e na resolução dos espectros de massas, um único experimento de MSI pode gerar entre algumas dezenas até algumas centenas de gigabytes de informação. Esse aumento no volume e complexidade dos dados requer algoritmos dedicados, métodos específicos e uma excelente infraestrutura computacional específica para MSI. Com essa finalidade, foram desenvolvidos nos últimos anos diversos programas que auxiliam na interpretação e no gerenciamento de dados de MSI.

Em geral, existem três componentes de uma plataforma para MSI: (i) o instrumento que irá realizar a análise (o espectrômetro de massas), (ii) o algoritmo projetado para a aquisição dos dados de MSI, e (iii) o algoritmo de visualização, processamento e análise dos dados.

Os algoritmos de aquisição de dados de MSI permitem a delimitação da área de interesse (utilizando ferramentas semelhantes às encontradas em muitos algoritmos de marcação de imagem) e a definição da resolução lateral dentro dessa área. Estes algoritmos também controlam a aquisição automática dos espectros de massas em todas as coordenadas definidas experimentalmente. Uma vez que esses algoritmos são altamente integrados com os algoritmos de controle do instrumento, os fabricantes dos espectrômetros de massas normalmente fornecem os algoritmos de aquisição de dados de MSI junto com o equipamento. Alguns exemplos são: o FlexImaging (Bruker Daltonics), o Tissue-View (ABSciex), o ImageQuest (Thermo) e o Launchpad (Shimadzu).

Os algoritmos de visualização, processamento e análise dos dados geralmente são separados dos algoritmos de aquisição dos dados encontrados nos instrumentos comerciais. Além disso, como os algoritmos de MSI ainda estão em desenvolvimento existem diversos grupos de pesquisa, tanto nas universidades quanto no setor privado, que estão ativamente desenvolvendo e adaptando as novas tecnologias de algoritmos para suprir as necessidades atuais. Como resultado, observamos uma grande variedade de programas e de formatos utilizados para armazenar dados de MSI. Dadas todas as opções que estão disponíveis atualmente, torna-se cada vez mais importante a escolha correta dos algoritmos e do formato dos dados gerados que serão utilizados para cada aplicação específica da técnica de imageamento por espectrometria de massas.

O formato dos dados é extremamente importante no que diz respeito a sua portabilidade, e ao modo no qual os metadados (como, por exemplo, os parâmetros instrumentais e os detalhes da amostra) corretos são armazenados e recuperados durante uma análise de MSI. Uma das principais limitações dos algoritmos de MSI atuais é

trabalhar com uma enorme quantidade de dados gerados durante um único experimento de MSI. As limitações existem, por exemplo, quanto à demora excessiva para abrir um arquivo contendo todo o conjunto de dados, ou para navegar através de um determinado conjunto de dados. Até o momento, não existe um formato padrão para o armazenamento de dados de MSI, e tem havido inúmeros formatos propostos em literatura (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

A maioria dos espectrômetros de massas apresenta um formato de dado específico que é controlado por seu fabricante, o que faz com que os dados de MSI no formato nativo sejam bastante utilizados. Todavia, existem outras opções de formatos para exportação e manipulação dos dados que são denominados formatos abertos, ou seja, formatos que não são controlados e definidos por interesses particulares da empresa detentora de seus direitos, e que são mantidos por uma organização de padrões não proprietária. Dois dos formatos mais comuns abertos são o Analyze 7.5 e o imzML.

O formato Analyze 7.5 (ou IMG) foi originalmente desenvolvido pela clínica Mayo (uma organização sem fins lucrativos da área de serviços médicos e de pesquisa médico-hospitalar norte-americano), para o compartilhamento de imagens por ressonância magnética (MRI). Esse formato pode ser utilizado com eficiência para quase qualquer visualização e análise de imagens, independente da fonte dos dados da imagem. Não estando restrito para imagens biomédicas, o Analyze 7.5 tem sido utilizado com sucesso para tarefas de processamento e análise de imagens em campos não biomédicos, tais como na geologia, arqueologia, meteorologia, fotografia e em aplicações diversas no campo do imageamento por espectrometria de massas (MayoClinic.com).

Esse formato consiste de dois arquivos: (i) um arquivo binário (.img) que contém os dados “reais”, cujo tipo e ordenação dos dados são descritos pelo arquivo de cabeçalho; (ii) e um arquivo de cabeçalho (.hdr) que contém detalhes sobre a imagem, tais como a dimensão, identificação, o histórico de processamento e a posição dos pixels (espaçamento do spot, espaçamento linear, etc) (Analyze 7.5). Um terceiro arquivo (.t2m), que contém o conjunto de valores de  $m/z$  correlacionados com cada coordenada experimental, foi adicionado por Stoeckli e colaboradores em 2002 quando adaptaram o formato Analyze 7.5 para o imageamento por espectrometria de massa durante o desenvolvimento do algoritmo Biomap. A introdução precoce desse formato em relação ao desenvolvimento da técnica de MSI, e a disponibilidade de algoritmos livres que permitem a visualização de dados no formato IMG, fizeram com que esse formato seja amplamente utilizado e com que muitos fabricantes de algoritmos disponibilizem a

exportação dos dados brutos para o formato Analyze 7.5. Uma desvantagem do Analyze 7.5 é a quantidade limitada de metadados associados a esse formato de arquivo (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

Outro formato aberto é o imzML que foi desenvolvido em conformidade com os mesmos padrões propostos pela HUPO-PSI (*Human Proteome Organization-Proteomics Standards Initiative*) (DEUTSCH, 2008). Esse formato foi desenvolvido no âmbito do projeto Computis (RÖMPP et al., 2010; SCHRAMM et al., 2012), financiado pela União Europeia. O imzML é composto por dois arquivos diferentes: (I) o primeiro é o (.ibd) que contém os dados de espectrometria de massas; (II) o segundo é o arquivo XML (.imzML) que contém os metadados, tais como os parâmetros do instrumento e as informações do padrão de varredura. Ambos os arquivos são necessários para que o formato imzML possa funcionar corretamente. Esse formato foi desenvolvido com a finalidade de reduzir os tamanhos dos arquivos gerados, descrever completamente um experimento de MSI, garantir a flexibilidade e agilidade na manipulação dos dados, auxiliar no armazenamento e compartilhamento com eficiência de dados de MSI, e manter a coerência com o formato mzML já existente (RÖMPP et al., 2011). Descrições mais detalhada do formato imzML foram publicadas em vários artigos recentes (RÖMPP et al., 2011; SCHRAMM et al., 2012).

Pedrioli e colaboradores (2004) desenvolveram outro formato aberto utilizado para armazenar dados de MS, denominado mzXML. Esse formato utiliza uma linguagem de marcação extensível (XML) e foi desenvolvido para armazenar, compartilhar e processar dados de MS gerados por diferentes fabricantes de espectrômetros de massas. O formato mzXML é caracterizado por armazenar grande parte das informações sobre os parâmetros do aparelho, porém não contém informações espaciais necessárias para associar cada espectro de massa com sua localização específica no tecido analisado por MSI. Para que esse formato possa ser utilizado em análises de MSI é necessário a criação manual de um arquivo de cabeçalho (.txt), contendo informações sobre o número de spots por linha, o número de spots por fileira, dentre outras informações (ROBICHAUD et al., 2013). Além de armazenar grande parte dos parâmetros do aparelho, outra vantagem da utilização desse formato é que a conversão dos dados de MS do formato nativo dos diferentes instrumentos (como, por exemplo, Thermo, Agilent, ABSciex, Waters, Bruker e Shimadzu) para mzXML é facilitada, podendo ser realizada por programas disponíveis *online* (ROBICHAUD et al., 2013).

O terceiro componente de uma plataforma para MSI são os algoritmos de visualização, processamento e análise dos dados. Atualmente existem diversos pacotes de algoritmos comerciais e não comerciais que auxiliam na reconstrução de imagens geradas por espectrometria de massas e oferecem ferramentas de pós-processamento para navegação através dos dados, aprimoramento da qualidade das imagens, e que auxiliam na interpretação dos dados gerados. A escolha adequada do algoritmo a ser utilizado é de extrema importância durante o processamento e análise dos dados, uma vez que os diferentes pacotes de algoritmos podem ser utilizados para necessidades específicas, nas quais os benefícios e desvantagens de cada plataforma devem ser levados em consideração. Nessa etapa é imprescindível a realização de um bom tratamento dos dados experimentais para que não ocorra uma falsa representação dos dados gerados. Dentre os algoritmos disponíveis atualmente, temos o Biomap (Novartis, Basel, Switzerland), FlexImaging (Bruker Corporation, Billerica, MA), Datacube Explorer (AMOLF), Tissueview (AB SCIEX, Foster City, CA, USA), Quantinetix (ImaBiotech), MSiReader (NCSU), dentre outros.

### **Biomap**

O Biomap (<http://www.maldi-msi.org>) é uma plataforma de licença livre para visualização e processamento de dados de MSI. Esse algoritmo foi inicialmente desenvolvido por Martin Rausch para a avaliação de dados de MRI em pesquisas médicas e, devido a inúmeras modificações, essa plataforma suporta atualmente diferentes formatos de dados de imagem, incluindo a imagem óptica, imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET), imagem de tomografia computadorizada (CT), imagem de ressonância magnética (MR), MSI, dentre outras (SANCHEZ, CORTHALS e HOCHSTRASSER, 2004). O algoritmo é escrito em IDL™ (Research Systems, Boulder, CO), e funciona nos seguintes sistemas operacionais: Windows, Unix, Linux e em Mac OS. A visualização de imagens é baseada na reconstrução multiplanar que permite a extração de fatias arbitrária em um plano tridimensional, que podem ser visualizadas bidimensionalmente. Outra característica do algoritmo é permitir a sobreposição de dois conjuntos de dados individuais ou permitir a exibição de múltiplas regiões de interesse (ROIs) para comparação e análise estatística. É possível, também, visualizar o espectro de massas de pontos únicos selecionados ou de ROIs na imagem gerada. Através do espectro de massas é possível a seleção do analito de interesse e a visualização da distribuição espacial desse analito na superfície estudada (ROHNER, STAAB e STOECKLI, 2005).

O algoritmo também suporta o registro de imagens, a sobreposição de imagens geradas por espectrometria de massas com imagens ópticas, e contém ferramentas para o processamento dos espectros de massas gerados em experimentos de MSI. Essas ferramentas incluem a aplicação de filtro espacial e temporal, correção da linha de base, e a obtenção da média espectral, que melhora as informações obtidas a partir de um conjunto de dados (SANCHEZ, CORTHALS e HOCHSTRASSER, 2004). O Biomap oferece também a funcionalidade de um banco de dados para facilitar a organização e o armazenamento de arquivos de imagens. Dentre as vantagens desse algoritmo temos a agilidade no processamento dos dados e a capacidade de trabalhar com múltiplas janelas ao mesmo tempo. Dentre as limitações pode-se citar a navegação não intuitiva e a necessidade, na maioria das vezes, de bastante espaço para armazenamento dos dados. De modo geral, esse algoritmo é de extrema importância no campo do imageamento por espectrometria de massas, uma vez que está disponível para download gratuito ([www.maldi-msi.org](http://www.maldi-msi.org)) e facilita o compartilhamento de dados entre os pesquisadores.

### **Datacube Explorer**

O Datacube Explorer (<http://www.maldi-msi.org>) é uma plataforma de licença livre que foi projetado e criado pelo FOM instituto AMOLF para visualização e análise de dados de MSI (KLINKERT et al., 2014). Essa plataforma funciona nos seguintes sistemas operacionais: Windows, Unix, Linux e em Mac OS, e é compatível com os formatos imzML, Analyze 7.5 e o formato Datacube (desenvolvido pelo FOM instituto AMOLF). Esse algoritmo apresenta muitas semelhanças funcionais com o Biomap, tais como: permite o processamento tanto dos espectros de massas quanto da imagem e permite a seleção de regiões de interesse. O Datacube Explorer também apresenta uma ferramenta para a extração automática de imagens a partir de um conjunto de dados.

Dentre as vantagens desse algoritmo temos a agilidade no processamento dos dados, múltiplos recursos de análise dos dados e ausência nas limitações do algoritmo quanto ao tamanho dos dados que podem ser abertos no programa (somente nas versões 2.0 ou superior). Dentre as limitações temos a resolução de massa limitada a 0.1 Da e poucas opções de exibição das imagens. O Datacube Explorer está disponível para download gratuito em <http://www.amolf.nl/download/datacubeexplorer/>.

### **FlexImaging**

O FlexImaging (Bruker Corporation, Billerica, MA) é um algoritmo comercial utilizado para aquisição e análise de dados de MALDI *imaging*, que funciona apenas no

sistema operacional Windows. Esse algoritmo permite a visualização codificada por cores de qualquer íon detectado durante a um experimento de MSI, permite a sobreposição da imagem óptica com a imagem gerada por espectrometria de massas, permite a definição de ROIs para comparação e análise estatística. O FlexImaging apresenta uma ampla variedade de ferramentas para o processamento dos espectros de massas que permitem a correção da linha de base e a normalização dos dados espectrais. Integrando classificações estatística tais como o agrupamento hierárquico, a análise dos componentes principais (PCA) ou o ranking de variação, o algoritmo permite a criação de diferentes “classes de imagens” (permitem a classificação do tipo de tecido). Uma das limitações dessa plataforma é que apenas os dados adquiridos utilizando-se espectrômetros de massas da Bruker podem ser lidos e exibidos.

### **Quantinetix**

O Quantinetix (<https://www.imabiotech.com/Benefits>) é um algoritmo comercial multiplataforma (Bruker [Fid e Baf], Sciex [Analyze 7.5], Thermo e imzML) que normaliza e quantifica moléculas através de três abordagens: (I) diluição no tecido (NILSSON et al., 2010), (II) marcação com isótopo (STOECKLI, STAAB e SCHWEITZER, 2007; KALLBACK et al., 2012; PIRMAN e YOST, 2011), (III) através do cálculo da supressão de íons (HAMM et al., 2012). Esse algoritmo foi desenvolvido para quantificação de drogas em amostras de tecido, e está disponível para compra da ImaBiotech SAS (<http://www.imabiotech.com/Quantinetix-TM-Maldi-Imaging.html>).

### **MSiReader**

O MSiReader é uma plataforma livre de código aberto utilizado para ler e analisar dados de MSI de alta resolução a partir dos formatos mais comuns, tais como o imzML (contínuo ou processado), mzXML (arquivo único ou múltiplos arquivos), Analyze 7.5 e o ASCII (ROBICHAUD et al., 2013). Esse algoritmo foi construído na plataforma do Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) e apresenta uma ampla variedade de ferramentas e recursos para a análise de dados de MSI. Por apresentar uma interface amigável, o MSiReader proporciona uma navegação facilitada aos usuários que não estão familiarizadas com a linguagem Matlab. Por outro lado, usuários com experiência em programação em Matlab podem adaptar e customizar a plataforma do MSiReader para suas próprias necessidades. Essa plataforma funciona nos seguintes sistemas operacionais: Windows, Unix, Linux e em Mac OS.

Dentre as operações que podem ser realizadas pelo MsiReader temos: correção da linha de base dos espectros de massas; extração de espectros únicos ou a média dos espectros de massas em uma região de interesse definida pelo usuário; a detecção de pico automática; normalização dos picos (por um valor específico de  $m/z$ , pelo TIC ou por um *heatmap* personalizado); subtração de sinais de ruído (como, por exemplo, a remoção automática de sinais de íons ambiente e de matriz); cálculo de centroide customizável; visualização em 4D dos dados de MSI através da utilização da ferramenta MSiSlicer; sobreposição de imagens geradas por espectrometria de massas com imagens ópticas (ROBICHAUD et al., 2013). A aparência da imagem (*heatmap*) pode ser editada utilizando o editor de cor do Matlab, e vários esquemas de interpolação dos pixels da imagem podem ser aplicados. A escala de intensidade de cor para a geração da imagem pode ser facilmente ajustada utilizando barras de rolagem. O algoritmo permite, também, que uma série de imagens sejam geradas automaticamente a partir de uma lista de valores de  $m/z$ . Esse algoritmo também possibilita que até três imagens geradas por espectrometria de massas sejam sobrepostas para a geração de uma única imagem.

Dentre as vantagens na utilização desse algoritmo temos: a possibilidade de trabalhar com imagens de alta resolução (não utiliza algoritmos de compressão ou redução dos dados); é um algoritmo de código aberto; trabalha com uma grande faixa dinâmica (intensidade); apresenta uma interface amigável. Dentre as limitações temos o requerimento do Matlab 64bits; o tamanho máximo do arquivo é limitado pela quantidade de memória RAM disponível do computador e pelo tamanho do conjunto de dados; e a velocidade computacional. Mesmo apresentando algumas limitações quanto ao tamanho dos arquivos de imagens, o MSiReader é uma plataforma extremamente valiosa para desenvolvedores de código para MSI, pesquisadores e para empresas que procuram por uma plataforma de código aberto para interpretar ou comparar dados de MSI. O MSiReader está disponível para download gratuito em <http://www4.ncsu.edu/~dcmuddim/downloads.html> (acessado em 10/01/2016).

## 2 OBJETIVOS

Considerando-se que pouco se conhece sobre as alterações bioquímicas (a nível de metabólitos) que ocorrem no cérebro de abelhas *A. mellifera* submetidas ao estímulo não condicionado (NC) de reflexo de extensão da probóscide (REP), o presente estudo teve como objetivos:

a) Padronização da técnica de análise metabolômica global, com o uso de um sistema LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup>, construindo-se inicialmente uma biblioteca de compostos de baixas massas moleculares, característicos de cérebro de insetos (neurotransmissores, aminoácidos livres, poliaminas, nucleotídeos, nucleosídeos, ácidos orgânicos, etc), onde foram considerados parâmetros tais como: tempo de retenção cromatográfico; valores de m/z em alta resolução dos analitos em sua forma monoprotônica (molécula protonada - [M+H]<sup>+</sup>), e dos íons-fragmento característicos de cada analito, obtidos em condições de CID para a confirmação da identificação dos mesmos (e até mesmo para distinguir compostos isóbaros).

b) Análise dos metabólitos do cérebro de abelhas *A. mellifera* submetidas ao ensaio comportamental de estímulo não condicionado - REP. Nesse contexto foram investigados os principais metabólitos já descritos em literatura, por atuarem na modulação de vários comportamentos já bem caracterizados em abelhas, tais como a dopamina, serotonina, octopamina, tiramina, histamina, glutamato e GABA. Essa análise permitiu a comparação entre as análises quali- e quantitativa por espectrometria de massas em indivíduos de mesma idade, submetidos e não submetidos ao ensaio de REP.

c) Desenvolvimento de uma plataforma analítica por MALDI *Spectral Imaging* (MSI) para o mapeamento e estudo da distribuição espacial dos metabólitos identificados em cortes de cérebro de abelhas, para correlação do comportamento ensaiado com a distribuição regionalizada destes metabólitos nos diferentes neurópilos do cérebro. Nesse sentido, também foi necessário desenvolver um protocolo experimental de análises semi-quantitativas para MALDI MSI.

d) A formação de recursos humanos na área de metabolômica, espectrometria de massas, e ainda no desenvolvimento de novas tecnologias em imageamento por espectrometria de massas, com aplicações em metabolômica *in situ*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

A metodologia empregada para o desenvolvimento do trabalho utilizou cérebro de abelhas da espécie *A. mellifera* que são mantidas em um apiário do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Rio Claro, SP. A colônia utilizada apresentava-se livre de doenças, bem alimentada e com uma rainha em franca postura.

Inicialmente, um favo contendo apenas larvas foi coletado da colônia e mantido em uma câmara incubadora (B.O.D) a 32°C e umidade relativa de 70% por 24 horas. Utilizando esse procedimento, obtivemos abelhas de idade conhecida (0-24 h). As abelhas recém-emergidas tiveram seu tórax marcado com tinta atóxica de coloração branca (Posca PC-5M, 1.8-2.5 mm) e foram devolvidas à colônia para coleta posterior quando atingirem 20 dias. Após serem coletadas, as abelhas foram submetidas ao ensaio de comportamento REP.

#### 3.2 Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)

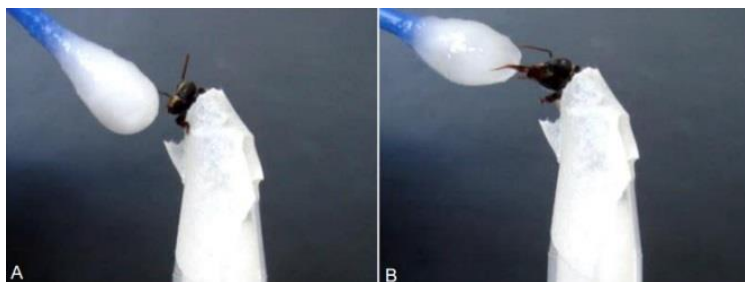
Os ensaios comportamentais de REP foram adaptados de Bitterman e colaboradores (1983), Decourtye e colaboradores (2005) e Cristino e colaboradores (2014).

Inicialmente foi realizado um pré-teste de REP para identificar a sensibilidade dessas abelhas a concentrações crescentes de sacarose, observando a partir de qual concentração todos os indivíduos testados respondem com a mesma intensidade. Estabeleceu-se que a concentração de sacarose a ser utilizada foi de 80% (m/v). Entre cada solução de sacarose ofereceu-se também água (Figura 1). Cada solução foi oferecida para a abelha com o auxílio de um cotonete estéril (um para cada solução), de modo que as abelhas não tenham contato direto com a solução (toque de da antena ou da probóscide), mas recebam somente estímulo olfativo.

Após coletadas, as abelhas forrageiras (20 dias de idade) permaneceram em estufa B.O.D a 28°C, por três horas em jejum. Em seguida, as abelhas foram anestesiadas por resfriamento por aproximadamente cinco minutos e colocadas em suporte plástico de forma a restringir a movimentação do corpo do indivíduo, sendo contidas com uma fita adesiva, mas mantendo a cabeça e as peças bucais livres (figura 1). Já contidas, as abelhas permaneceram sem alimento por mais uma hora para

adaptação. Em seguida, foi oferecido cotonete embebido em água, seguido da apresentação de outro cotonete contendo o estímulo positivo [solução de sacarose 80% (m/v)]. O procedimento foi repetido 5 vezes (intercalando-se água e solução de sacarose) a cada 2 minutos. As abelhas que responderem ao cotonete com água, apresentando extensão da probóscide foram desconsideradas do experimento, bem como aquelas que não o fizeram para a solução de sacarose. As abelhas que exibiram extensão de probóscide para a solução de sacarose (mas não exibiram extensão de probóscide para a água) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, tiveram a cabeça removida e foram armazenadas em freezer -80°C, compondo o grupo REP.

O grupo chamado de “controle” foi submetido a todo o procedimento descrito anteriormente, excetuando-se a exposição ao odor da solução de sacarose, ou seja, foi oferecido apenas o cotonete com água. Foram consideradas apenas as abelhas que não estenderam sua probóscide durante esse estímulo.



**Figura 1.** Forrageira de *A. mellifera* submetida ao teste de REP, aprisionada, mantendo-se a cabeça e as peças bucais livres. (A) oferecimento de água – sem extensão da probóscide. (B) oferecimento de solução de sacarose (80% (m/v)) – com extensão da probóscide.

### 3.3 Preparação dos extratos de metabólitos para análise em LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup>

Ao término do ensaio REP as abelhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e os tecidos frescos da cabeça de cada inseto foram dissecados em presença de um coquetel de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Nesse processo, a cutícula, as peças bucais, os pigmentos do lobo óptico, os ocelos, os olhos compostos e os tecidos glandulares que circundam o cérebro foram cuidadosamente removidos com a ajuda de grampos e tesouras oftalmológicas. Foram utilizados 15 cérebros em duplicata para compor cada um dos grupos, controle e o REP (Controle 1/Controle 2/ REP 1/ REP 2). Em seguida, os cérebros foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro na presença de 100 µL de acetonitrila (MeCN) 50% (v/v), grau HPLC, a 0°C. Esse extrato foi centrifugado em micro centrífuga (Centrífuga Eppendorf – Centrifuge 5415D) a 10.000g por 10 minutos a 25°C; em seguida, o sobrenadante foi recuperado e armazenado. O sedimento foi novamente macerado em

100  $\mu\text{L}$  de solução de MeCN 50% (v/v) a  $0^\circ\text{C}$ , e o extrato foi centrifugado pela segunda vez por 10 minutos a 10.000 g; esse processo foi repetido mais uma vez, totalizando três processos de maceração e três processos de centrifugação. Posteriormente, os sobrenadantes foram reunidos e filtrados em filtro Millipore de 3 kDa para a remoção de eventuais proteínas que podem não ter precipitado na presença de MeCN 50% (v/v); esses extratos foram liofilizados em um liofilizador “Centrivap Concentrator” (Labconco) acoplado a um condensador de solventes “Centrivap Ultra Low Cold Trap” (Labconco). Logo após o processo de liofilização, foi tomado o peso seco do material biológico extraído, e as amostras foram armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até sua análise.

No momento da análise, o material liofilizado foi solubilizado em MeCN 50% (v/v) para ajustar a concentração total de amostra em  $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo então filtrado em filtro Millipore  $0,45 \mu\text{m}$  para a remoção de possíveis partículas. Cada uma das amostras descritas acima, foram analisadas em triplicatas técnicas, sendo os resultados dessas análises, submetidos a tratamento estatístico, conforme descrito no item 3.8.

### **3.4 Cromatografia líquida ultra rápida (UFLC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução**

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento micrOToF-QIII (Bruker Daltonics) acoplado a um sistema de Cromatografia Líquida Ultra Rápida (UFLC) constituído de duas bombas LC20 AD, e um injetor automático SIL 20 AHT. Para as análises de cromatografia líquida foi utilizada uma coluna XBridge™ BEH130  $\text{C}_{18}$  ( $2,1 \times 100\text{mm}$ ;  $3,5 \mu\text{m}$ ). A temperatura da coluna foi mantida constante a  $25^\circ\text{C}$ . O sistema semi- $\mu\text{LC}$  foi conectado a um espectrômetro de massas do tipo micrOToF-QIII (Bruker Daltonics). As fases móveis utilizadas foram (A)  $\text{H}_2\text{O}/\text{HFBA}$  0,1% (v/v) (ácido heptafluorobutírico), e (B) MeCN/HFBA 0,1% (v/v). O gradiente utilizado variou de 2 a 95% (v/v) de B em 90 minutos; o fluxo de solvente na coluna foi de  $0,2 \text{ mL}/\text{min}$  e o volume de amostra injetada foi de  $2 \mu\text{L}$ .

A faixa de massa para o MS e MS/MS foi de  $m/z$  50 a 650, a velocidade de aquisição utilizado foi de 1 Hz, os parâmetros da fonte foram: voltagem: 4500V, pressão do gás nebulizador: 3 bar, fluxo do gás secante:  $8 \text{ L}/\text{min}$  e a temperatura:  $200^\circ\text{C}$ . O tempo de pré-pulso foi ajustado para  $4 \mu\text{s}$ . A energia de colisão utilizada foi de 8eV no modo MS, e de 15eV no modo MS/MS. Foi utilizado a aquisição simultânea dos dados de MS e MS/MS através do método bbCID (*Broadband Collision Induced Dissociation*).

O espectrômetro de massas micrOToF-QIII (Bruker Daltonics) foi calibrado através de uma solução de Formiato de Sódio no modo positivo, considerando um erro de 0,6 ppm e um escore de calibração mínimo de 99%. Os dados adquiridos foram processados pelo algoritmo DataAnalysis v4.1 (Bruker Daltonics).

### **3.5 Construção da biblioteca e quantificação dos metabólitos**

Para a identificação dos metabólitos presentes no cérebro das abelhas, após a otimização das condições de análise, foi necessário construir uma biblioteca de compostos. Os compostos utilizados para construção da biblioteca foram os seguintes: 1,3-diaminopropano; 2-feniletilamina; ácido ascórbico; ácido aspártico; ácido caféico; ácido cistéico; ácido glutâmico; ácido 3,4-di-hidroxifenilacético; ácido 4-hidroxifenilacético; ácido 5-hidroxiindolacético; ácido indolacético; ácido caínico; ácido maléico; adenosina difosfato; adenina; adenosina monofato cíclica; adenosina 5-monofosfato; adenosina; alanina; arginina; asparagina; betaína; cadaverina; citosina; dopamina; epinefrina; espermidina; espermina; fenilalanina; gaba; glicina; glicose; glutamina; guanina; guanosina; guanosina difosfato; guanosina monofosfato; guanosina trifosfato; hidroxitripargina; histamina; histidina; hydroxyprolina; isoleucina; leucina; lisina; manose; metionina; nicotina; octapamina; polibiosídeo; prolina; putrescina; sacarose; serina; serotonina; taurina; timina; tiramina; tirosina; treonina; tripargina; triptofano; uracila; uridina; e valina. Esses compostos foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

Para construção da biblioteca foram necessários basicamente dois algoritmos, que são ferramentas do Compass<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics): QuantAnalysis v2.1 e o DataAnalysis v4.1.

O QuantAnalysis v2.1 é uma ferramenta dedicada a quantificação por MS e MS/MS. O algoritmo permite uma análise dinâmica dos dados de cromatograma, espectro de massas e a construção de curvas de calibração para uma quantificação precisa e rápida. O processo de quantificação consistiu na aquisição de dados de LC-MS/MS para os diferentes compostos que fazem parte da biblioteca. Esses compostos foram analisados separadamente, em quatro concentrações diferentes (0,125 µg/µL; 0,06 µg/µL; 0,03 µg/µL; e 0,015 µg/µL), permitindo a construção de uma curva de calibração para cada composto. A partir dessa curva foi obtido um coeficiente de calibração para cada composto padrão da biblioteca, utilizado para a análise quantitativa dos mesmos.

O DataAnalysis v4.1 (Bruker Daltonics) é um algoritmo de visualização e processamento de dados de LC-MS. A partir desse algoritmo foram obtidos os valores dos parâmetros utilizados para a construção da biblioteca, tais como o tempo de retenção de cada analito, o valor de  $m/z$  da molécula protonada de cada composto, as áreas dos picos cromatográficos de cada metabólito (que foram padronizadas com compostos sintéticos na forma de padrão primário), e os íons fragmentos mais importantes gerados para cada composto no modo MS/MS. Além disso, os dados obtidos por espectrometria de alta resolução foram utilizados para a determinação da fórmula molecular de cada composto da biblioteca e nas amostras de extrato de cérebros.

O conjunto de dados obtidos nas análises foram convertidos em texto e transferidos para o algoritmo Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010), para o armazenamento em formato “.csv”, no qual cada linha do arquivo contém valores de parâmetros (citado anteriormente) para um único composto.

### 3.6 Identificação dos Metabólitos

Após a determinação da metodologia de separação dos compostos de baixa massa molecular, e a padronização e criação da biblioteca, iniciou-se a identificação dos compostos de baixas massas moleculares presentes no cérebro de *A. mellifera* através da utilização do algoritmo TargetAnalysis v1.3 (Bruker Daltonics). Esse algoritmo de processamento de dados permite buscar em espectros de MS qualquer número de compostos de interesse, tais como drogas, pesticidas e metabólitos. A caracterização dos compostos é baseada na medida de massa exata (de alta resolução), no valor de  $mSigma$ , (é calculado com base na correlação existente entre o padrão isotópico teórico e aquele medido no envelope monoisotópico do íon de interesse) no tempo de retenção e na presença de íons qualificadores (íons fragmentos).

Para cada fórmula molecular dos compostos presentes no banco de dados, o algoritmo TargetAnalysis calcula a massa exata na forma  $[M+H]^+$  (considerando apenas aquisições em modo positivo) e cria o cromatograma de íon extraído (EIC) com uma janela de erros determinada pelo usuário. A detecção do pico é realizada em cada EIC criado. Se o tempo de retenção é definido na biblioteca, todos os picos cromatográficos fora da janela de tempo de retenção especificados são rejeitados. Para cada pico cromatográfico dentro da janela de tempo especificada é adquirido o espectro MS e MS/MS correspondente; esses espectros são comparados com o espectro teórico do

composto. Se os valores de massa molecular e *mSigma* estiverem dentro dos limites estabelecidos, o resultado é armazenado na lista de compostos detectados.

O primeiro passo para confirmar a presença de um composto é a identificação da molécula protonada ( $[M+H]^+$ ). Posteriormente, o valor de *mSigma* é calculado com base na correlação existente entre o padrão isotópico teórico e aquele medido no envelope monoisotópico do íon de interesse. O desvio entre esses valores, as variações no tempo de retenção esperado e aquele medido para um dado composto, e também a presença de íons fragmentos fornecem uma contagem de confiança (score) para a presença do composto alvo. Essa codificação indica a proximidade dos resultados medidos com o resultado esperado, e indica a certeza na identificação de um respectivo composto.

Durante o desenvolvimento do método de processamentos de dados no TargetAnalysis é possível estabelecer dois valores limiares (crítico e subcrítico) para os parâmetros mencionados acima. Esses valores são utilizados para o cálculo final do score, sendo que os parâmetros foram classificados conforme mostrado na tabela 1, seguindo orientações do desenvolvedor do algoritmo:

**Tabela 1.** Esquema de classificação dos parâmetros avaliados. dRT – Diferença entre o tempo de retenção medido e esperado (em minutos); RTT1 – Valor de tolerância no tempo de retenção subcrítico; RTT2 – Valor de tolerância no tempo de retenção crítico;  $dm/z$  – Diferença entre o valor de  $m/z$  calculado e medido (em mDa); MT1 – Valor de tolerância de massa subcrítico; MT2 – Valor de tolerância de massa crítico; S – Valor de mSigma ; ST1 – Valor de mSigma subcrítico; ST2 – Valor de mSigma crítico.

<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>Condição</b>	<b>Classificação do resultado</b>
<b>Acurácia de Massa</b>	$0 \leq dm/z \leq MT1$	Muito bom
	$MT1 < dm/z \leq MT2$	Bom
	$MT2 < dm/z$	Ruim
<b>Valor de mSigma</b>	$0 \leq S \leq ST1$	Muito bom
	$ST1 < S \leq ST2$	Bom
	$ST2 < S$	Ruim
<b>Tempo de Retenção</b>	$0 \leq dRT \leq RTT1$	Muito bom
	$RTT1 < dRT \leq RTT2$	Bom
	$RTT2 < dRT$	Ruim
<b>Íons Qualificadores</b>	$0 \leq dm/z \leq$ tolerância de identificação	Bom
	tolerância de identificação $< dm/z$	Ruim

A representação do escore geral das identificações dos metabólitos utilizou a simbologia mostrada na tabela 2:

**Tabela 2.** Esquema geral de escore das identificações baseado nos parâmetros analíticos considerados na Tabela 1.

<b>Resultado do Escore</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Símbolo</b>
4 parâmetros muito bons: (probabilidade extremamente alta de identificação correta)	Identificação Forte: pelo menos 1 íon qualificador foi encontrado e os 3 parâmetros restantes estão abaixo do valor subcrítico	<b>++++</b>
3 parâmetros muito bons: (probabilidade alta da identificação correta)	Identificação Forte	<b>+++</b>
2 parâmetros muito bons e 2 parâmetros bons	Identificação confiável	<b>++</b>
1 ou mais parâmetros ruins, independentemente do número de parâmetros bons ou muito bons	Identificação não confiável: requer avaliação adicional	<b>---</b>

Para a realização das buscas com o uso do algoritmo TargetAnalysis foram configurados os seguintes parâmetros: tempo de corrida cromatográfica total de 90 minutos; tolerância no tempo de retenção de 1 minuto; tolerância de 20 mDa para a criação dos cromatogramas de íons extraídos; tolerância de 20 mDa entre os valores de  $m/z$  medido e esperado para as moléculas protonadas; limite da relação sinal/ruído 3:1; valor de tolerância de massa subcrítico 10 mDa; tolerância de massa crítico 20 mDa; valor de  $mSigma$  subcrítico 50; valor de  $mSigma$  crítico 1000; os valores de tolerância de intensidade considerados para a identificação dos íons fragmentos foi considerado caso a casa, sempre respeitando a intensidade mínima superior a relação sinal/ruído de 3:1; tolerância de massa para a identificação dos íons fragmento de 20 mDa; algoritmo de identificação de picos *Sun Peak*. Antes do início do processamento dos dados, os espectros de massas foram internamente recalibrados utilizando-se o Formiato de Sódio como padrão (no modo positivo).

### 3.7 Construção de nova biblioteca sem a utilização de padrões sintéticos

Após o término das análises dos metabólitos identificados utilizando-se a biblioteca descrita no item 3.5, as identificações obtidas foram contrastadas com a coleção de banco de dados de rotas metabólicas para *A. mellifera* do KEGG. Com isso, observou-se que os metabólitos identificados pela abordagem descrita anteriormente concentravam-se em algumas rotas metabólicas específicas. Nesse processo observou-se a necessidade da criação de uma segunda biblioteca de metabólitos, para que fosse possível a identificação de metabólitos intermediários presentes nessas rotas, que geralmente não se encontram comercialmente na forma sintética. Essa biblioteca foi construída sem a utilização de padrões primários (a grande maioria dos compostos dessa biblioteca não apresentam padrões vendidos comercialmente) e, portanto, não possui parâmetros de tempo de retenção e íons qualificadores. Os algoritmos DataAnalysis v4.1 e o TargetAnalysis v1.3 foram utilizados para a criação dessa biblioteca.

Inicialmente foi criado um arquivo no formato “.csv” no algoritmo Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010) contendo os seguintes parâmetros: nome do composto e fórmula molecular (espécie neutra) para todos os metabólitos dessa biblioteca. Posteriormente esse arquivo “.csv” foi inserido no TargetAnalysis v1.3 (Bruker Daltonics) para o cálculo da massa exata dos compostos (seis casas decimais), com base na fórmula molecular; essa informação foi automaticamente inserida na biblioteca.

Após a criação dessa biblioteca iniciou-se a identificação dos novos compostos, através da utilização do algoritmo TargetAnalysis v1.3 (Bruker Daltonics). Para essa biblioteca a caracterização dos compostos foi baseada na medida de alta resolução, e no valor de  $mSigma$ . Durante as buscas, o algoritmo TargetAnalysis v1.3 cria cromatogramas de íon extraído para cada valor de  $m/z$  obtido a partir dos valores de massa exata da biblioteca. A detecção do pico é realizada em cada EIC criado, e como nenhum tempo de retenção foi definido, todos os picos presentes na corrida cromatográfica foram levados em consideração. Posteriormente os espectros MS teóricos e experimentais são comparados, e se os valores de massa molecular e  $mSigma$  estiverem dentro dos limites estabelecidos, o resultado é armazenado na lista de compostos detectados. Nesse caso, a contagem de confiança (score) para a presença do composto alvo é feita apenas com base nos desvios dos valores de  $m/z$  da molécula protonada teórico e experimental, e com base nos desvios entre o padrão monoisotópico teórico e experimental (valor de  $mSigma$ ). Os valores de limiar crítico e subcrítico seguem o mesmo padrão descrito na tabela 1, do item 3.6. Os seguintes símbolos são

utilizados para representar o escore geral das identificações, conforme mostrado na tabela 3:

**Tabela 3.** Esquema geral de escore das identificações obtidas através da biblioteca criada sem a utilização de padrões sintéticos, baseado nos parâmetros analíticos considerados na Tabela 1.

<b>Resultado do Escore</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Símbolo</b>
2 parâmetros muito bons ou bons	Identificação confiável.	+
1 ou mais parâmetros ruins	Identificação não confiável: requer avaliação adicional. Pelo menos um dos dois parâmetros apresenta um desvio maior do que o limiar crítico.	---

Para a realização das buscas por compostos utilizando-se a biblioteca criada sem padrões sintéticos no TargetAnalysis foram estabelecidos parâmetros mais rígidos do que os citados anteriores (na busca com biblioteca criada a partir de padrões) no item 3.6. Seguem os parâmetros configurados: tempo de corrida cromatográfica total de 90 minutos; tolerância no tempo de retenção de 1 minuto; tolerância de 20 mDa para a criação dos cromatogramas de íons extraídos; tolerância de 10 mDa entre os valores de  $m/z$  medido e esperado para as moléculas protonadas; limite da relação sinal/ruído 3:1; valor de tolerância de massa subcrítico 2 mDa; tolerância de massa crítico 10 mDa; valor de  $mSigma$  subcrítico 25; valor de  $mSigma$  crítico 50; algoritmo de identificação de picos *Sun Peak*. Antes do início do processamento dos dados, os espectros de massas foram internamente recalibrados utilizando-se o Formiato de Sódio como padrão (no modo positivo).

Os metabólitos identificados por essa abordagem tiveram suas respectivas áreas cromatográficas comparadas para cada composto presente no grupo REP e/ou controle.

### 3.8 Análise dos dados de LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup>

Após o término das buscas no TargetAnalysis (Bruker Daltonics) os resultados foram exportados para o Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010), e os resultados das buscas foram organizados em tabelas. Todos os resultados obtidos foram checados manualmente através da verificação dos dados de espectrometria de massas e cromatografia, utilizando-se o algoritmo DataAnalysis (Bruker Daltonics). Para os compostos identificados a partir da biblioteca criada com padrões sintéticos, foram

realizados os cálculos dos valores quantitativos de cada composto, que foram expressos em nanograma de composto/cérebro. Para o cálculo desse valor foi considerado os dados da média da triplicata técnica para cada uma das amostras da duplicata biológica (Controle 1/Controle 2/ REP 1/ REP 2). Esses valores foram utilizados para a realização do teste estatístico. Para a realização do teste estatístico dos compostos identificados a partir da biblioteca criada sem a utilização de padrões sintéticos, foram utilizados os valores de área cromatográfica média entre as triplicatas técnicas para cada uma das amostras da duplicata biológica (Controle 1/Controle 2/ REP 1/ REP 2).

Uma vez que os dados quantitativos foram obtidos para cada um dos grupos analisados (controle e experimental), o teste estatístico clássico *t* de *Student* foi aplicado com a finalidade de encontrar as diferenças quantitativas significantes estatisticamente entre os grupos comparados. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p < 0,05$ . Esse teste foi realizado através do Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010) com a utilização da fórmula *test.T*; o teste foi realizado considerando-se uma variação desigual de duas amostras (pois os cálculos foram realizados com os valores das médias das concentrações obtidas na duplicata biológica), e uma distribuição unicaudal (devido ao pequeno conjunto de dados).

### **3.9 MALDI Imaging**

Para auxiliar a compreensão da neuroquímica do cérebro de abelhas *A. mellifera* a técnica de MALDI MSI foi empregada. Essa técnica permitiu o estudo da distribuição espacial de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores, que possam estar envolvidos na modulação do comportamento de reflexo de extensão da probóscide. Essa abordagem também permite a determinação do perfil metabólico de cada região do cérebro de abelhas, tendo sido desenvolvido para isso uma estratégia analítica para análises semi-quantitativas.

#### **3.9.1 Obtenção de secções histológicas de cérebro de *Apis mellifera***

Após o processo de congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  (por um período inferior a 24 horas), os tecidos frescos de cérebro de abelhas foram seccionados a  $-20^{\circ}\text{C}$  utilizando-se um micrótomo por congelamento (LEICA, CM1850), para a aquisição de cortes de  $12\ \mu\text{m}$  de espessura (Lâmina do MALDI). Tais cortes foram realizados no plano sagital da cabeça de cada operária, na região do eixo maior da capsula cefálica. Secções histológicas subsequentes foram analisadas imediatamente pela técnica histológica de coloração por hematoxilina e

eosina (H&E) e por MALDI MSI, possibilitando que para cada corte analisado seja gerada um mapa de contorno do cérebro deste indivíduo para que a distribuição dos compostos seja estudada.

Para as secções histológicas coradas com H&E, as lâminas foram submersas em etanol 95% (v/v) por vinte minutos, lavadas com água corrente e, em seguida, foram coradas com hematoxilina por 20 segundos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água destilada. As mesmas foram então coradas com eosina por mais 20 segundos e lavadas com água destilada. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas com soluções de etanol 95% (v/v) para a remoção do o excesso de corante e em soluções de Xilol.

As imagens digitais das secções de tecidos foram geradas através de um microscópio Olympus BX51TF, conectado a uma câmera Olympus U-LH100HG. As secções histológicas coradas com H&E foram utilizadas na construção do mapa de contorno para a interpretação dos dados de MALDI MSI.

### **3.9.2 Imageamento dos metabólitos por MALDI MSI**

As secções histológicas a serem analisadas por MALDI MSI foram submetidas à dessecação durante 30 minutos sob temperatura ambiente em um dessecador selado a vácuo contendo sílica gel como agente dessecante. Subsequentemente, para a análise dos metabólitos identificados, foi realizada a deposição automática de matriz, contendo 150 mg/mL de ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) e 1 mg/mL 2-Feniletilamina (padrão interno) em solução de metanol 50 % (v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, por meio da utilização da impressora química CHIP-1000 (Shimadzu). Com este equipamento foi programado a preparação da amostra num microarranjo de aproximadamente 500 pontos/análise, onde cada ponto de aplicação da solução de matriz foi espaçado um do outro por 200  $\mu\text{m}$  de centro a centro (resolução lateral), perfazendo 36 pontos/ $\text{mm}^2$  de corte histológico. Em cada ponto foram aplicados 500 pL (5 gotas de 100 pL) de solução de matriz, sendo realizados 24 ciclos/ponto. Desta maneira, o volume total da solução de matriz depositada por ponto foi de 12 nL, aplicando-se uma concentração total de 1,8  $\mu\text{g}$  de DHB/ponto e 0,012  $\mu\text{g}$  de 2-Feniletilamina/ponto. Após a aplicação da solução de matriz, as secções histológicas foram submetidas novamente ao processo de dessecação durante 10 sob temperatura ambiente. As coordenadas planares ( $x$  e  $y$ ) criadas pela CHIP-1000 foram salvas e exportadas para o espectrômetro de massas. Em seguida os tiros de laser foram disparados apenas nesse conjunto de coordenadas, e os espectros MALDI-ToF foram adquiridos.

Os espectros de MALDI MS foram obtidos no modo *reflectron* positivo por um MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu), equipado com um laser de N<sub>2</sub> *SmartBeam* controlado pelo algoritmo Launchpad v2.8 (Shimadzu), utilizando-se o dispositivo *reflectron*. O instrumento foi calibrado com uma solução padrão contendo reserpina [5 µg/mL em isopropanol 50 % (v/v)] e DHB (150 mg/mL em solução de metanol 50 % (v/v) contendo 0,1% de ácido trifluoroacético). Espectros de MALDI MS foram adquiridos no intervalo de  $m/z$  50 – 650, com um total de 250 disparos de laser/ponto de preparação de amostra. Assim, foram realizados cerca de 125000 disparos de laser por amostra analisada, sendo que para cada disparo de laser, se adquire um espectro de massas (gerando um total de 125.000 espectros/amostra). Os seguintes valores foram utilizados para a calibração:  $m/z$  137.02 (DHB),  $m/z$  154.02 (DHB) e  $m/z$  609.63 (Reserpina).

### 3.9.3 Processamento dos dados de MALDI MSI

Através da utilização do algoritmo Launchpad v2.8 (Shimadzu) os dados brutos (*.raw*) foram convertidos para o formato *.mzXML*. As imagens foram reconstruídas no algoritmo MSiReader v0.05 a partir dos dados no formato *.mzXML*, utilizando-se tolerância de massa de  $\pm 0.3$  Da e espaçamento de 200 µm. Nesse algoritmo os seguintes parâmetros foram configurados: O método utilizado para calcular a intensidade exibida nas imagens geradas por espectrometria de massas foi o *Max of Window (Max)*; subtração de ruído e *background*; correção da linha de base; normalização dos dados com base na intensidade do padrão interno 2-Feniletilamina, de  $m/z$  122.18 na forma  $[M+H]^+$ ; e interpolação cúbica de ordem 5 dos pixels das imagens.

### 3.9.4 Análise das Imagens – criação de mapas de contornos dos neurópilos no cérebro de abelhas

Após a aquisição dos dados, as imagens geradas por espectrometria de massas dos metabólitos identificados foram reconstruídas a partir de valores da razão massa/carga ( $m/z$ ) da molécula protonada ( $[M+H]^+$ ) dos metabólitos, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05, uma plataforma livre de código aberto, construído sobre a plataforma do Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA).

Para correlacionar os metabólitos com suas localizações no cérebro de abelhas, foi desenvolvido um mapa de contorno com base no Atlas Digital 3D do Cérebro da Abelha *A. mellifera*, desenvolvido por Rybak e colaboradores (2010), no qual os limites de cada centro nervoso foi definida para auxiliar a interpretação dos dados de MSI. O

atlas padrão para o cérebro de abelha (*Honeybee Standard Brain Atlas* – atlas HSB, <http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/beebrain/>) foi calculado a partir de 20 cérebros individuais, corados por técnica de imunohistoquímica; as imagens foram geradas a partir de microscopia confocal e segmentadas ao longo das fronteiras de 22 centros nervosos; por último, um foi reconstruído um modelo de superfície tridimensional a partir dos dados obtidos (RYBAK et al., 2010). Posteriormente, o mapa de contorno foi plotado sob a imagem obtida a partir da técnica histológica de coloração por H&E de cada secção, permitindo a visualização da anatômica do cérebro na secção sagital, e facilitando o alinhamento das imagens geradas por espectrometria com as imagens histoquímicas. Desta maneira, foi criada uma “mascara” contendo os limites anatômicos de cada estrutura nervosa, permitindo a análise das imagens geradas por MALDI MSI. Após o desenvolvimento do mapa de contorno, as estruturas foram nomeadas de acordo com o atlas HSB. Um esquema geral da estratégia adotada pode ser visualizado na figura 2.



**Figura 2.** Estratégia geral adotada para imageamento por espectrometria de massas dos metabólitos em cérebro de *A. mellifera*.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Ensaio Comportamental de Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)**

Os ensaios comportamentais de REP foram adaptados de Bitterman e colaboradores (1983), Decourtye e colaboradores (2005) e Cristino e colaboradores (2014). Antes dos ensaios comportamentais serem iniciados foi realizado um pré-teste para identificar a sensibilidade das abelhas a concentrações crescentes de sacarose, observando a partir de qual concentração todos os indivíduos testados respondem com a mesma intensidade. Para este teste foram utilizadas soluções de sacarose nas seguintes concentrações: 0,1% (m/v), 0,3% (m/v), 1% (m/v), 3% (m/v), 10% (m/v), 20% (m/v), 30% (m/v), 40% (m/v), 50% (m/v), 60% (m/v), 70% (m/v), 80% (m/v) e 85% (m/v). Após esse processo, estabeleceu-se a utilização de sacarose de 80% (m/v) pois essa era a concentração na qual grande parte das abelhas respondiam ao teste REP.

### **4.2 Análises em micrOToF-QIII: método de preparação de amostra e construção da biblioteca de metabolitos**

Em metabolômica, métodos adequados de preparação de amostra são de extrema importância. De modo geral, os passos-chaves na preparação de amostra para metabolômica são: (i) resfriamento brusco do tecido a ser analisado, uma vez que os níveis metabólicos refletem a resposta final de um sistema biológico a uma mudança genética ou ambiental, é essencial garantir que as reações metabólicas sejam interrompidas; (ii) o passo seguinte é a extração dos metabolitos, que deve ser realizado tentando otimizar o processo para que haja o mínimo de perdas, e de degradação dos analitos; (iii) por último é realizado um passo que visa concentrar a amostra, uma vez que os métodos de extração comumente empregados utilizam grandes volumes de solvente de extração e os metabolitos extraídos das células apresentam-se em baixa abundância.

Levando-se em conta os parâmetros descritos acima, os cérebros foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido após o término dos ensaios REP, para garantir que o metabolismo fosse interrompido; esse método foi escolhido devido à baixa temperatura do nitrogênio líquido (-196 °C) e principalmente devido à sua fácil remoção da amostra (por volatilização).

Além disso, diversos métodos de extração de metabólitos foram utilizados. Inicialmente tentou-se macerar a cabeça inteira, sem que houvesse a dissecação do cérebro; esse procedimento inviabilizou a análise devido à alta concentração de pigmentos (oriundos dos lóbulos ópticos) presentes no extrato biológico. Tentativas de remover esses pigmentos após a obtenção do extrato não foram eficazes. Posteriormente estabeleceu-se que a cutícula, as peças bucais, os pigmentos do lobo óptico, os ocelos, os olhos compostos e os tecidos glandulares que circundam o cérebro fossem cirurgicamente removidos.

Para a extração dos metabólitos diversos protocolos foram testados, dentre eles a extração com: i) ácido perclórico 0,1M a 0°C; ii) ácido perclórico 0,1M a 0°C sob sonicação por 30 min (adaptado de SASAKI e NAGAO, 2001); iii) e extração com acetonitrila e água (1:1 v/v). Estabeleceu-se que a utilização de água e acetonitrila (1:1 v/v), uma vez que essa solução favorecia a extração de metabólitos hidrofílicos e hidrofóbicos. Para concentrar os metabólitos foi utilizado o processo de liofilização.

### **4.3 Desenvolvimento do método de cromatografia líquida ultrarrápida (UFLC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução**

Para a criação da biblioteca de compostos e análise das amostras muitas condições cromatográficas diferentes foram testadas para que conseguíssemos separar de forma eficaz grande parte dos compostos, e para que obtivéssemos EICs de boa qualidade.

#### **4.3.1 A cromatografia de par-iônico (IPC) e o aumento no tempo de retenção dos compostos**

Um dos grandes desafios encontrados por cientistas na pesquisa com compostos biológicas é a separação dessas substâncias, principalmente devido ao fato de que grande parte desses compostos são iônicos ou polares. Para esses compostos o uso da cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) é restrito.

A adição de um reagente de pareamento iônico, ou seja, um contra-íon de carga oposta ao da amostra a ser analisada, na fase móvel, formará "complexos" mais ou menos polares que o analito sem a formação de par iônico na matriz cromatográfica, alterando significativamente o tempo de retenção do composto iônico. Esta técnica permite a separação relativamente rápida de uma mistura de compostos, em uma única

corrida cromatográfica, sem prévio tratamento ou derivatização da amostra (SZEPESI, 1990; DONATO et al., 2004).

Geralmente, o reagente de par-iônico é uma molécula iônica que carrega uma carga oposta à do analito de interesse. Esse tipo de composto possui uma região hidrofóbica para interagir com a fase estacionária, e uma região carregada para interagir com o analito. Os reagentes como o ácido trifluoroacético (TFA), o ácido heptafluorobutírico (HFBA), além de outros ácidos carboxílicos perfluorinados são os reagentes de par-iônico mais comumente utilizados na separação de peptídeos e proteínas por IPC HPLC, devido aos seus elevados grau de pureza, solubilidade em água, transparência no UV até 200nm, grande reprodutibilidade e volatilidade – tornando a recuperação dos analitos relativamente fácil (CASTRO, MOYANO e GALCERAN 1999). No presente trabalho esses dois reagentes foram testados para que fosse possível avaliar qual a melhor condição cromatográfica de separação dos compostos.

Para testar a separação dos compostos foi preparada uma mistura dos seguintes metabólitos (que também fazem parte da biblioteca): ácido aspártico ( $m/z$  134,04), ácido glutâmico ( $m/z$  148,05), ácido caínico ( $m/z$  214,09), epinefrina ( $m/z$  184,09), GABA ( $m/z$  104,07), tiramina ( $m/z$  138,09), dopamina ( $m/z$  154,08) e octopamina ( $m/z$  154,08). A concentração final de cada metabólito na mistura foi de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ . Os cromatogramas EIC foram gerados com base nos valores de  $m/z$  das respectivas moléculas protonadas, considerando uma tolerância de massas de 0,2 Da. Duas das condições cromatográficas testadas podem ser visualizadas nas tabelas 4 (com ácido fórmico) e 5 (com HFBA).

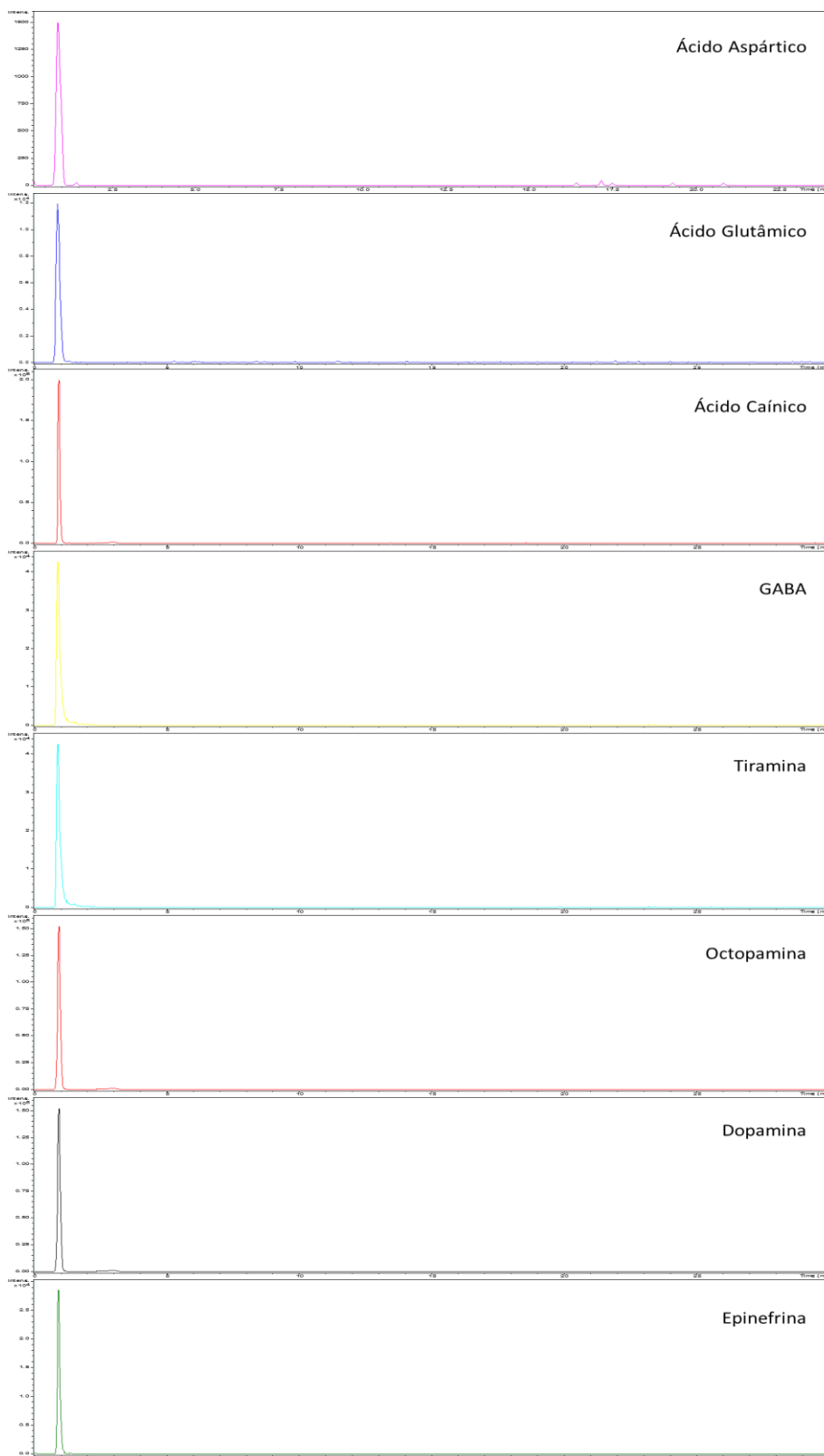
**Tabela 4.** Condição cromatográfica utilizando-se ácido fórmico como reagente de pareamento iônico.

Tempo (min)	MeCN com Ác. Fórmico 0,1% (%)	H <sub>2</sub> O com Ác. Fórmico 0,1% (%)
0	2	98
0,1	2	98
30	95	5

**Tabela 5.** Condição cromatográfica utilizando-se HFBA como reagente de pareamento iônico.

Tempo (min)	MeCN com HFBA 0,1% (%)	H <sub>2</sub> O com HFBA 0,1% (%)
0	2	98
0,1	2	98
30	95	5

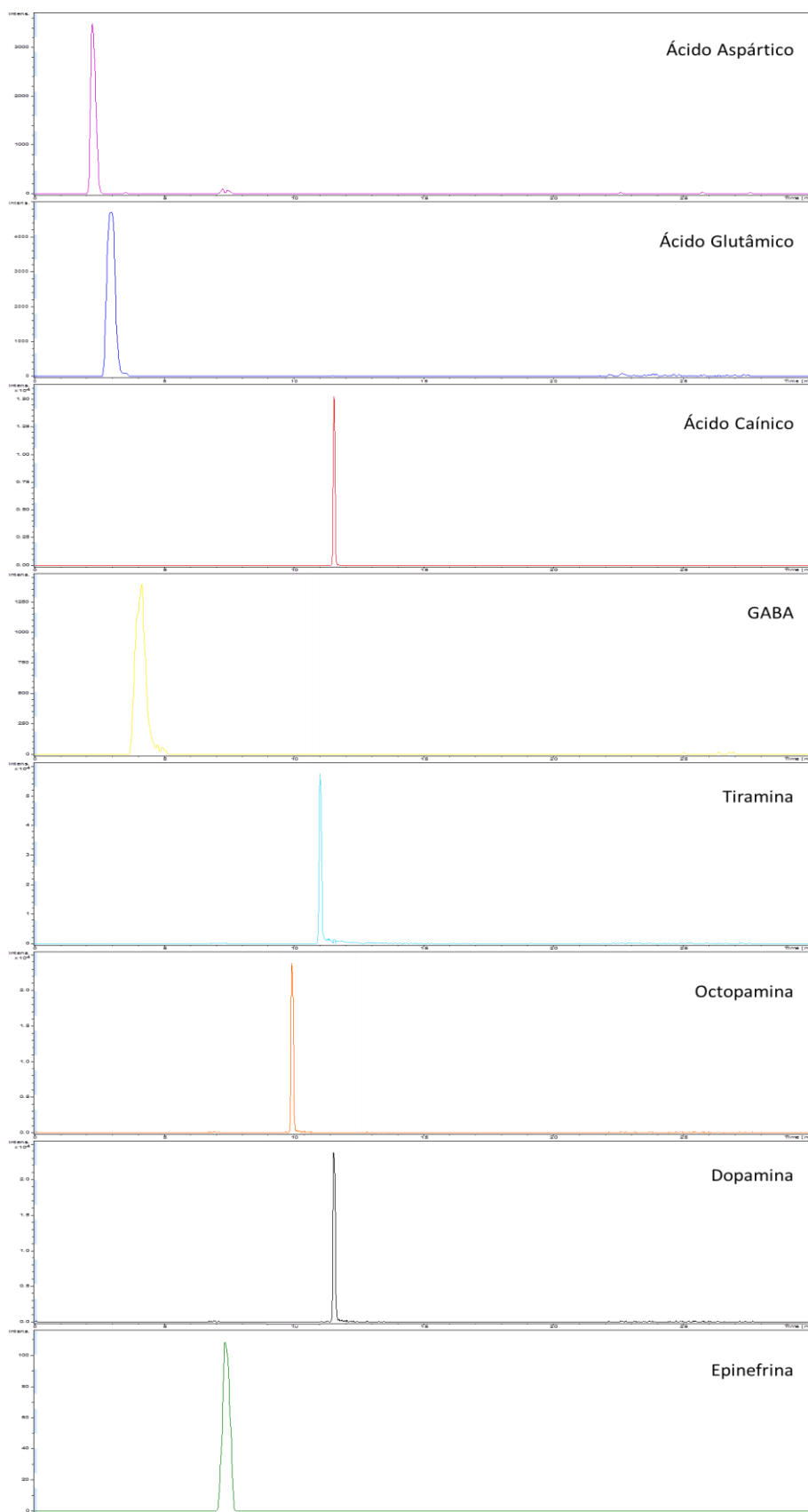
Os cromatogramas de íons extraídos para a análise na presença de ácido fórmico na fase móvel podem ser observados na figura 3. Pode-se observar que todos os compostos analisados eluíram no mesmo tempo de retenção (dentro da janela de tempo de 1 minuto). Diversas tentativas de gradiente não alteraram o tempo de eluição dos compostos que apresentam alta polaridade. Os EICs sempre permaneceram idênticos nos primeiros 2 minutos.



**Figura 3.** Cromatograma de íons extraídos para os seguintes metabólitos: ácido aspártico ( $m/z$  134,04), ácido glutâmico ( $m/z$  148,05), ácido caínico ( $m/z$  214,09), epinefrina ( $m/z$  184,09), GABA ( $m/z$  104,07), tiramina ( $m/z$  138,09), dopamina ( $m/z$  154,08) e octopamina ( $m/z$  154,08), todos na forma  $[M+H]^+$ . Para essa análise foram utilizadas as condições cromatográficas padronizadas na tabela 3 [contendo ácido fórmico 0,1% (v/v)]. Coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m); fluxo utilizado de 0,2 mL/min.

Por outro lado, ao observarmos a figura 4, é possível notar um grande aumento no tempo de retenção dos compostos com alta polaridade após a adição de HFBA na fase móvel da cromatografia, indicando que esse reagente possui maior capacidade de formar par-iônico com os compostos estudados. Os tempos de retenção observados para os compostos foram os seguintes: ácido aspártico (2,3 minutos), ácido glutâmico (3 minutos), GABA (4,2 minutos), epinefrina (7,4 minutos), octopamina (10 minutos), tiramina (11 minutos), dopamina (11,5 minutos) e ácido caínico (11,6 minutos).

É possível observar que alguns compostos tiveram seu tempo de retenção aumentado em mais de 10 minutos (como, por exemplo, o ácido caínico e a dopamina), além de outros compostos que também tiveram seu tempo de retenção aumentado, porém de maneira menos expressiva (como, por exemplo, o ácido glutâmico e o ácido aspártico). Definiu-se que a condição cromatográfica utilizando HFBA é a ideal para a padronização da biblioteca de compostos e para a análise dos metabólitos em cérebro de abelhas *A. mellifera*. A utilização do HFBA também foi eficiente na separação cromatográfica dos 65 metabólitos analisados nesse trabalho, porém, depois de diversos testes com todos os metabólitos da biblioteca e com as amostras biológicas, padronizou-se o tempo total de corrida cromatográfica de 90 minutos.



**Figura 4.** Cromatograma de íons extraídos para os seguintes metabólitos: ácido aspártico ( $m/z$  134,04), ácido glutâmico ( $m/z$  148,05), ácido caínico ( $m/z$  214,09), epinefrina ( $m/z$  184,09), GABA ( $m/z$  104,07), tiramina ( $m/z$  138,09), dopamina ( $m/z$  154,08) e octopamina ( $m/z$  154,08), todos na forma  $[M+H]^+$ . Para essa análise foram utilizadas as condições cromatográficas padronizadas na tabela 4 [contendo HFBA 0,1% (v/v)]. Coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m); fluxo utilizado de 0,2 mL/min.

### **4.3.2 Análise de espectrometria de massas de alta resolução**

Diversos parâmetros foram alterados a fim de obtermos um método único que possibilitasse a análise dos diferentes metabólitos em estudo. Para as análises de MS/MS basicamente dois modos de aquisição foram testados no software oToFControl (Bruker Daltonics): o Auto MS/MS e o bbCID.

No modo Auto MS/MS as análises de MS e MS/MS foram realizadas separadamente. No modo auto MS/MS, após a aquisição do espectro de MS, apenas os íons mais intensos foram selecionados para a fragmentação (cinco íons mais intensos). Esse método permitiu a identificação de diversos metabólitos nas amostras biológicas, porém não possibilitou a geração eficiente de íons fragmentos ao realizar o MS/MS. Como alternativa, o método de bbCID foi utilizado. Nesse método as análises de MS e MS/MS foram realizadas praticamente de modo simultâneo (durante 1 segundo de análise era realizado 0,5 segundo de análise de MS e 0,5 segundo de análise MS/MS, que se alternavam); desse modo não foi preciso selecionar íons precursores mais abundantes e nem definir um limiar de seleção de íons, uma vez que todos os íons eram submetidos à fragmentação na câmara de colisão durante a realização da análise de MS/MS. Uma vez que os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos constantemente em todos os picos cromatográficos, houve menor perda de informações espectrais importantes. Esse método possibilitou a detecção de uma grande quantidade de íons fragmentos nas análises das amostras biológicas e foi definido como método de aquisição padrão.

### **4.4 Construção da biblioteca de metabólitos utilizando-se padrões sintéticos**

Após a determinação das condições de análise foi necessário a construção de uma biblioteca de metabólitos através da utilização de padrões sintéticos, contendo aminoácidos, aminas biogênicas, nucleotídeos, nucleosídeos, bases nitrogenadas, neurotransmissores, ácidos orgânicos, entre outros, para que os compostos de interesse nas amostras biológicas fossem identificados. Esses compostos foram selecionados para compor a biblioteca por fazerem parte das principais rotas metabólicas relacionadas ao sistema nervoso de insetos em geral. Além disso, muitos compostos presentes na biblioteca são neurotransmissores, neuromoduladores ou metabólitos utilizados na síntese biológica desses compostos. Para a construção da biblioteca foram utilizados os algoritmos QuantAnalysis v2.1 (Bruker Daltonics) e o Data Analysis v4.1 (Bruker

Daltonics). O algoritmo utilizado para a comparação dos dados da biblioteca com as amostras biológicas foi o TargetAnalysis v1.3 (Bruker Daltonics).

O conjunto de dados que compõem a biblioteca de metabólitos foi transferido para o Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010) para o armazenamento em formato “.csv”, no qual cada linha do arquivo contém valores dos seguintes parâmetros: nome do composto, relação massa/carga das respectivas moléculas protonadas, tempo de retenção, fórmula molecular, íons-fragmento (de 1 a 3). A tabela 6 mostra todos os padrões de baixas massas moleculares que compõem a biblioteca de metabólitos. As curvas de calibração para os diferentes compostos da biblioteca encontram-se no Anexo I.

**Tabela 6.** Relação dos padrões utilizados para a construção da biblioteca de metabólitos, com seus respectivos valores de  $m/z$  na forma  $[M+H]^+$ , o tempo de retenção em minutos (RT) para cada composto, a fórmula molecular, e os principais íons-fragmento (Q1, Q2, Q3).

Nome do Composto	$m/z$	RT	Fórmula Molecular	Íons-Fragmento		
				Q1 ( $m/z$ )	Q2 ( $m/z$ )	Q3 ( $m/z$ )
<b>1,3-Diaminopropano</b>	75.0843	12.0	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	58.06		
<b>2-Feniletilamina</b>	121.0891	21.0	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	105.06	91.05	
<b>Ác. Ascórbico</b>	177.0320	1.4	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	141.01		
<b>Ác. Aspártico</b>	134.0448	2.1	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	116.03	117.03	
<b>Ác. Caféico</b>	181.0422	12.8	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	163.04	135.04	
<b>Ác. Cistéico</b>	170.0044	1.0	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub> S	124.00	339.01	
<b>Ác. Glutâmico</b>	148.0604	2.8	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	130.05	102.05	84.04
<b>Ác. 3,4-di-hidroxifenilacético</b>	169.0422	9.0	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	123.04		
<b>Ác. 4-Hidroxifenilacético</b>	153.0473	6.0	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	135.03	152.05	
<b>Ác. 5-Hidroxiindolacético</b>	192.0582	11.5	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	146.06	174.06	
<b>Ác. Indolacético</b>	176.0633	23.0	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	130.06	158.87	
<b>Ác. Caínico</b>	214.1001	14.5	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	196.09	168.10	150.09
<b>Ác. Maléico</b>	117.0109	1.5	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	99.01	134.04	
<b>Adenosina Difosfato</b>	428.0294	1.5	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> P <sub>2</sub>	348.07	136.06	
<b>Adenina</b>	136.0618	7.3	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	119.04		
<b>Adenosina Monof. Cíclica</b>	330.0525	3.0	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	136.06	177.06	
<b>Adenosina 5-Monofosfato</b>	348.0704	1.5	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	250.09		
<b>Adenosina</b>	268.0967	3.6	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	136.06	136.06	
<b>Alanina</b>	90.0550	3.0	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>			
<b>Arginina</b>	175.1190	10.0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	158.09	129.11	116.07
<b>Asparagina</b>	133.0608	2.0	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	116.03	88.04	
<b>Betaina</b>	117.0784	2.0	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	235.16		
<b>Cadaverina</b>	103.1230	13.2	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	86.09		
<b>Citosina</b>	112.0432	4.5	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	95.02		

<b>Dopamina</b>	154.0789	10.5	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	137.06	123.04	
<b>Epinefrina</b>	184.0895	7.0	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	166.09	135.08	
<b>Espermidina</b>	146.1652	22.0	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	129.14		
<b>Espermina</b>	203.2230	27.6	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	129.14		
<b>Fenilalanina</b>	166.0859	17.6	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	120.08	149.06	
<b>GABA</b>	104.0706	4.5	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	87.04	58.07	
<b>Glicina</b>	76.0393	2.0	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>			
<b>Glicose</b>	181.0707	1.1	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	185.05	187.09	149.02
<b>Glutamina</b>	147.0764	2.3	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	130.05	101.07	84.04
<b>Guanina</b>	152.0567	6.0	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	135.03		
<b>Guanosina</b>	284.0989	7.0	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	152.05	135.03	
<b>Guanosina Difosfato</b>	444.0243	1.5	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub> P <sub>2</sub>	152.05		
<b>Guanosina Monofosfato</b>	364.0653	1.5	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> P	152.05		
<b>Guanosina Trifosfato</b>	523.9906	2.5	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub>	284.00	265.10	485.55
<b>Hidroxitripargina</b>	288.1746	23.5	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O			
<b>Histamina</b>	112.0869	13.5	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	95.06		
<b>Histidina</b>	156.0694	7.0	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	139.06	95.06	81.05
<b>Hidroxirolina</b>	132.0655	1.8	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	86.06		
<b>Isoleucina</b>	132.1019	14	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	102.06	86.10	
<b>Leucina</b>	132.1019	14.5	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	86.09	89.00	
<b>Lisina</b>	147.1055	8.5	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	130.08	84.09	
<b>Manose</b>	181.0633	1.2	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	185.05	149.02	167.09
<b>Metionina</b>	150.0510	10.5	C <sub>3</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	102.06	133.03	104.05
<b>Nicotina</b>	163.1156	16.0	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	132.08	120.09	106.07
<b>Octapamina</b>	154.0863	7.0	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	136.07	119.04	
<b>Polibiosideo</b>	302.1273	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>			
<b>Prolina</b>	116.0706	3.0	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>			
<b>Putrescina</b>	89.1073	12.0	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	72.08		
<b>Sacarose</b>	343.1162	1.5	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	347.09	329.09	
<b>Serina</b>	106.0499	2.0	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	88.04	60.04	
<b>Serotonina</b>	177.0949	15.0	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	160.07	159.09	146.06
<b>Taurina</b>	126.0219	1.2	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S			
<b>Timina</b>	127.0429	3.0	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	110.10		
<b>Tiramina</b>	138.0840	13.0	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	121.06	107.05	
<b>Tirosina</b>	182.0738	13.0	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	165.06	164.07	136.08
<b>Treonina</b>	120.0582	13.0	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	103.04	85.04	
<b>Tripargina</b>	272.1796	31.0	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub>	213.14	255.16	196.11
<b>Triptofano</b>	205.0898	21.5	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	188.07	159.09	
<b>Uracila</b>	113.0346	1.5	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	113.03	95.01	
<b>Uridina</b>	325.0431	1.5	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> P	227.06	213.01	195.01
<b>Valina</b>	118.0863	8.75	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	101.06	100.08	74.02

Os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibrações para a quantificação dos diferentes compostos, obtidos através do QuantAnalysis v2.1 (Bruker Daltonics) foram transferidos para planilhas Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010), e podem ser visualizados na tabela 7. Considerando-se a equação da reta dada por:  $y = ax+b$ , no qual o  $y$  é o valor da área de um composto específico no cromatograma de íon extraído;  $a$  é o coeficiente angular da reta;  $x$  é a concentração do analito de interesse (expresso em  $\mu\text{g}$ );  $b$  é o coeficiente linear, que em todos os casos foi igual a zero, pois todas as retas passam pela origem na curva de calibração.

**Tabela 7.** Tabela contendo os coeficientes de correlação das curvas de calibração, e os valores de coeficientes angulares das curvas de calibração para os diferentes compostos da biblioteca.

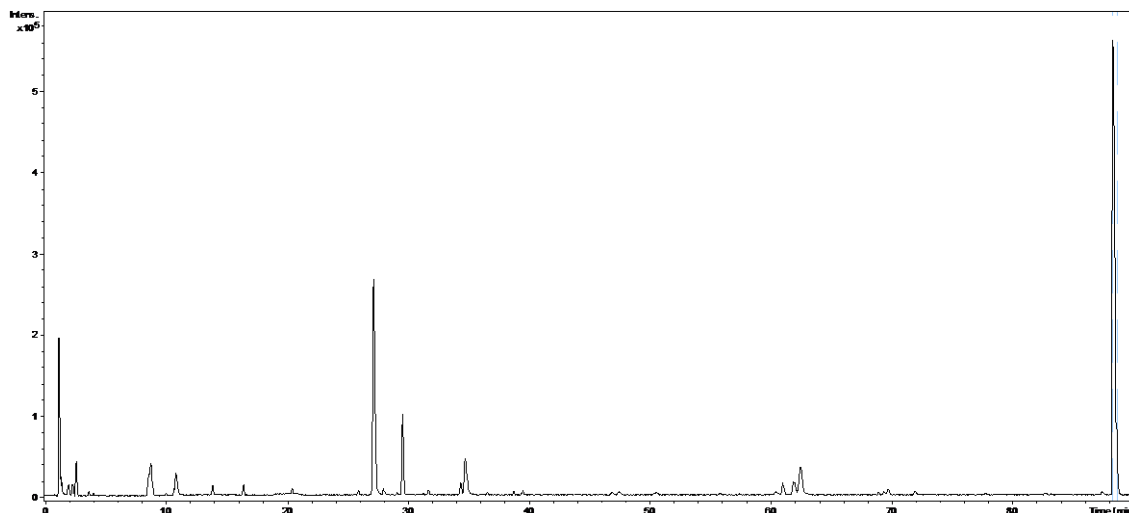
Nome do Composto	$R^2$	Coefficiente angular da reta ( $a$ )
<b>1,3-Diaminopropano</b>	0.9973	822232.20
<b>2-Feniletilamina</b>	0.9668	4683414.31
<b>Ác. 3,4-di-hidroxifenilacético</b>	0.9996	130014.14
<b>Ác. indolacético</b>	0.9992	4317545.72
<b>Ác. 4-Hidroxifenilacético</b>	0.9987	7476686.78
<b>Ác. 5-Hidroxiindolacético</b>	0.9999	4730558.57
<b>Ác. Ascórbico</b>	0.9982	1871596.34
<b>Ác. Aspártico</b>	0.9984	4099741.42
<b>Ác. Caféico</b>	0.9995	338729.54
<b>Ác. Caínico</b>	0.9991	16834174.30
<b>Ác. Cistéico</b>	0.9995	1584874.19
<b>Ác. Glutâmico</b>	0.9975	3009591.88
<b>Ác. Maléico</b>	0.9997	45232.23
<b>Adenina</b>	0.9991	24755875.19
<b>Adenosina</b>	0.9994	2861324.89
<b>Adenosina 5-Monofosfato</b>	0.9998	20175839.79
<b>Adenosina Difosfato</b>	0.9994	3714042.35
<b>Adenosina Monof. Cíclica</b>	0.9998	21477023.48
<b>Alanina</b>	0.9984	120756.47
<b>Arginina</b>	0.9998	10196039.16
<b>Asparagina</b>	0.9993	1340524.52
<b>Betáina</b>	0.9998	3659253.11
<b>Cadaverina</b>	0.9998	1449831.63
<b>Citosina</b>	0.9976	8182604.72
<b>Dopamina</b>	0.9990	1989662.61
<b>Epinefrina</b>	0.9981	414770.91
<b>Espermidina</b>	0.9995	14393524.67
<b>Espermina</b>	0.9885	11131481.51

<b>Fenilalanina</b>	0.9983	18562930.91
<b>GABA</b>	0.9992	4436602.98
<b>Glicina</b>	0.9973	18741.74
<b>Glicose</b>	0.9740	895738.14
<b>Glutamina</b>	0.9978	3593696.32
<b>Guanina</b>	0.9998	9385739.76
<b>Guanosina</b>	0.9970	4567735.11
<b>Guanosina Difosfato</b>	0.9981	292449.24
<b>Guanosina Monofosfato</b>	0.9993	3011202.67
<b>guanosina Trifosfato</b>	0.9990	93158.47
<b>Hidroxitripargina</b>	0.9984	8687272.20
<b>Hidroxirolina</b>	0.9990	10919598.72
<b>Histamina</b>	0.9981	11083225.69
<b>Histidina</b>	0.9985	20452959.31
<b>Isoleucina</b>	0.9982	16387326.50
<b>Leucina</b>	0.9997	11657272.49
<b>Lisina</b>	0.9921	13825543.75
<b>Manose</b>	0.9995	1159916.51
<b>Metionina</b>	0.9983	11500345.69
<b>Nicotina</b>	0.9898	55381453.46
<b>Octapamina</b>	0.9855	4372695.52
<b>Polibiosideo</b>	0.9944	24471717.20
<b>Prolina</b>	0.9898	9403381.00
<b>Putrescina</b>	0.9277	3139009.75
<b>Sacarose</b>	0.9990	70871.00
<b>Serina</b>	0.9983	373927.23
<b>Serotonina</b>	0.9998	12117367.34
<b>Taurina</b>	0.9973	2925078.95
<b>Timina</b>	0.9992	11452731.30
<b>Tiramina</b>	0.9977	5883375.68
<b>Tirosina</b>	0.9906	8228519.55
<b>Treonina</b>	0.9996	662480.58
<b>tripargina</b>	0.9978	10412243.63
<b>Triptofano</b>	0.9996	10579447.55
<b>Uracila</b>	0.9992	1856194.73
<b>Uridina</b>	0.9935	3724146.35
<b>Valina</b>	0.9950	3981603.45

A partir do momento em que a metodologia de análise foi padronizada, a biblioteca foi construída e as curvas de calibração para os diferentes compostos foram calculadas, iniciou-se a identificação dos metabólitos do cérebro de abelhas *A. mellifera*.

#### 4.4.1 Compostos identificados

A figura 5 mostra o cromatograma de pico base (BPC – monitora o pico mais intenso em cada espectro) para o grupo **controle**.



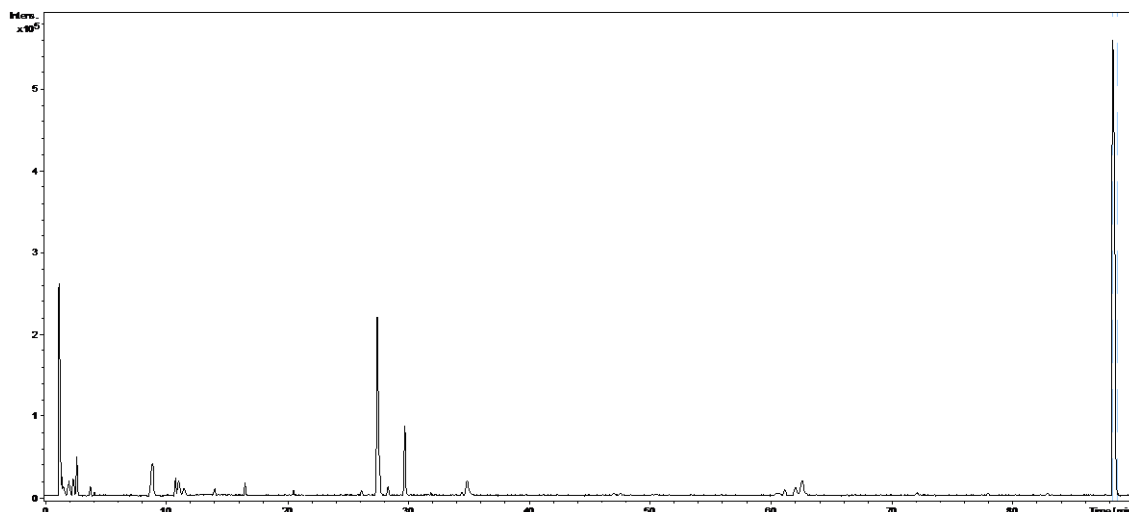
**Figura 5.** Cromatograma de pico base (BPC) obtidos a partir de 10 $\mu$ g do extrato de cérebros de abelhas *A. mellifera* (grupo **controle**) por IPC-RP-LCMS [coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m), utilizando-se as fases móveis (A) H<sub>2</sub>O contendo HFBA 0,1% (v/v), e (B) MeCN contendo HFBA 0,1% (v/v); gradiente de 2 a 95% de B em 90 minutos, com fluxo de 0,2 mL/min].

Os compostos identificados nas análises (feitas em duplicata biológica) **Controle 1 e Controle 2** podem ser visualizados na tabela 8, em conjunto com os escores das identificações, os valores de retenção observado e esperado para cada composto sob análise, os valores de  $m/z$  observados e esperados das respectivas moléculas protonadas, a área dos picos cromatográficos, os íons-fragmento observados para cada composto na análise MS/MS e os valores de concentrações dos compostos/cérebro.

**Tabela 8.** Compostos identificados no cérebro de abelhas *A. mellifera* (Controle 1 e Controle 2) por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos [Escore – Escore da identificação (de acordo com a tabela 2); RT meas. – tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); RT esp. – tempo de retenção esperado para o composto (em minutos); d RT – variação no tempo de retenção (em minutos); m/z calc. – m/z teórico; m/z meas. – m/z medido experimentalmente; ng/cérebro – valor resultante da média entre Controle 1 e Controle 2; Desvio Padrão – calculado a partir dos valores das concentrações do composto por cérebro obtidos no Controle 1 e Controle 2; Q1, Q2 e Q3 – íons-fragmento considerados para a biblioteca (de acordo com a tabela 5); Área – média das áreas cromatográficas, expressa em unidades arbitrárias, obtidas para o mesmo composto no Controle 1 e Controle 2].

Nome do Composto	Fórmula Molecular	Escore	RT meas.[min]	RT esp.[min]	d RT [min]	m/z calc.	m/z meas.	Err [mDa]	Íons Fragmento	Área	ng/cérebro	Desvio Padrão
Ác. Aspartico	C 4 H 7 N 1 O 4	++++	2.1	2.1	-0.00	134.0448	134.0445	-0.3	Q1	15695.16	130,9	0.028
Ác. Glutamico	C 5 H 9 N 1 O 4	++++	2.4	2.8	0.42	148.0604	148.0605	0.1	Q1/Q2/Q3	167047.77	1803,0	0.273
Adenina	C 5 H 5 N 5	+++	6.9	7.3	0.36	136.0618	136.0607	-1.1	Q1	6399	12,4	0.007
Adenosina- 5-Monofosfato	C 10 H 14 N 5 O 7 P 1	++++	1.5	1.5	-0.02	348.0704	348.0699	-0.5	Q1	52137.15	72,4	0.004
Alanina	C 3 H 7 N 1 O 2	++	3.1	3.0	-0.11	90.0550	90.0543	0.6		993	354,1	0.164
Arginina	C 6 H 14 N 4 O 2	+++	9.6	10.0	0.38	175.1190	175.1162	2.8	Q1/Q2/Q3	503917.16	1433,3	0.001
Asparagina	C 4 H 8 N 2 O 3	++++	1.9	2.0	0.09	133.0608	133.0587	2.0	Q1/Q2	2705	68,2	0.014
Cadaverina	C 5 H 14 N 2	++++	12.8	13.2	0.45	103.1230	103.1243	-1.3	Q1	1086	15,4	0.009
Espermina	C 10 H 26 N 4	++	27.2	27.6	0.37	203.2230	203.2323	9.3		1729.8	3,0	0.002
GABA	C 4 H 9 N 1 O 2	++	3.9	4.5	0.56	104.0706	104.0724	-1.8		2093	22,8	0.013
Glicina	C 2 H 5 N 1 O 2	++	1.3	2.0	0.1	76.0393	76.0465	7.2		961.64	1456,5	0.044
Glicose	C 6 H 12 O 6	++++	1.2	1.1	-0.13	181.0707	181.0719	1.2	Q1/Q2/Q3	14881.48	481,8	0.001
Glutamina	C 5 H 10 N 2 O 3	++++	2.0	2.3	0.26	147.0764	147.0764	0.0	Q1/Q2/Q3	158483	1511,5	0.329
Guanina	C 5 H 5 N 5 O 1	+++	6.4	6.0	-0.36	152.0567	152.0560	0.7	Q1	13784.25	50,3	0.011
Guanosina	C 10 H 13 N 5 O 5	+++	6.9	7.0	0.06	284.0989	284.0987	-0.2	Q1/Q2	5450.14	41,5	0.010
Guanosina Monofosfato	C 10 H 14 N 5 O 8 P 1	+++	1.5	1.5	-0.03	364.0653	364.0637	-1.6	Q1	2472	26,9	0.004
Histamina	C 5 H 9 N 3	++	12.9	13.5	0.57	112.0869	112.0872	-0.3		2133.02	4,8	0.001
Hidroxi prolina	C 5 H 9 N 1 O 3	++	1.8	1.8	-0.02	132.0655	132.0654	-0.2		1003.54	6,7	0.006
Isoleucina	C 6 H 13 N 1 O 2	++++	13.9	14.0	0.06	132.1019	132.1017	-0.2	Q2	155311	267,2	0.011
Leucina	C 6 H 13 N 1 O 2	++++	14.4	14.5	0.12	132.1019	132.1017	-0.2	Q1	155311	375,6	0.015
Octapamina	C 8 H 11 N 1 O 2	+++	7.4	7.0	-0.41	154.0863	154.0966	-10.3	Q1/Q2	15197.27	105,2	0.006
Prolina	C 5 H 9 N 1 O 2	+++	2.8	3.0	0.22	116.0706	116.0703	-0.3		13420.32	58,6	0.024
Putrescina	C 4 H 12 N 2	+++	11.7	12.0	0.29	89.1073	89.1095	-2.1	Q1	1930.58	15,7	0.003
Taurina	C 2 H 7 N 1 O 3 S 1	++	1.2	1.2	-0.02	126.0219	126.0218	0.1		11046	105,9	0.005
Uracila	C 4 H 4 N 2 O 2	+++	1.3	1.5	0.16	113.0346	113.0269	7.6	Q1	2274	35,5	0.001
Uridina	C 9 H 13 N 2 O 9 P 1	+++	1.1	1.5	0.43	325.0431	325.0451	-2.0	Q1/Q2/Q3	1068	11,2	0.004
Valina	C 5 H 11 N 1 O 2	++	8.7	8.8	0.01	118.0863	118.0865	-0.3		3257	31,8	0.011

A figura 6 mostra o cromatograma BPC para o grupo **REP**.



**Figura 6.** Cromatograma de pico base (BPC) obtidos a partir de 10 $\mu$ g do extrato de cérebros de abelhas *A. mellifera* (grupo **REP**) por IPC-RP-LCMS [coluna XBridge™ BEH130 C<sub>18</sub> (2,1x100mm; 3,5 $\mu$ m), utilizando as fases móveis (A) H<sub>2</sub>O/HFBA 0,1% (ácido heptafluorobutírico), e (B) MeCN/HFBA 0,1%; gradiente de 2 a 95% de B em 90 minutos, com fluxo de 0,2 mL/min].

Os compostos identificados nas análises (feitas em duplicata) dos grupos experimentais **REP 1 e REP 2** podem ser visualizados na tabela 9, em conjunto com os escores das identificações, os valores de retenção observado e esperado para cada composto sob análise, os valores de  $m/z$  observados e esperados das moléculas protonadas, a área dos picos cromatográficos, os íons-fragmento observados para cada composto nos espectros MS/MS, e os valores de concentrações dos compostos/cérebro.

**Tabela 9.** Compostos identificados no cérebro de abelhas *A. mellifera* (REP 1 e REP 2) por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos [Escore – Escore da identificação (de acordo com a tabela 2); **RT meas.**– tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); **RT esp.** – tempo de retenção esperado para o composto (em minutos); **d RT** – variação no tempo de retenção (em minutos); **m/z calc.** – *m/z* teórico; **m/z meas.** – *m/z* medido experimentalmente; **ng/cérebro** – valor resultante da média entre REP 1 e REP 2; **Desvio Padrão** – calculado a partir dos valores das concentrações do composto por cérebro obtidos em REP 1 e REP 2; **Q1, Q2 e Q3** – íons-fragmento considerados para a biblioteca (de acordo com a tabela 5); **Área** – média das áreas cromatográficas, expressa em unidades arbitrárias, obtidas para o mesmo composto em REP 1 e REP2].

Nome do Composto	Fórmula Molecular	Escore	RT meas.[min]	RT esp.[min]	d RT [min]	m/z calc.	m/z meas.	Err [mDa]	Íon Fragmento	Área	ng/cérebro	Desvio Padrão
Ac. Aspartico	C 4 H 7 N 1 O 4	++++	2.2	2.1	-0.06	134.0448	134.0428	-2.0	Q1	14759.46	126,3	0.036
Ac. Glutamico	C 5 H 9 N 1 O 4	++++	2.9	2.8	-0.10	148.0604	148.0601	-0.3	Q1/Q2/Q3	238843.13	1954,7	0.309
Adenina	C 5 H 5 N 5	+++	7.1	7.3	0.21	136.0618	136.06	1.7	Q1	6580.41	13,0	0.006
Adenosina-5-Monofosfato	C 10 H 14 N 5 O 7 P 1	++++	1.5	1.5	-0.03	348.0704	348.0715	1.2	Q1	114682	24,5	0.039
Alanina	C 3 H 7 N 1 O 2	++	3.1	3.0	-0.10	90.055	90.0551	-0.1		4609.38	991,0	0.377
Arginina	C 6 H 14 N 4 O 2	++++	9.0	10.0	1.00	175.119	175.1183	-0.6	Q1/Q2/Q3	520985	1172,1	0.001
Asparagina	C 4 H 8 N 2 O 3	++++	1.9	2.0	0.11	133.0608	133.0592	1.6	Q1/Q2	4659	125,6	0.016
Fenilalanina	C 9 H 11 N 1 O 2	++	17.5	17.5	0.06	166.0859	166.0863	-0.4		30100.1	37,3	0.001
Betaína	C 5 H 10 N 1 O 2	++++	2.6	2.0	-0.56	117.0784	117.0734	5.0	Q1	3347	34,4	0.001
Espermidina	C 7 H 19 N 3	++	22.1	22.0	-0.09	146.1652	146.1631	2.1		889	1,7	0.001
GABA	C 4 H 9 N 1 O 2	+++	3.9	4.5	0.56	104.0706	104.0703	0.3	Q1	5614	33,4	0.006
Glicina	C 2 H 5 N 1 O 2	++	2.2	2.0	-0.19	76.0393	76.0383	1.0		1431	1511,8	0.573
Glutamina	C 5 H 10 N 2 O 3	++++	2.0	2.3	0.27	147.0764	147.0763	0.1	Q1/Q2/Q3	265062.33	1811,2	0.258
Guanina	C 5 H 5 N 5 O 1	+++	6.0	6.0	-0.04	152.0567	152.0577	1.0	Q1	10834.99	41,8	0.007
Guanosina	C 10 H 13 N 5 O 5	++++	6.3	7.0	0.73	284.0989	284.1025	-3.6	Q1/Q2	7405.12	46,1	0.002
Guanosina Monofosfato	C 10 H 14 N 5 O 8 P 1	++++	1.5	1.5	-0.04	364.0653	364.0596	5.7	Q1	6285.1	54,9	0.002
Histamina	C 5 H 9 N 3	++	13.2	13.5	0.28	112.0869	112.0852	-1.7		2108.25	3,3	0.003
Hidroxiprolina	C 5 H 9 N 1 O 3	+++	1.7	1.8	0.06	132.0655	132.0645	-1.1		8181	14,0	0.009
Isoleucina	C 6 H 13 N 1 O 2	++++	14.1	14.0	-0.11	132.1019	132.1015	0.4	Q1	135623.93	192,0	0.051
Leucina	C 6 H 13 N 1 O 2	++++	14.5	14.5	-0.00	132.1019	132.1015	-0.4	Q1/Q2	135623.9	269,9	0.071
Octapamina	C 8 H 11 N 1 O 2	++++	7.5	7.0	-0.46	154.0863	154.0958	9.5	Q1/Q2	18898.52	102,8	0.013
Prolina	C 5 H 9 N 1 O 2	+++	2.6	3.0	0.43	116.0706	116.0708	0.2		63943.85	160,9	0.133
Putrescina	C 4 H 12 N 2	+++	11.9	12.0	0.13	89.1073	89.1077	-0.3	Q1	5266.35	41,4	0.008
Serina	C 3 H 7 N 1 O 3	+++	2.0	2.0	0.02	106.0499	106.048	1.9	Q2	470	28,9	0.001
Taurina	C 2 H 7 N 1 O 3 S 1	++	1.2	1.2	-0.02	126.0219	126.0218	-0.1		10396	107,9	0.021
Uridina	C 9 H 13 N 2 O 9 P 1	+++	1.0	1.5	0.48	325.0431	325.0436	-0.5	Q1/Q2/Q3	3066	15,3	0.009
Valina	C 5 H 11 N 1 O 2	+++	8.8	8.8	-0.09	118.0863	118.0862	-0.0		7503.57	43,9	0.021

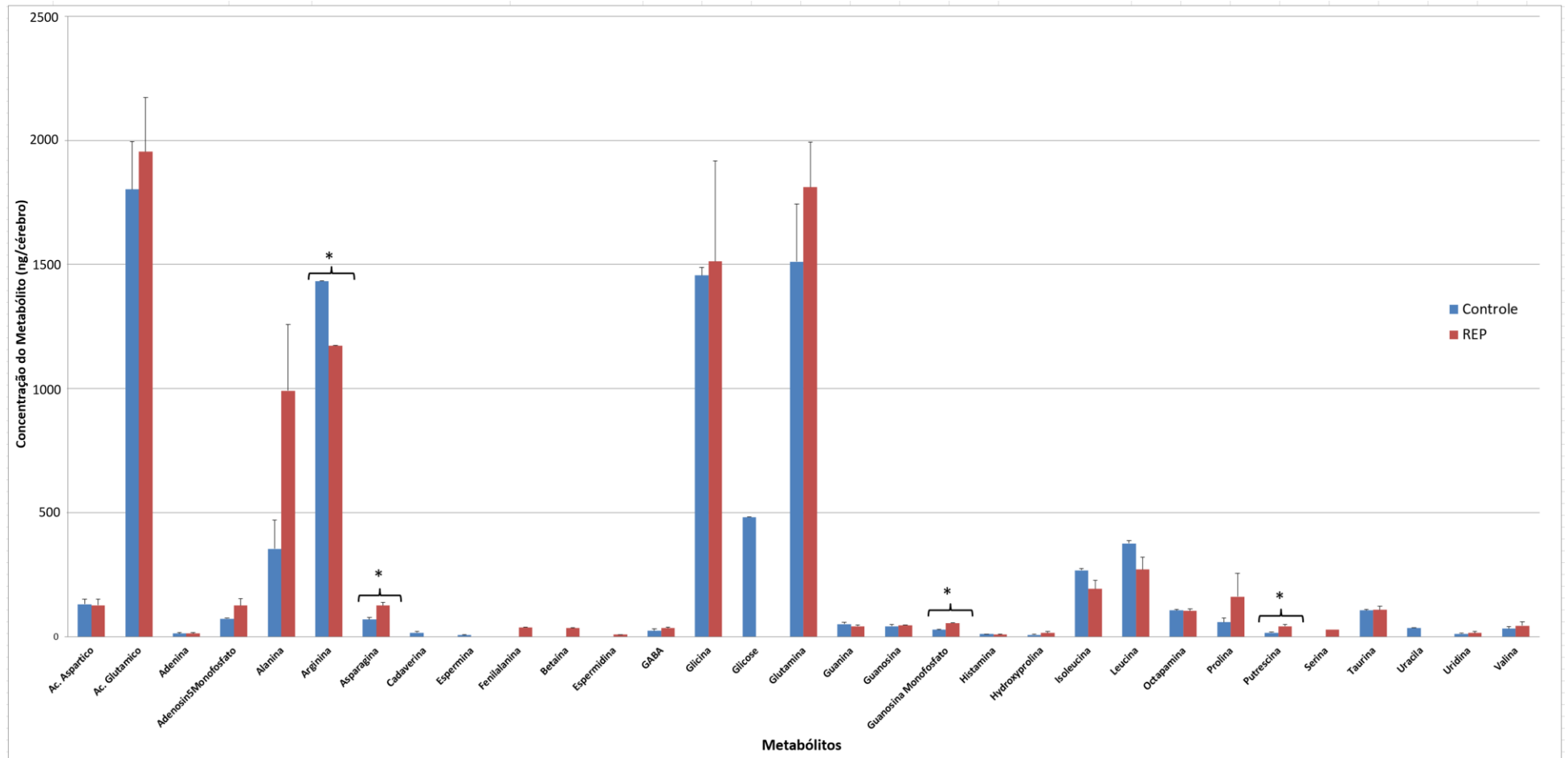
Os resultados obtidos revelaram alta diversidade de metabólitos no cérebro de abelhas *A. mellifera*. Dos 65 compostos presentes na biblioteca de metabólitos foram identificados 31 diferentes compostos. Foram identificados 23 compostos comuns aos grupos controle e REP; em quatro desses compostos observou-se diferenças quantitativas estatisticamente significantes (arginina, asparagina, guanosina monofosfato e putrescina). Além disso, observou-se que alguns compostos foram identificados somente no grupo controle (cadaverina, espermina, glicose e uracila), e outros foram identificados somente no grupo REP (fenilalanina, betaína, espermidina e serina).

#### **4.4.2 Análise estatística**

Os resultados obtidos a partir do teste estatístico *t* de *Student* podem ser visualizados na tabela 10. Já na figura 7, podemos observar a comparação do perfil global de metabólitos identificados nos grupos controle (azul) e REP (vermelho).

**Tabela 10.** Resultado do teste estatístico *t* de *Student*. para a comparação entre os resultados dos grupos controle e REP. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p < 0,05$  (Valores assinalados com \*).

Nome do Composto	ng/cérebro (Controle 1)	ng/cérebro (Controle 2)	ng/cérebro (REP1)	ng/cérebro (REP2)	Teste t
Ac. Aspartico	111,0	150,7	151,7	100,9	0.4507
Ac. Glutamico	1609,6	1996,3	1736,2	2173,2	0.3277
Adenina	7,5	17,3	17,2	8,8	0.4674
Adenosina 5- Monofosfato	74,9	69,8	96,7	152,3	0.1549
Alanina	238,5	469,7	724,2	1257,9	0.1081
Arginina	1433,3	1434,0	1175,2	1169,0	0.0034*
Asparagina	58,5	77,8	136,8	114,5	0.0309*
Cadaverina	21,7	9,1	-	-	-
Espermina	4,5	1,5	-	-	-
Fenilalanina	-	-	37,3	37,4	-
Betaína	-	-	34,5	34,4	-
Espermidina	-	-	1,8	1,7	-
GABA	13,7	31,8	28,8	37,9	0.2183
Glicina	14880	1425,1	1106,7	1916,9	0.4569
Glicose	481,8	481,8	-	-	
Glutamina	1278,9	1744,1	1628,4	1994,0	0.2113
Guanina	42,6	57,9	46,8	36,8	0.2337
Guanosina	34,6	48,4	47,2	45,0	0.3130
Guanosina Monofosfato	23,8	30,1	56,2	53,5	0.0202*
Histamina	5,6	3,9	1,4	5,1	0.2844
Hidroxiprolina	2,7	10,8	7,7	20,4	0.2243
Isoleucina	274,8	259,5	156,3	227,7	0.1356
Leucina	386,4	364,8	219,7	320,2	0.1356
Octapamina	100,8	109,7	93,8	111,9	0.4201
Prolina	41,4	75,8	67,2	254,6	0.2342
Putrescina	17,8	13,6	35,9	46,8	0.0490*
Serina	-	-	28,9	28,8	
Taurina	109,5	102,3	122,4	93,3	0.4580
Uracila	35,5	35,6	-	-	-
Uridina	8,3	14,0	8,9	21,7	0.3176
Valina	23,7	39,9	28,8	59,0	0.2859



**Figura 7.** Comparação do perfil global de metabólitos identificados nos grupos controle (azul) e REP (vermelho). Foram utilizados os valores médios de concentração (ng/cérebro) para a representação gráfica. As diferenças de concentração estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram marcadas com “\*”.

#### 4.5 Construção de biblioteca de metabólitos sem a utilização de padrões sintéticos

Após o término das análises dos resultados apresentados no item 4.4, observou-se, através da utilização do banco de dados de rotas metabólicas do KEGG, que os metabólitos identificados se concentravam em algumas rotas metabólicas específicas. Nesse processo ficou evidente a necessidade da criação de uma segunda biblioteca de metabólitos, para que fosse possível a identificação de metabólitos intermediários presentes nessas rotas, e que não faziam parte da biblioteca inicial. A grande maioria dos compostos desta biblioteca não estão disponíveis comercialmente. Esses novos compostos não foram quantificados de modo absoluto, mas sim de modo relativo, conforme detalhado no item 3.7.

Para a construção dessa biblioteca foram utilizados os algoritmos QuantAnalysis v2.1 (Bruker Daltonics) e o Data Analysis v4.1 (Bruker Daltonics). O algoritmo utilizado para a comparação dos dados da biblioteca com as amostras biológicas foi o TargetAnalysis v1.3 (Bruker Daltonics). O conjunto de dados que compõem essa biblioteca de metabólitos foram transferidos para o Microsoft Excel v.14 (Microsoft 2010) para o armazenamento em formato “.csv”, no qual cada linha do arquivo contém valores dos seguintes parâmetros: nome do composto,  $m/z$  das moléculas protonadas e fórmula molecular. A tabela 11 mostra todos os metabólitos que compõem essa biblioteca.

Os compostos identificados nos grupos “controle” (Controle 1 e Controle 2), a partir da utilização da biblioteca metabolômica criada sem padrões sintéticos, pode ser visualizado na tabela 12. Os resultados obtidos nas análises da duplicata biológica dos grupos experimentais REP 1 e REP 2 podem ser visualizados na tabela 13, em conjunto com os escores das identificações, os valores de retenção observado para cada composto sob análise, os valores de  $m/z$  observados e esperados das respectivas molécula protonada, a área dos picos cromatográficos.

**Tabela 11.** Metabólitos que compõem a biblioteca construída sem a utilização de padrões sintéticos, com suas respectivas fórmulas moleculares e valores de  $m/z$  na forma  $[M+H]^+$

Nome do Composto	F. Molecular	$m/z$
<b>1-Pirrolina-5-carboxilato</b>	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	114.0550
<b>2-Aminoacrilato</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	88.0393
<b>2-Oxoarginina</b>	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	174.0873
<b>2-Oxoglutarato</b>	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	147.0288
<b>3-Sulfinio-L-alanina</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> S	154.0169
<b>4-Aminobutanal</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO	88.0756
<b>4-Guanidinobutanal</b>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O	130.0975
<b>4-Guanidinobutanamida</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	145.1084
<b>4-Guanidinobutanoato</b>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	146.0924
<b>5,6-Dihidrouracil</b>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	115.0502
<b>Acetilcolina</b>	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>	147.1253
<b>Agmatina</b>	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub>	131.1291
<b>Aminopropilcadaverina</b>	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub>	160.1735
<b>Carbamoil fosfato (Carbamoil-P)</b>	CH <sub>4</sub> NO <sub>5</sub> P	141.9899
<b>Carboxinorspermidina</b>	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	176.1394
<b>Carboxispermidina</b>	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	190.1550
<b>Colina</b>	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO	105.1148
<b>Citrato</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	193.0342
<b>Citrullina</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	176.1029
<b>Creatina</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	132.0767
<b>Cisteamina</b>	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NS	78.0299
<b>Fumarato</b>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	117.0182
<b>Glutationa</b>	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	308.0910
<b>Hypotaurina</b>	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	110.0270
<b>L-Argininosuccinato</b>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	291.1299
<b>L-Aspartate 4-semialdeido</b>	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	118.0499
<b>L-Cistationina</b>	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	223.0747
<b>L-Cisteato</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub> S	170.0117
<b>L-Cisteina</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	122.0197
<b>L-Cysteinilglicina</b>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	179.0485
<b>L-Glutamato 5-semialdeido</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	132.0655
<b>L-Homocisteina</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	136.0427
<b>N-Acetil-L-citrulina</b>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	218.1135
<b>N-Acetil-L-glutamato</b>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	190.0710
<b>N-Acetil-L-glutamato 5-semialdeido</b>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	174.0761
<b>N-Acetil-L-glutamyl 5-fosfato</b>	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>8</sub> P	270.0373
<b>N-Acetilornitina</b>	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	175.1077
<b>Noradrenalina</b>	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	170.0811
<b>Norspermidina</b>	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	132.1495
<b>Ornitina</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	133.0971
<b>Oxaloacetato</b>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	133.0131
<b>Piruvato</b>	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	89.0233
<b>Sarcosina</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	90.0549
<b>Succinato</b>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	119.0338
<b>Succinato semialdeido</b>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	103.0390
<b>Uridina monofosfato</b>	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> P	325.0431
<b>β-Aminopropion aldeido</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	74.0638

**Tabela 12.** Compostos identificados no cérebro de abelhas *A. mellifera* (Controle 1 e Controle 2) por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos criada sem a utilização de padrões sintéticos [**Escore** – Escore da identificação (de acordo com a tabela 3); **RT meas.** – tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); **m/z calc.** – m/z teórico; **m/z meas.** – m/z medido experimentalmente; **Área** – média das áreas cromatográficas, expressa em unidades arbitrárias, obtidas para o mesmo composto no Controle 1 e Controle 2]; **Desvio Padrão** – calculado a partir dos valores de média das áreas cromatográficas obtidas em Controle 1 e Controle 2.

Nome do Composto	Fórmula Molecular	Escore	RT meas. [min.]	mSigma	m/z calc.	m/z meas.	Err [mDa]	Área	Desvio Padrão
Acetilcolina	C7H16NO2	+	6.6	312.8	147.1254	147.1224	-3.0	22180.1	6065.3
L-Argininosuccinate	C10H18N4O6	+	1.6	43.1	291.1299	291.1301	-0.2	15535.72	7676.4
3-Sulfino-L-alanine	C3H7NO4S	+	2.6	16.7	154.0169	154.0249	8.0	37907.4	2629.8
Succinato	C4H6O4	+	34.8	551	119.0339	119.0302	-3.6	4885.03	3106.4
L-Homocisteine	C4H9NO2S	+	8.8	29.9	136.0427	136.0435	0.8	52599.8	3108.6
L-Cisteinilglicina	C5H10N2O3S	+	22.2	60.3	179.0485	179.0575	8.0	18164.18	710.1
4-Guanidinobutanal	C5H11N3O	+	6.6	162.7	130.0975	130.0959	1.6	6664.5	376.4
4-Guanidinobutanoato	C5H11N3O2	+	1.6	90.2	146.0924	146.0910	-1.4	1791.33	6.4
Ornitina	C5H12N2O2	+	14	26.6	133.0972	133.0970	0.1	12753.11	518.9
L-Glutamate 5-semialdeido	C5H9NO3	+	1.7	70.1	132.0655	132.0645	-1.1	2766.615	1806.5
Citrulina	C6H13N3O3	+	8.8	35.4	176.1030	176.1030	0.0	43288.435	258.0
N-Acetil-L-glutamato 5-semialdeide	C7H11NO4	+	1.5	220.5	174.0761	174.0765	-0.4	3698.725	622.9
N-Acetil-L-glutamato	C7H11NO5	+	1.5	68.7	190.0710	190.0711	0.1	14783.275	997.6
N-Acetilornitina	C7H14N2O3	+	8.7	2.8	175.1077	175.1078	-0.1	495881.095	4932.4
Carboxinorspermidina	C7H17N3O2	+	8.8	36.8	176.1394	176.1407	-1.3	42954.725	2831.6
Noradrenalina	C8H11NO3	+	50.6	222.6	170.0812	170.0906	9.4	100389.92	65668.1

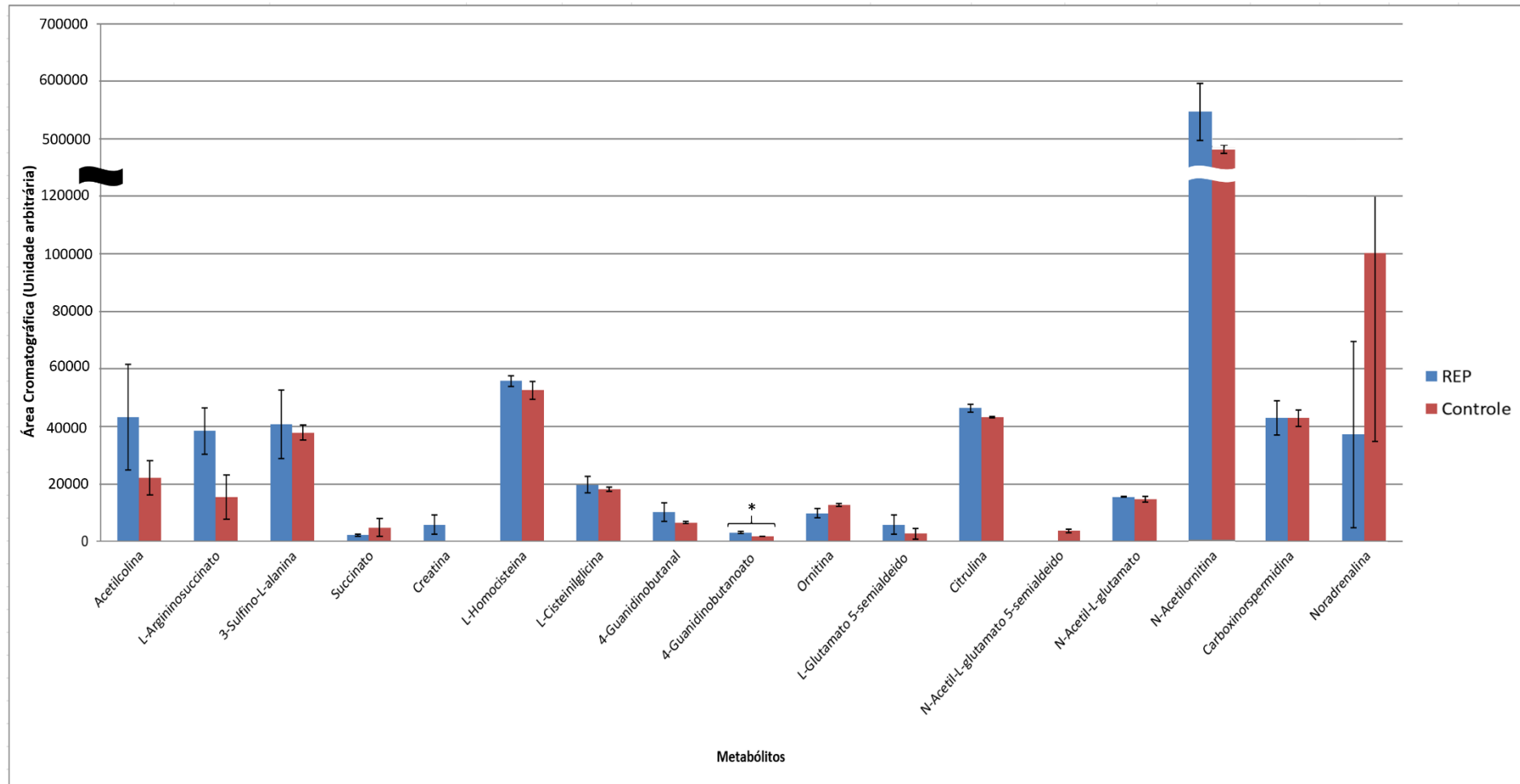
**Tabela 13.** Compostos identificados no cérebro de abelhas *A. mellifera* (REP 1 e REP 2) por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos [Escore – Escore da identificação (de acordo com a tabela 2); **RT meas.** – tempo de retenção medido experimentalmente (em minutos); **RT esp.** – tempo de retenção esperado para o composto (em minutos); **d RT** – variação no tempo de retenção (em minutos); **m/z calc.** – *m/z* teórico; **m/z meas.** – *m/z* medido experimentalmente; **Área** – média das áreas cromatográficas, expressa em unidades arbitrárias, obtidas para o mesmo composto em REP 1 e REP2]; **Desvio Padrão** – calculado a partir dos valores de média das áreas cromatográficas obtidas em REP 1 e REP 2.

Nome do Composto	Fórmula Molecular	Escore	RT exp. [min.]	mSigma	m/z calc.	m/z meas.	Err [mDa]	Área	Desvio Padrão
<b>Acetilcolina</b>	C7H16NO2	+	6.6	6.7	147.1254	147.1207	- 4.7	43231.62	18448.1
<b>L-Argininosuccinate</b>	C10H18N4O6	+	1.6	90.6	291.1299	291.1308	0.9	38427.37	8137.3
<b>3-Sulfino-L-alanine</b>	C3H7NO4S	+	2.6	21.3	154.0169	154.0239	7	40821.16	11965.2
<b>Succinato</b>	C4H6O4	+	34.8	551.1	119.0339	119.0314	2.4	2256.59	348.9
<b>Creatina</b>	C4H9N3O2	+	1.7	68.7	132.0768	132.0768	0.0	5876.01	3336.8
<b>L-Homocisteine</b>	C4H9NO2S	+	8.8	29.3	136.0427	136.0443	1.6	55824.51	1871.6
<b>L-Cisteinilglicina</b>	C5H10N2O3S	+	22.2	57.3	179.0485	179.0570	8.5	19775.18	2793.5
<b>4-Guanidinobutanal</b>	C5H11N3O	+	6.6	91.1	130.0975	130.0973	0.2	10244.36	3240.9
<b>4-Guanidinobutanoato</b>	C5H11N3O2	+	1.6	88.6	146.0924	146.0910	- 1.4	3194.1	304.5
<b>Ornitina</b>	C5H12N2O2	+	14	316.7	133.0972	133.0971	- 0.1	9890.28	1653.1
<b>L-Glutamate 5-semialdeido</b>	C5H9NO3	+	1.7	66.5	132.0655	132.0645	- 1.1	5881.47	3322.7
<b>Citrulina</b>	C6H13N3O3	+	8.8	36.7	176.1030	176.1028	- 0.2	46372.72	1440.3
<b>N-Acetil-L-glutamato</b>	C7H11NO5	+	1.5	28.1	190.0710	190.0706	- 1.9	15530.28	174.7
<b>N-Acetilornitina</b>	C7H14N2O3	+	8.7	3.9	175.1077	175.1075	0.2	544042.81	36100.9
<b>Carboxinorspermidina</b>	C7H17N3O2	+	8.8	27.3	176.1394	176.1387	0.6	42898.87	5957.0
<b>Noradrenalina</b>	C8H11NO3	+	50.6	339.5	170.0812	170.0837	2.5	37174.44	32403.5

Dos 47 metabólitos presentes na segunda biblioteca metabolômica, 17 foram identificados, sendo que 15 compostos são comuns a ambos os grupos (REP e controle). A creatina foi identificada apenas no grupo REP; o N-acetil-L-glutamato 5-semialdeído foi encontrado apenas no grupo controle. Dos metabólitos comuns a ambos os grupos experimentais, apenas o 4-guanidinobutanoato foi encontrado com diferenças “semi-quantitativas” estatisticamente significantes. Os resultados estatísticos obtidos a partir da aplicação do teste estatístico *t* de *Student* para os metabólitos identificados podem ser visualizados na tabela 14. Na figura 8 pode-se visualizar a comparação do perfil global de metabólitos identificados nos grupos controle (azul) e REP (vermelho).

**Tabela14.** Resultado do teste estatístico *t* de *Student*, para os compostos identificados a partir da biblioteca criada sem a utilização de padrões comerciais. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p < 0,05$  (valores assinalados com \*).

Nome do Composto	Área Cromatográfica (Controle 1)	Área Cromatográfica (Controle 2)	Área Cromatográfica (REP 1)	Área Cromatográfica (REP 2)	Test T
Acetilcolina	17891.29	26468.91	30186.85	56276.39	0.168
L-Argininosuccinate	10107.7	20963.75	44181.32	32673.42	0.051
3-Sulfinio-L-alanine	39766.93	36047.87	32360.50	49281.82	0.395
Succinato	7081.62	2688.44	2503.27	2009.91	0.221
Creatina	-	-	3516.52	8235.49	-
L-Homocisteine	50401.7	54797.9	57147.91	54501.12	0.179
L-Cisteinilglicina	17662.05	18666.31	21750.47	17799.89	0.281
4-Guanidinobutanal	6398.37	6930.63	7952.68	12536.03	0.180
4-Guanidinobutanoato	1786.77	1795.89	3409.39	2978.76	0.048*
Ornitina	13120.05	12386.17	8721.34	11059.22	0.112
L-Glutamate 5-semialdeído	1489.25	4043.98	3532	8230.94	0.197
Citrulina	43106.03	43470.84	45354.29	47391.15	0.097
N-Acetil-L-glutamato 5-semialdeído	3258.3	4139.15	-	-	-
N-Acetil-L-glutamato	14077.9	15488.65	15653.83	15406.72	0.239
N-Acetilornitina	492393.38	499368.81	518515.65	569569.97	0.153
Carboxinorspermidina	40952.47	44956.98	38686.60	47111.13	0.496
Noradrenalina	146824.27	53955.57	60087.2	14261.68	0.192



**Figura 8.** Comparação do perfil global de metabólitos identificados nos grupos controle (azul) e REP (vermelho), através da utilização da biblioteca criada sem padrão sintético. Foram utilizados os valores médios de área para a representação gráfica. As diferenças de concentração estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ) foram marcadas com “\*”.

Alguns compostos tais como a serotonina, a dopamina e a tiramina já foram descritos para *A. mellifera* (BICKER, 1999; GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012), mas não foram identificados pela técnica de LC-ESI aplicada no presente trabalho. A não detecção de alguns compostos pode ser explicada por algumas razões técnico-biológicas: a extração de amostra pode não ter favorecido a extração destes compostos; alguns compostos podem ter sofrido degradação durante o processo de preparação de amostra, uma vez que nesse processo os compartimentos celulares são rompidos (as enzimas entram em contato com seu substratos, causando a degradação de alguns dos compostos sob investigação); alguns metabólitos podem não ter sido encontrados, pois não estavam presentes em concentração suficiente para serem detectados, mesmo utilizando uma técnica de alta resolução.

#### **4.6 Resultados das análises de MALDI MSI: Método de preparação de amostra para MALDI MSI, distribuição de metabólitos no cérebro, e análise do perfil metabolômico**

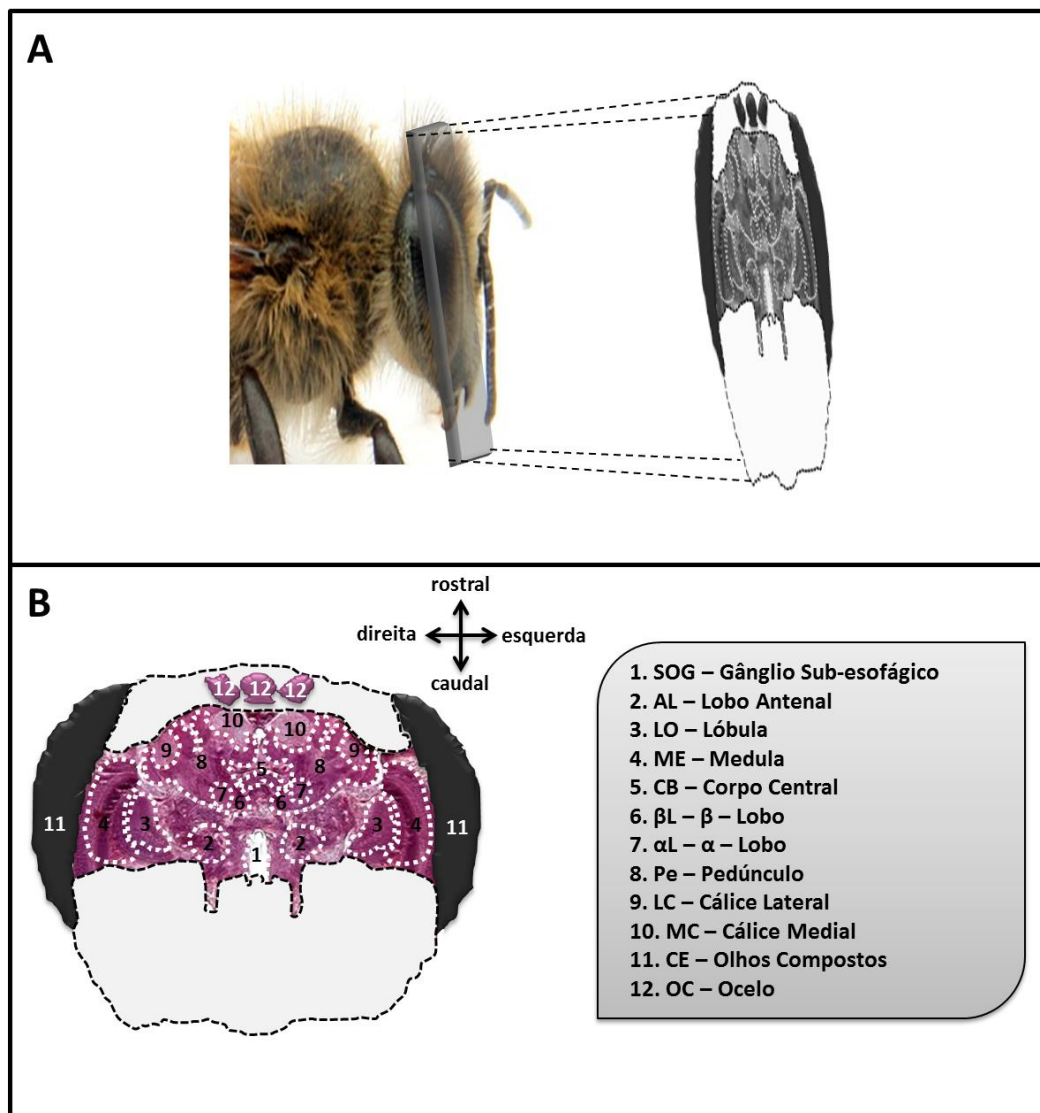
Após a análise do metaboloma global, utilizando a técnica de LC-ESI, foi desenvolvida uma plataforma analítica de MALDI MSI para o mapeamento e estudo da distribuição espacial dos metabólitos identificados em cortes de cérebro de abelhas, para correlação do comportamento ensaiado com a distribuição regionalizada destes metabólitos na morfologia do cérebro. Nesse sentido, também foi desenvolvido um protocolo experimental de análises semi-quantitativas, com o uso da técnica MSI.

Em um experimento de MALDI MSI um dos passos mais importantes é a preparação de amostra, uma vez que esse processo interfere diretamente na boa qualidade dos espectros de massa e na reprodutibilidade do experimento (SEELEY e CAPRIOLI, 2008).

Desde o século XIX, a anatomia e a função do cérebro de abelhas têm sido estudadas através da dissecação do cérebro da cápsula da cabeça (DUJARDIN, 1850). Todavia, a estrutura tridimensional e a estereo geometria é alterada por essa manipulação e pela subsequente fixação do cérebro fora da cabeça, o que pode acarretar na perda de informações biológicas relevantes, tais como informações que correlacionem a atuação de um centro nervoso específico exercendo uma determinada função (HADDAD et al., 2004; BRANDT et al., 2005). Nesse contexto, foi desenvolvida uma metodologia de preparação de amostra que permitiu o estudo de imageamento por espectrometria de massas do cérebro de abelha, sem que houvesse a

necessidade de dissecção do cérebro da cápsula da cabeça. Através da não dissecção do invólucro da cabeça foi possível manter a delimitação e a rigidez mecânica natural, na qual o cérebro está submetido *in vivo*, o que diminuiu consideravelmente a deformação do cérebro durante a preparação da amostra.

As secções histológicas foram obtidas no plano sagital da posição rostral (região do eixo maior da capsula cefálica), como representado na figura 9 A. O mapa de contorno é mostrado na figura 9 B, onde é possível observar o posicionamento do cérebro da abelha em relação ao corpo do inseto, como indicado pelas flechas. A organização do cérebro de abelhas em diferentes regiões especializadas (centros nervosos), de acordo com a histologia do órgão, como sugerido por Rybak e colaboradores (2010) no atlas HSB digital para uma secção sagital, resultou em um mapa de contorno apresentando 12 diferentes regiões. Desse modo é possível observarmos uma simetria no cérebro de abelhas, considerando um eixo virtual passando pelo Gânglio sub-esofágico (1), Corpo central (5) e pelo ocelo central (12). De modo simétrico entre os hemisférios direito e esquerdo do cérebro temos o lobo antenal (2), lóbula (3), medula (4), lobo  $\beta$  (6), lobo  $\alpha$  (7), pedúnculo (8), cálice lateral (9), cálice medial (10); até mesmo os olhos compostos (11) apresentam uma distribuição simétrica em relação ao cérebro.



**Figura 9.** Representação do plano sagital em cabeças de abelhas *A. mellifera*, indicando o plano de secção do cérebro (A). Vista frontal da secção do cérebro no plano sagital da cabeça de abelhas, mostrando as diferentes regiões do cérebro, que são indicadas por números de 1 a 12, com suas respectivas legendas (B). Adaptado de Pratavieira et al., 2014.

Em experimentos de MALDI MSI um dos passos mais importantes é a deposição da matriz; o uso do *spray* por toda a superfície do corte pode ocasionar “encharcamento” dos compartimentos histológicos, levando a mudança de osmolalidade do tecido, seguido do rompimento dos comportimentos celulares, e a conseqüente deslocalização das moléculas presentes na amostra. Nesse contexto, utilizamos um processo sofisticado de deposição de matriz, conseguido através da utilização de uma “impressora química”. O equipamento combina a função de varredura de superfície com um algoritmo utilizado para controlar a região específica de deposição de matriz, bem como a quantidade de solução a ser depositada (a nível de pL), que é aplicada por um processo piezoelétrico. Além disso, esse sistema garante que os experimentos de

aquisição de dados de MALDI MSI sejam realizados de modo automatizado, com elevada reprodutibilidade, mantendo intactos os compartimentos celulares. Outra vantagem do método é o acoplamento do equipamento com o espectrômetro de massas, que permite a aquisição de uma enorme quantidade de dados em um curto espaço de tempo (obtenção de aproximadamente 125000 espectros/análise em 10 minutos).

A matriz utilizada para a análise dos metabólitos foi o DHB, pois essa é uma matriz amplamente utilizada em análises MALDI-MSI de moléculas biológicas com baixas massas moleculares, tais como lipídeos e metabólitos (HORN e CHAPMAN, 2014; STOYANOVSKY et al., 2014). O DHB é um ácido orgânico fraco ( $pK_a = 2.95$ ) que facilita a detecção e reduz a probabilidade dessas moléculas serem destruídas durante os eventos de ionização e dessorção (STOYANOVSKY et al., 2014). Com a finalidade de melhorar a protonação dos analitos o TFA ( $pK_a = 0.23$ ) foi adicionado à solução de DHB. O DHB exibe um espectro UV com a máxima em 355 nm, o que o torna uma matriz apropriada para análises em espectrômetros de massa do tipo MALDI que utilizam laser de  $N_2$ , em especial os lasers centrados a 337 nm (STOYANOVSKY et al., 2014).

Durante o processo de padronização foram testadas várias concentrações de DHB e diferentes proporções de solvente a fim de se verificar em qual condição haveria melhor ionização dos analitos estudados. Foram testadas as seguintes soluções de matriz para deposição: (i) DHB – 50 mg/ml em solução de metanol 50 % (v/v) contendo 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (adaptado de HAYASAKA et al., 2009; YE et al., 2013a; YE et al., 2013b; HORN e CHAPMAN, 2014); (ii) DHB – 50 mg/ml em solução de metanol 70 % (v/v) contendo 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (adaptado de HAYASAKA et al., 2009; HORN e CHAPMAN, 2014); (iii) DHB – 150 mg/ml em solução de metanol 70 % (v/v) contendo 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (adaptado de HAYASAKA et al., 2009; YE et al., 2013a; YE et al., 2013b; HORN e CHAPMAN, 2014); (iv) e DHB – 150 mg/mL em solução de metanol 50 % (v/v) contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (adaptado de YE et al., 2013a; YE et al., 2013b). Após os diferentes testes observou-se que a solução de DHB 150 mg/mL em solução de metanol 50 % (v/v) contendo 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético, produziu uma cristalização mais uniforme que as demais, e também resultou em espectros com maiores relações sinal/ruído (S/R).

#### **4.7 Desenvolvimento do método de MALDI MSI semi-quantitativo**

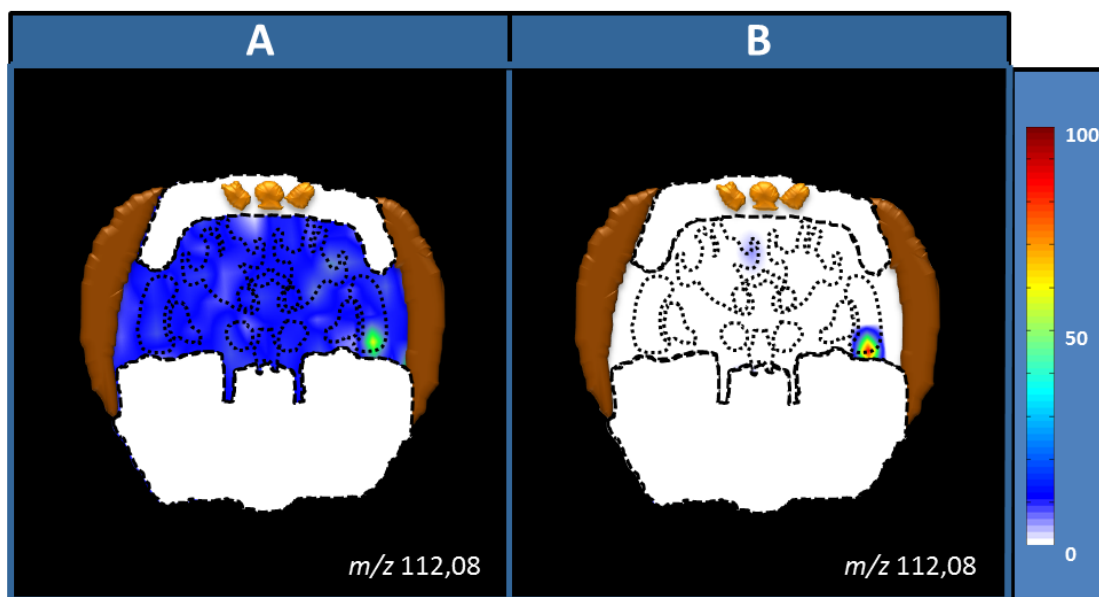
Tendo em vista a reduzida capacidade quantitativa obtida através de um experimento de MALDI MSI convencional, no presente trabalho buscou-se desenvolver uma metodologia inovadora que permitisse a análise semi-quantitativa de metabólitos em cérebro de abelhas *A. mellifera*, através da utilização da técnica de MALDI MSI. Sabe-se que variações na composição química dos tecidos resultam em variações na eficiência de extração e ionização dos analitos, e que a intensidade dos íons não é simplesmente dependente da concentração do analito, mas também do ambiente químico no qual a molécula se encontra, tornando a comparação entre diferentes tecidos e entre diferentes localidades dentro de um mesmo tecido, difícil de ser realizada. Na tentativa de superar esse desafio, a aplicação de um padrão interno (PI) durante a preparação de amostra tem sido sugerida (PIRMAN et al., 2013a; PIRMA et al., 2013b; ELLIS, BRUINEN e HEEREN, 2014). Com isso pretende-se controlar a variação no sinal dos analitos, e identificar variações de sinal específicas do tecido. A aplicação de um padrão interno de modo uniforme não leva apenas a melhoria na reprodutibilidade dos sinais, mas ajuda a superar o desafio da variação dos sinais dos íons como resultado de uma extração tecido-específica, ou de diferenças na ionização e na extração de cada íon, de uma região para outra do mesmo tecido, uma vez que o mesmo é histologicamente e bioquimicamente heterogêneo.

O PI em qualquer experimento analítico deve se comportar quimicamente o mais próximo possível dos analitos de interesse, garantindo que sua extração e ionização sejam muito semelhante àquela do analito (PIRMAN et al., 2013a; PIRMAN et al., 2013b; ELLIS, BRUINEN e HEEREN, 2014). A utilização de PIs semelhantes aos metabólitos sob análise, diferenciados apenas por deuteração dos PIs é a opção que fornece as características químicas mais próximas do analito, constituindo, de modo geral, a melhor opção de PI. Pirman e colaboradores (2013a) utilizaram essa estratégia para fazer análises quantitativas de cocaína em cérebro humano (núcleo accumbens). No presente trabalho, a utilização de isótopo marcado não foi adotada, pois temos como objetivo realizar uma análise generalista dos metabólitos encontrados no cérebro de abelhas *A. mellifera*, e não uma análise direcional de um ou poucos compostos, como realizado por PIRMAN e colaboradores (2013a). Nesse caso, buscou-se um composto de baixa massa molecular de sistema nervoso (de preferência um neurotransmissor), que tivesse características de ionização, extração e cristalização semelhante à dos analitos de interesse, e que não estivesse presente no cérebro de abelhas. Análises de LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> de cérebro de abelha realizadas demonstraram a ausência de

feniletilamina (2-FEA) no cérebro desses insetos. Esse composto, caracterizado como sendo um neurotransmissor do sistema nervoso de mamíferos, foi utilizado como PI no presente estudo.

Através do monitoramento da relação S/R do PI, foi possível levar em consideração as variações nos sinais dos íons de interesse, resultando em imagens mais reprodutíveis e que melhor representam a concentração do analito. A aplicação do PI no tecido pode ocorrer basicamente de três modos: (i) juntamente com a solução de matriz; (ii) antes da aplicação de matriz; e (iii) aplicação abaixo do tecido, antes do tecido aderir a lâmina, e antes da aplicação de matriz (PIRMAN et al., 2013a; PIRMA et al., 2013b; ELLIS, BRUINEN e HEEREN, 2014). A aplicação do PI juntamente com a solução de matriz foi a estratégia que melhor proporcionou a extração dos íons e co-cristalização do PI juntamente com os analitos.

Para testar a viabilidade da utilização do PI foram realizados testes com abelhas de 20 dias (não submetidas ao ensaio de REP), utilizando-se os procedimentos descritos anteriormente. Na figura 10 pode-se observar o resultado obtido para a análise de histamina ( $m/z$  112,08 na forma  $[M+H]^+$ ) no cérebro de abelha, sem a deposição de padrão interno (A), e com a aplicação de 2-FEA como PI (B). Os resultados comprovam que a aplicação de PI juntamente com a matriz durante o preparo de amostra, bem como a normalização dos dados com base na intensidade do 2-FEA, resultou em imagens melhor definidas, com menos ruído, e que melhor representam a concentração do analito. Aparentemente, a utilização de um padrão interno criou um novo referencial de linha de base e de ruído, que ao ser subtraída do espectro da amostra deixou o sinal “limpo”, melhorando muito a localização dos sinais específicos de cada analito.

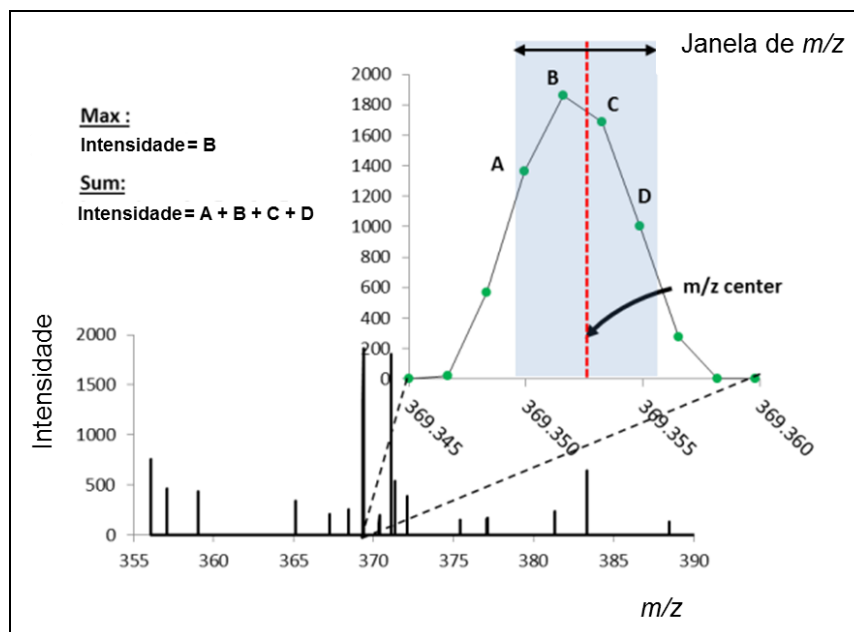


**Figura 10.** Imagem gerada por espectrometria de massas da histamina ( $m/z$  112,08 na forma  $[M+H]^+$ ) comparando uma análise sem a deposição de padrão interno (A), e uma análise com aplicação de 2-feniletilamina como padrão interno e normalização dos dados (B).

#### 4.8 Parâmetros de processamento dos dados de MALDI MSI no algoritmo MSiReader

Após testar os diferentes algoritmos possíveis de processamento e análise dos dados de MALDI MSI, bem como os diferentes formatos de armazenamento dos dados (descritos no item 1.4.1), ficou estabelecido a utilização do algoritmo MSiReader v0.05, devido a ampla variedade de ferramentas e recursos disponíveis para a análise dos dados de MSI. Padronizou-se a utilização dos dados no formato mzXML, pois esse formato possibilita o armazenamento de grande parte dos parâmetros do espectrômetro de massas, e devido a facilidade de conversão dos dados brutos obtidos com instrumentos Shimadzu para mzXML.

O método utilizado para calcular a intensidade exibida nas imagens geradas por espectrometria de massas foi o *Max of Window (Max)*, no qual sempre o valor máximo de intensidade dentro de uma janela de  $m/z$  ( $\pm 0.3$  Da) será representado nas imagens (figura 11). Esse método foi selecionado, pois otimiza o processamento de grande quantidade de dados.



**Figura 11.** Definição de janela de valores de  $m/z$  com o uso do algoritmo MsiReader, para selecionar um valor de intensidade. No método *Max of Window (Max)* a intensidade selecionada é aquela de maior intensidade dentro de uma mesma janela de  $m/z$ ; todavia, no método *Sum of Window (Sum)* é realizado a soma das intensidades dos picos dentro de uma mesma janela.

Foi realizada a subtração do ruído analítico e da amostra. Para a realização desse procedimento dois arquivos foram gerados: (i) arquivo contendo os dados de massas oriundo da análise das secções histológicas onde foram depositados solução de matriz contendo PI, e (ii) arquivo contendo os dados de massas oriundo da análise da deposição da solução de matriz, sem padrão interno aplicado sob a mesma sonda utilizada em (i), porém em uma região sem secções histológicas. Essa análise (ii) foi realizada exclusivamente para obtenção de sinais de contaminantes, e íons oriundos da matriz, seguindo rigorosamente as mesmas condições experimentais das análises (i), incluindo resolução lateral, número de coordenadas  $x$  e  $y$  e os parâmetros do espectrômetro de massas descritos no item 3.9.2.

Dessa forma, para a obtenção das imagens geradas por espectrometria de massas, a média dos espectros nas diferentes coordenadas  $x$  e  $y$  no arquivo (ii) são subtraídos dos valores de intensidade **Max** (intensidade do pico) em todos os espectros de massa nas coordenadas correspondentes do arquivo (i).

A correção da linha de base foi realizado em todos os espectros de massa através da função *msbackadj()* do Matlab; foram utilizados os parâmetros padrão para a realização dessa operação: WindowSize: 200; SteoSize: 200; RegressionMethod: pchip;

EstimationMethod: quantile; SmoothMethod: nome; QuantileValue: 0,1;  
 PreserveHeights: false.

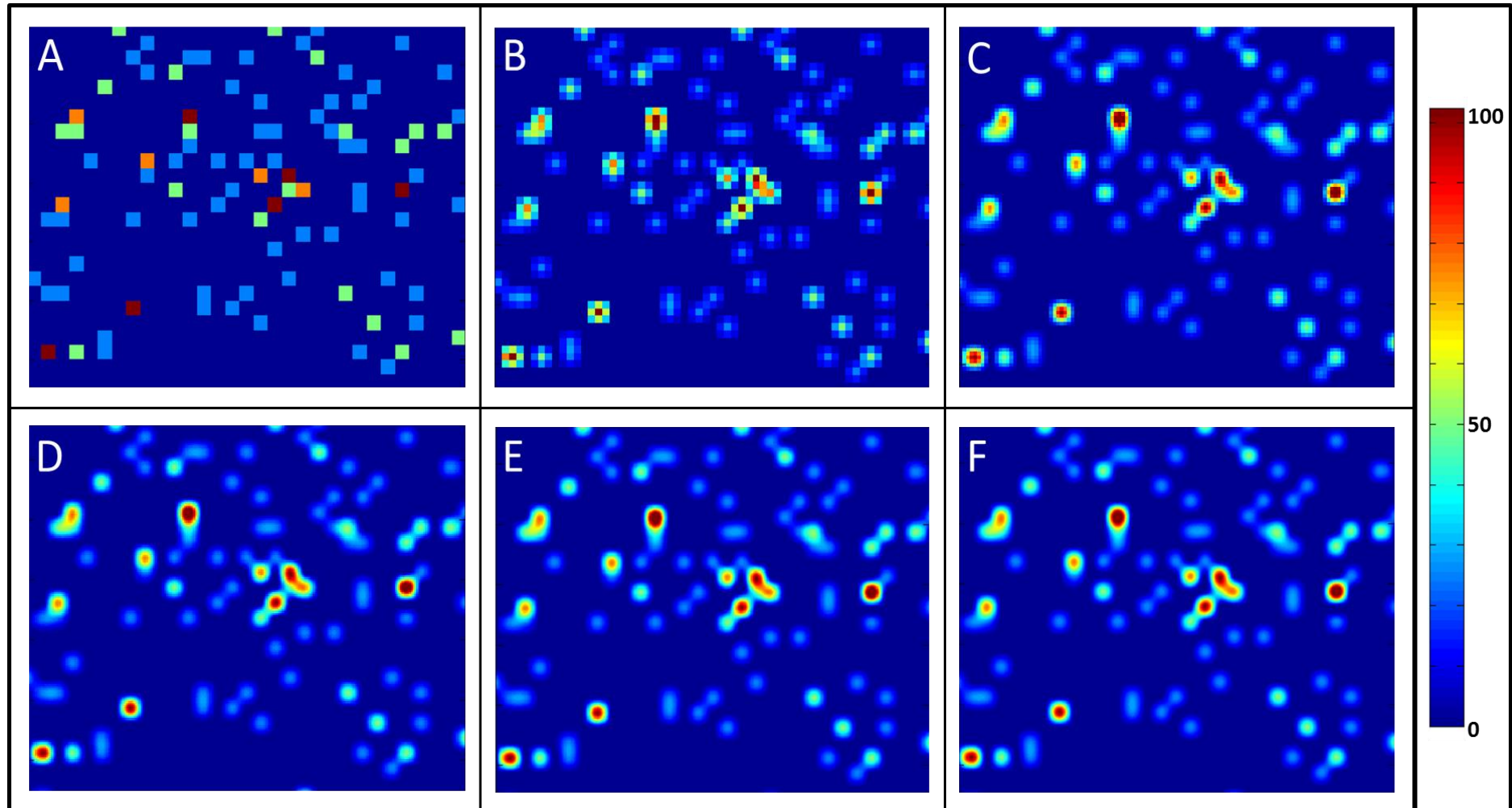
Através do algoritmo MSiReader v0.05 também foi possível a realização da normalização dos valores de intensidade nos dados de MALDI MSI com base na intensidade do valor de  $m/z$  específico do PI. O valor de  $m/z$  da molécula protonada ( $[M+H]^+$ ) utilizado para os cálculos foi 122.18. Para cada espectro de massas, a normalização só foi realizada quando a intensidade do pico de referência estava acima de 1000 (*normalization cutoff*). As intensidades normalizadas foram redimensionadas para a escala de 1.000.000, por padrão.

Dessa forma a normalização da intensidade de cada molécula analisada (metabólito) é calculada pela relação existente entre intensidade **Max** desse composto, dividido pelo valor de intensidade **Max** do padrão interno na mesma coordenada  $x$  e  $y$ .

O algoritmo abaixo foi aplicado para a realização dos cálculos de normalização das intensidades:

$$I_{\text{final}, x, y} = \frac{\text{Max}(I_{\text{janela de } m/z \text{ (metabólito)}, x, y})}{\text{Max}(I_{\text{janela de } m/z \text{ (P.I.)}, x, y})} \times 1000000$$

Por último, foi aplicado um passo de processamento das imagens através da aplicação do método de interpolação cúbica de ordem 5 dos pixels das imagens. Basicamente, a interpolação de imagens tem por objetivo estimar o valor entre dois pontos (dentro de um sistema de coordenadas cartesianas) para os quais se conhecem os valores, conferindo-lhes, então, a continuidade de pixels desejada. Nesse caso, a função interpoladora consiste num polinômio de quinta ordem, calculado para identificar a curva polinomial que melhor se ajuste aos dados disponíveis. É interessante que esta curva seja suave o bastante para atender a exigência estética, uma vez que o olho humano é capaz de perceber discontinuidades dos resultados obtidos com a interpolação de grau um e dois, mas não de graus superiores (3, 4 e 5, por exemplo). Na figura 12 pode-se observar, com mais detalhe, diferentes graus de interpolação aplicados as imagens geradas por espectrometria e massas.

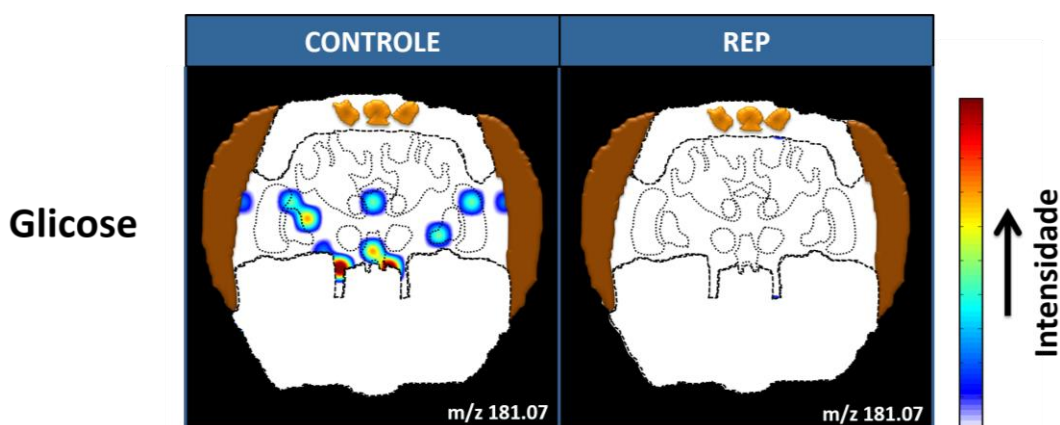


**Figura 12.** Imagens geradas por espectrometria de massas com a aplicação de diferentes graus de interpolação, criadas a partir do algoritmo MSiReader v0.05. (A) Não foi aplicado um método de interpolação (grau 0). (B) Aplicação do método de interpolação de grau 1. (C) Aplicação do método de interpolação de grau 2. (D) Aplicação do método de interpolação de grau 3. (E) Aplicação do método de interpolação de grau 4. (F) Aplicação do método de interpolação de grau 5.

Em síntese, o método de interpolação foi aplicado para a criação das imagens geradas por espectrometria de massas com a finalidade de estimar os valores de intensidades dos diferentes compostos nos pontos intermediários daqueles que se conhecem os valores exatos de intensidade (pontos  $x$  e  $y$  experimentais), conferindo a continuidade de pixels desejada. O esquema de interpolação aplicado permitiu que as imagens fossem ampliadas em tamanho, sempre mantendo a alta resolução da imagem final.

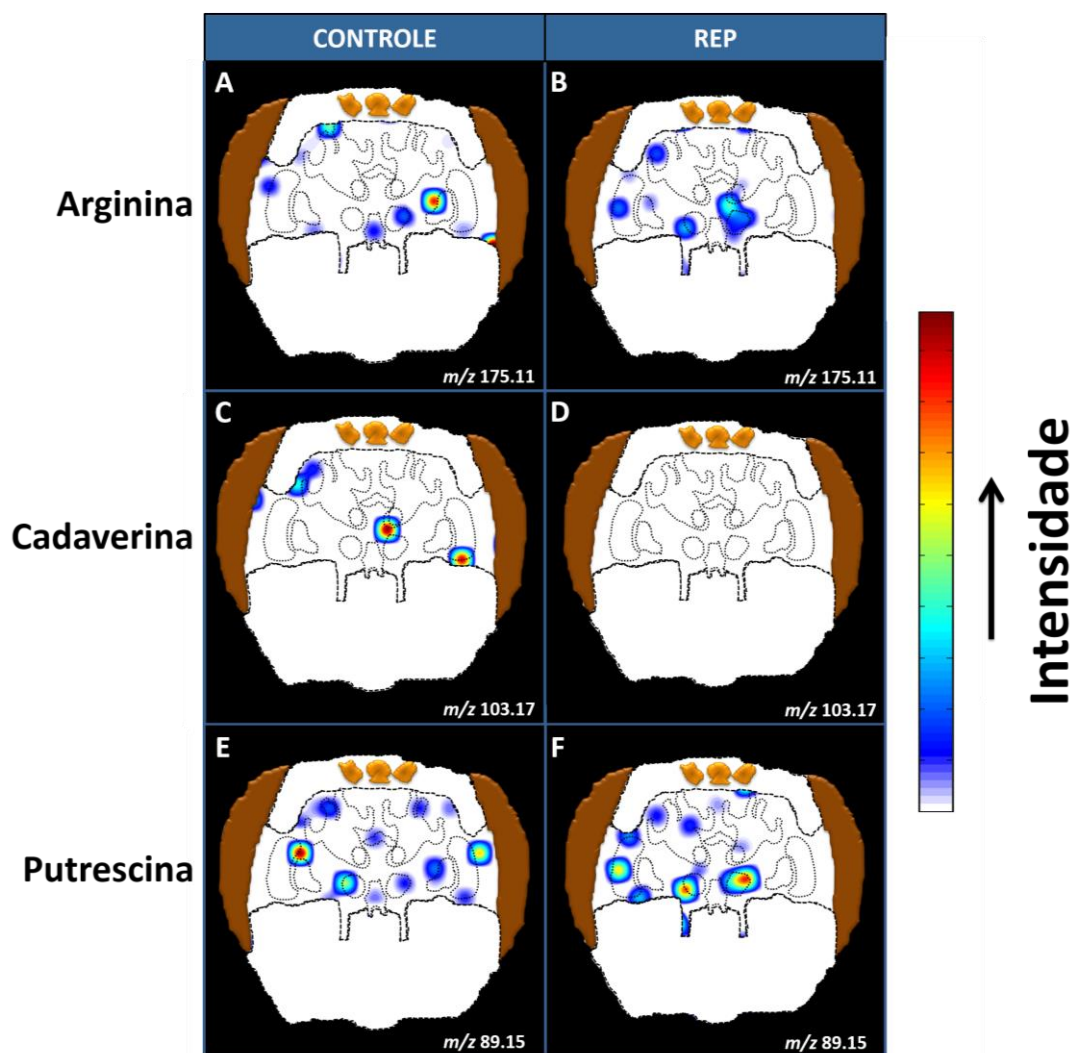
Para fins de ilustração, no presente trabalho foram adquiridas imagens geradas por espectrometria de massas para alguns dos compostos identificados por LC-ESI que se revelaram importantes no metaboloma do cérebro de abelhas. Imagens geradas por espectrometria de massas de vários outros metabólitos (de maior ou menor importância) podem ser visualizadas no anexo II, ao final dessa dissertação.

Na figura 13 podemos observar a imagem gerada por espectrometria de massas da glicose nos indivíduos do grupo controle (coluna da esquerda) e nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental de REP (coluna da direita). Nessas imagens, o padrão de coloração representa um método semi-quantitativo baseado em uma escala de cores que varia do de 0% a 100%. Dessa forma, regiões que apresentam maiores concentrações dos metabólitos estão representadas próximo da intensidade de 100%, e regiões com menores concentrações estão representadas por cores em gradiente decrescente em intensidade. No grupo controle a glicose concentrava-se especialmente nos lobos ópticos, gânglio sub-esofágico, corpo central e lobos  $-\alpha$  e  $-\beta$ . No grupo REP esse composto não foi detectado.



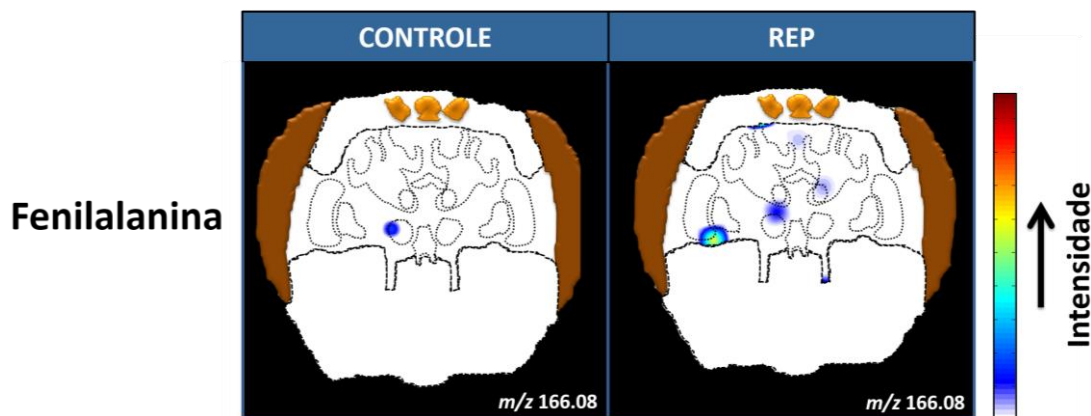
**Figura 13.** Imagens geradas por espectrometria de massas da glicose identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  181.07, na forma  $([M+H]^+)$ .

Na figura 14 podemos observar as imagens geradas por espectrometria de massas para a arginina e algumas poliaminas naturais, tais como a cadaverina e putrescina. A arginina foi detectada no grupo controle (figura 14 A) nas regiões dos lobos ópticos, gânglio sub-esofágico, cálices medial e lateral direito e lobo antenal esquerdo. No grupo REP (figura 14 B) esse analito apresenta-se, de modo geral, com menor concentração relativa, concentrando-se especialmente nas regiões dos lobos antenais direito e esquerdo, lobo óptico direito, cálice lateral direito e cálice medial esquerdo. A cadaverina foi detectada no grupo controle (Figura 14 C) nas regiões da medula esquerda, lobos  $-\alpha$  e  $-\beta$  esquerdo e cálice lateral direito; já no grupo REP (figura 14 D) a cadaverina não foi identificada. A putrescina foi detectada no grupo controle (figura 14 E) nas regiões dos lobos ópticos, lobos antenais, gânglio sub-esofágico, corpo central e cálices lateral e medial. No grupo REP (figura 14 F) podemos observar um grande aumento na concentração relativa da putrescina, que se deu em especial nos lobos antenais.



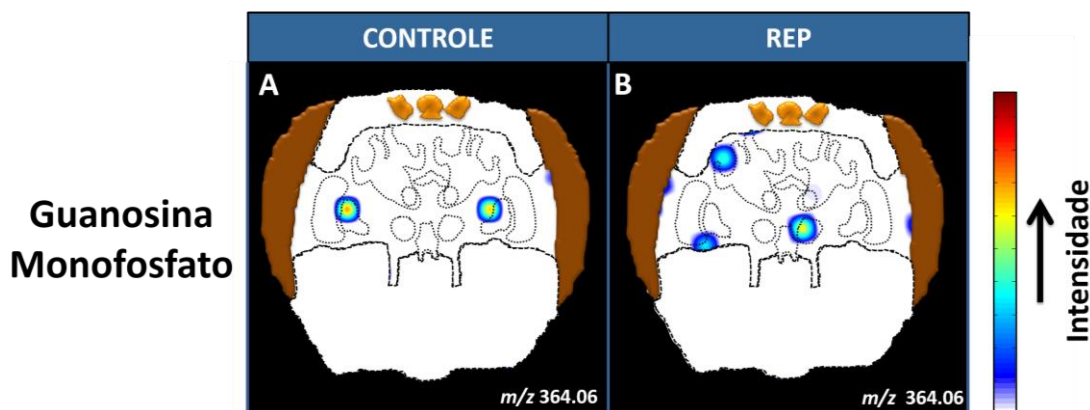
**Figura 14.** Imagens geradas por espectrometria de massas da arginina, cadaverina e putrescina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. A e B – imagens geradas por espectrometria de massas da arginina, obtidas a partir da molécula protonada de  $m/z$  175.11, na forma  $([M+H]^+)$ ; C e D – imagens geradas por espectrometria de massas da cadaverina, obtidas a partir da molécula protonada de  $m/z$  103.17, na forma  $([M+H]^+)$ ; E e F – imagens geradas por espectrometria de massas da putrescina, obtidas a partir da molécula protonada de  $m/z$  89.15, na forma  $([M+H]^+)$ .

As imagens geradas por espectrometria de massas da fenilalanina (figura 15) mostram que nos indivíduos controle esse aminoácido estava presente em baixíssimas concentrações relativas na região do lobo antenal direito. Por outro lado, nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental REP esse composto estava presente em concentrações relativas muito maiores, e localizavam-se nas regiões dos corpos pedunculados, lobos antenais e lobo óptico.



**Figura 15.** Imagens geradas por espectrometria de massas da fenilalanina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  166.08, na forma  $([M+H]^+)$ .

As imagens geradas por espectrometria de massas da guanosina monofosfato (figura 16) mostram que esse composto se concentrava nas lóbulos direita e esquerda dos lobos ópticos. Nos indivíduos do grupo REP houve um aumento da concentração relativa desse composto, que se deu em especial nas regiões do lobo antenal e dos corpos pedunculados, que são as principais estruturas responsáveis pelo processamento olfativo em abelhas.



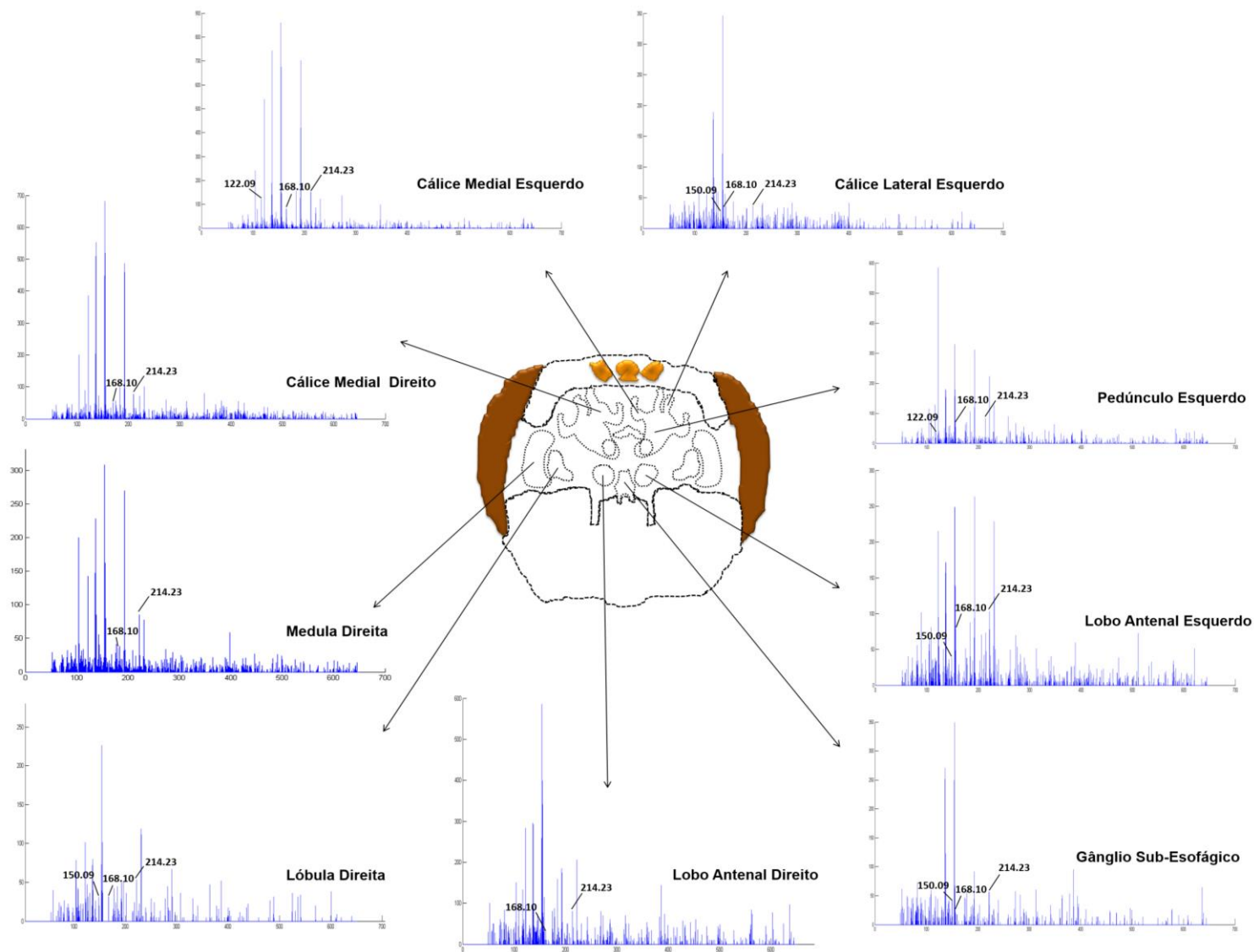
**Figura 16.** Imagens geradas por espectrometria de massas da guanosina monofosfato identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  364.06, na forma  $([M+H]^+)$ .

#### 4.9 Compostos identificados exclusivamente por MALDI MSI

Alguns dos compostos presentes nas bibliotecas metabolômicas não foram identificados pela análise em LC-ESI-MS, mas foram identificados nas análises realizadas por MALDI, são eles: ácido caínico, 1,3-diaminopropano, epinefrina, serotonina e tiramina. Apesar da análise em LC-ESI-MS ser mais sensível do que a análise por MALDI, a identificação desses compostos exclusivamente por MALDI por

ser explicada com base nas diferenças de preparo de amostra. Para a análise em solução por LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> os metabólitos foram obtidos através da maceração do cérebro das abelhas; nesse processo os compartimentos celulares são rompidos (as enzimas entram em contato com seus substratos, causando a degradação de alguns dos compostos). Por outro lado, nas análises *in situ* por MALDI os compartimentos celulares não são rompidos, garantindo que as enzimas não entrem em contato com seus substratos, e ocasionem a degradação os analitos. Além disso, as análises por MALDI são realizadas com poucos passos de preparo de amostra, e o intervalo de tempo entre a coleta do material biológico e as análises são muito menores quando comparadas com as análises em solução.

O ácido cáínico é um exemplo de um composto que não foi identificado pela análise em LC-ESI-MS, mas que é identificado por análise de MALDI MSI inclusive pela presença de íons-fragmento. Na figura 17 temos os espectros MS médios de todas as regiões do cérebro em que foram encontradas o ácido cáínico ( $m/z$  214.23) e seus íons-fragmento ( $m/z$  196.09; 168.10; 150.09; 122.09), todos na forma  $[M+H]^+$ .



**Figura 17.** Espectros de massas do ácido cálcico ( $m/z$  214.23) obtido em diferentes regiões do cérebro de *A. mellifera* submetidas ao ensaio de REP, a partir da análise de MALDI MSI. Observa-se também os íons-fragmento de  $m/z$  168.10; 150.09; 122.09, todos na forma  $[M+H]^+$ .

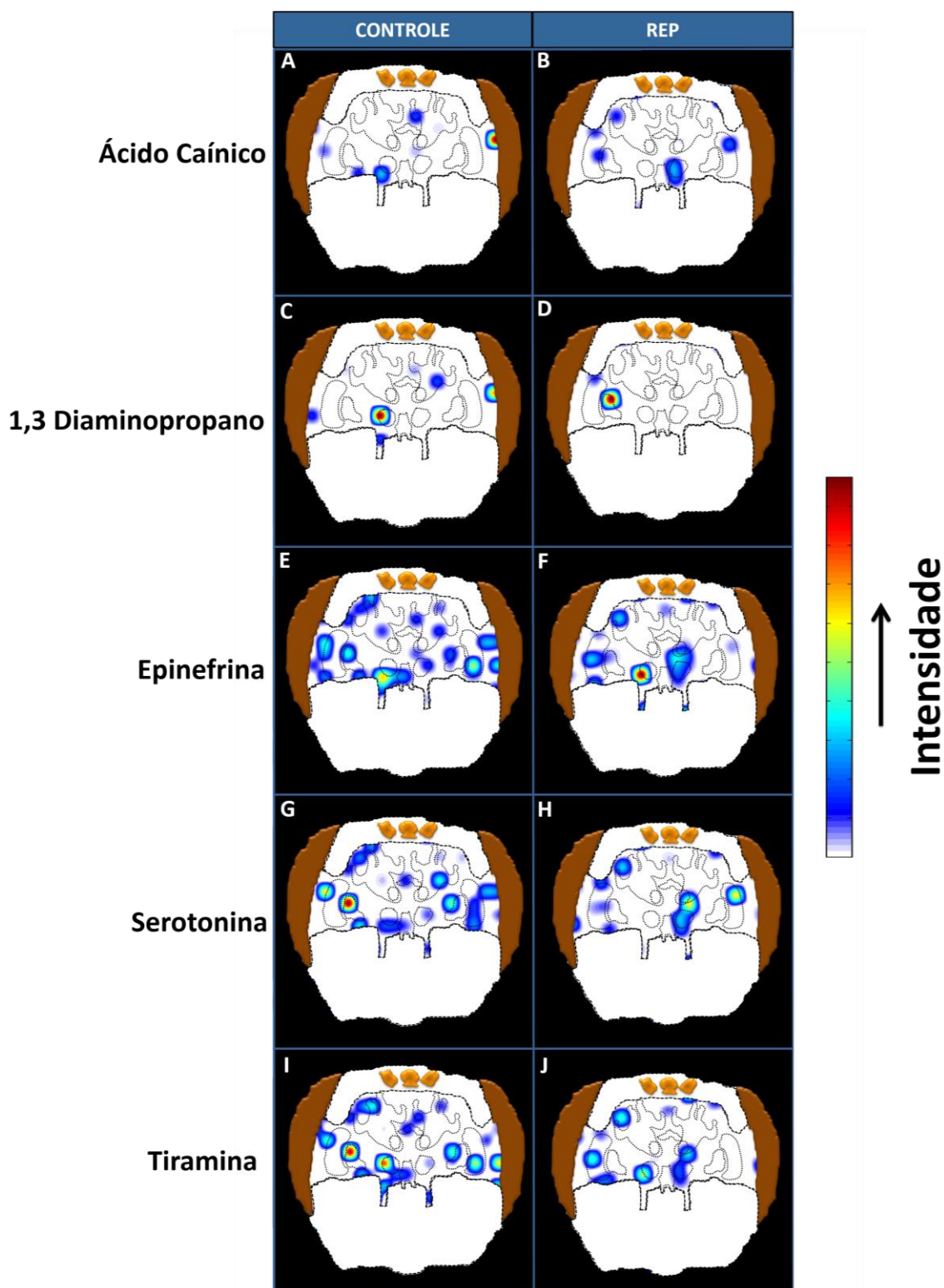
As imagens geradas por espectrometria de massas para os compostos identificados exclusivamente por MALDI MSI podem ser visualizadas na figura 18. Para obtermos uma maior especificidade na distribuição dos analitos no cérebro, foram criadas imagens geradas pela superposição dos valores de  $m/z$  dos metabólitos, bem como dos valores de  $m/z$  dos íons fragmentos. Na figura 18, podemos observar o mapa de distribuição para os seguintes compostos: A e B – ácido caínico; C e D – 1,3-diaminopropano; E e F – epinefrina, G e H – serotonina; I e J – tiramina.

Nas imagens correspondentes ao grupo controle podemos observar um padrão de localização semelhante entre os compostos ácido caínico e 1,3-diaminopropano. O ácido caínico é um potente aminoácido neuroexcitatório que age ativando receptores de glutamato. O 1,3-diaminopropano é uma diamina simples envolvida no metabolismo da arginina e prolina, atuando como precursor da norspermidina e norspermina. Uma maior concentração relativa pode ser observada nos lobos ópticos esquerdo e direito, lobo antenal direito e corpo pedunculado esquerdo. Nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental REP, o ácido caínico sofreu algumas alterações de localização, passando a concentrar-se mais no lobo antenal esquerdo, gânglio sub-esofágico, cálice medial direito e medula direita e esquerda. No grupo REP o 1,3-diaminopropano passou a concentrar-se na região da lóbula e medula direita.

As imagens geradas por espectrometria de massas da epinefrina, serotonina e tiramina apresentam um padrão de distribuição semelhante entre si, porém diferentes do padrão descrito anteriormente para o ácido caínico e 1,3-diaminopropano. A serotonina e tiramina são aminas biogênicas que agem como neuromoduladores no cérebro de abelhas, ou seja, atuam modulando a transmissão sináptica, alterando a quantidade de neurotransmissores liberados na fenda sináptica, e/ou modificando a resposta do neurônio a um determinado tipo de neurotransmissor. A epinefrina é caracterizada por produzir uma variedade de efeitos neurológicos em insetos, que incluem o aumento da atividade do sistema nervoso e a facilitação seguida do bloqueio de sinapses.

A epinefrina, serotonina e tiramina apresentam-se distribuídos por quase todas as regiões do cérebro dos indivíduos do grupo controle, concentrando-se no lobo antenal direito, lobos ópticos, corpo central, gânglio sub-esofágico e corpos pedunculados (em especial nos pedúnculos). Nos indivíduos submetidos ao ensaio de REP houve uma alteração no padrão de distribuição desses compostos, que sofreram uma diminuição de concentração relativa e passaram a concentrar-se em algumas regiões específicas do cérebro. Nos corpos pedunculados, esses compostos deixaram de se concentrar na

região dos pedúnculos e passaram a concentrar-se nas regiões de *input* de informações (cálices lateral e medial) e nas regiões de *outputs* (os lobos  $\alpha$ - e  $\beta$ -). Nos lobos ópticos houve uma ligeira diminuição da concentração relativa desses metabólitos. Houve, também, um aumento de intensidade relativa nas regiões dos lobos antenais.

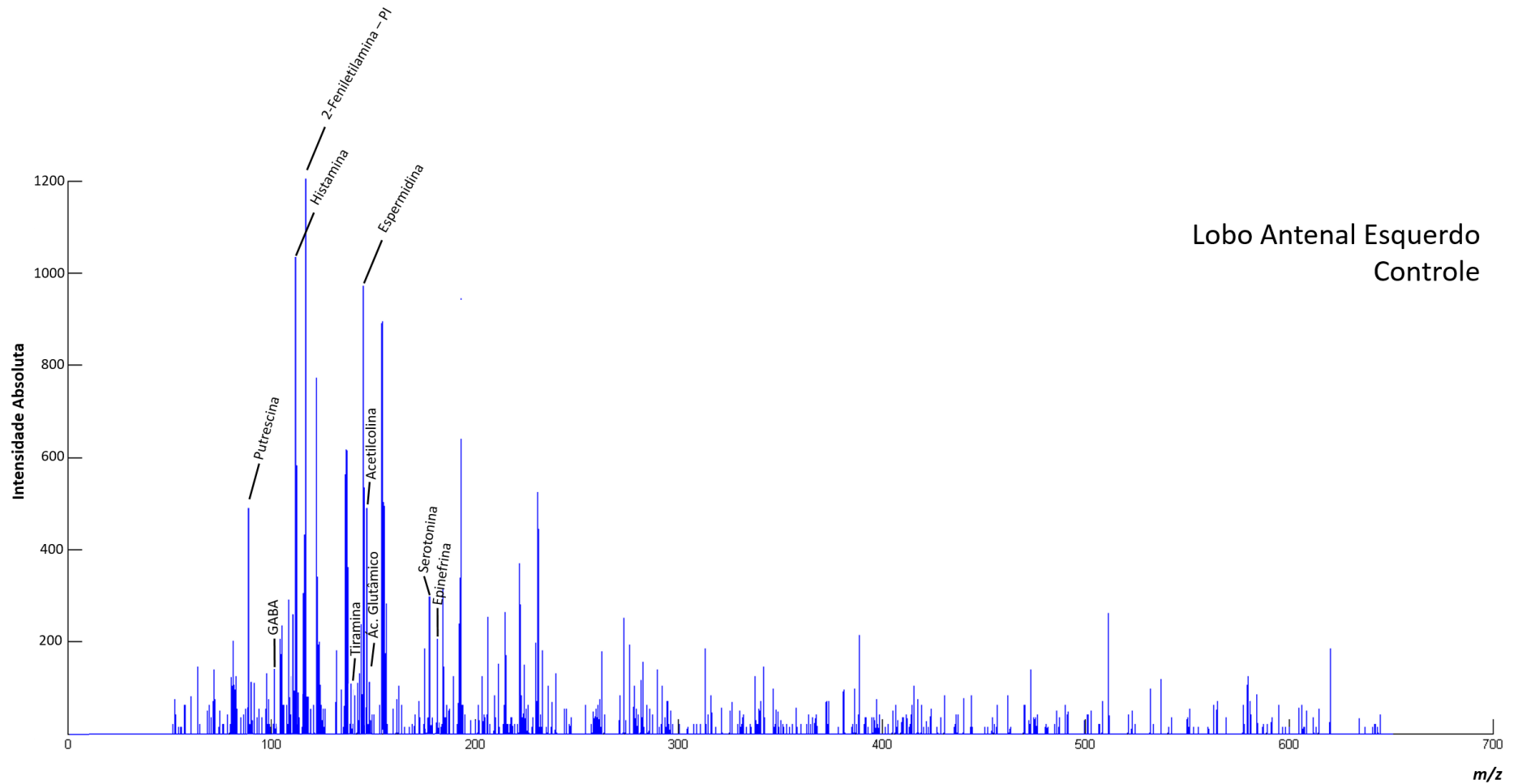


**Figura 18.** Imagens geradas por espectrometria de massas de compostos identificados exclusivamente pela análise de MALDI MSI, comparando os cérebros de abelhas do grupo controle (coluna da esquerda) e REP (coluna da direita). A e B – imagens geradas por espectrometria de massas do ácido caínico, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  214.23, 196.09 e 168.10, na forma  $[M+H]^+$ ; C e D – imagens do 1,3-diaminopropano, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  75.09 e 58.06, na forma  $[M+H]^+$ ; E e F – imagens da epinefrina, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  184.11 e 166.09, na forma  $[M+H]^+$ ; G e H – imagens da serotonina, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  177.1, 160.07 e 146.06, na forma  $[M+H]^+$ ; I e J – imagens da tiramina, criada a partir da sobreposição dos  $m/z$  138.09, 121.06 e 107.05, na forma  $[M+H]^+$ . Essas imagens foram geradas no algoritmo MSiReader v0.05.

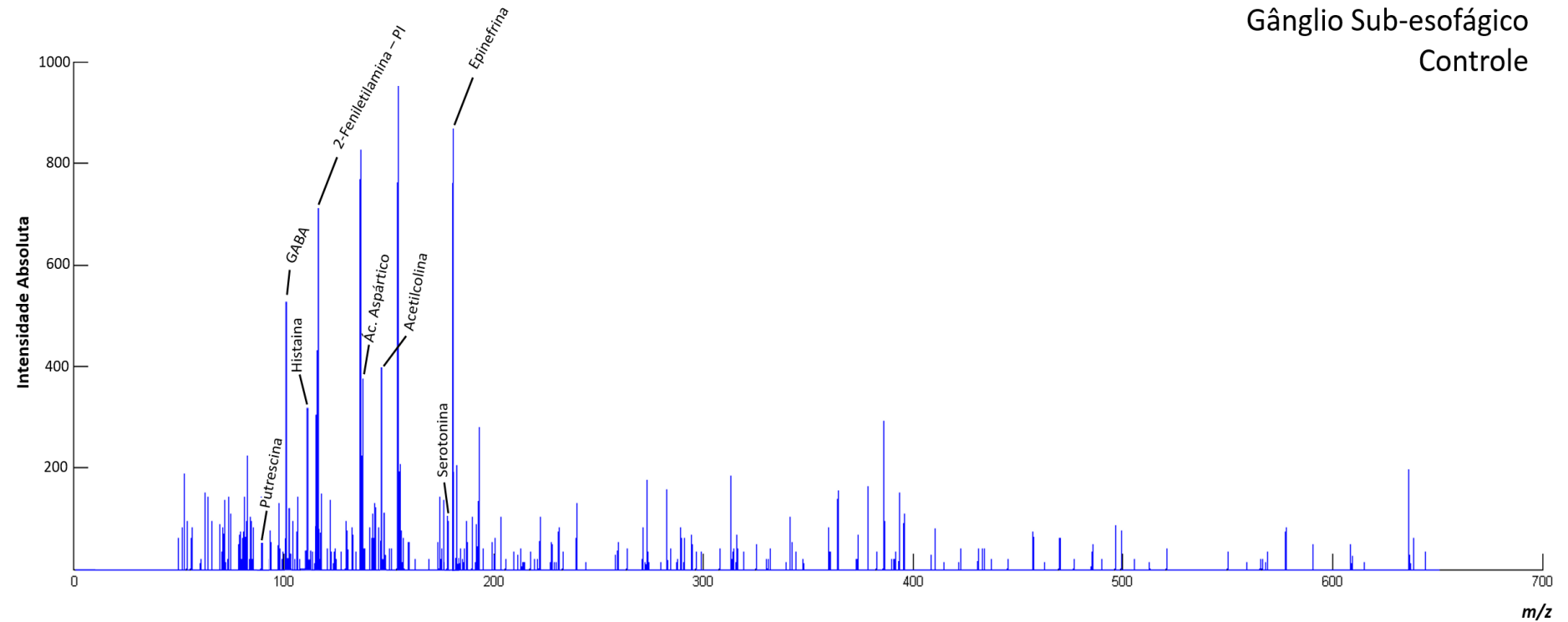
#### **4.10 Semi-quantificação de neurotransmissores e neuromoduladores por MALDI-MSI**

Após a aquisição e o processamento dos dados de MALDI MSI, foi criado um mapa de calor para representar a variação de intensidade relativa de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores por região do cérebro entre os grupos REP e controle. A estratégia desenvolvida permite comparar determinadas regiões do cérebro (também chamadas de regiões de interesse – ROI) através de um preparo de amostra *in situ*, que nos fornece não só a identificação dos compostos de interesse como sua localização no cérebro e sua quantidade relativa.

Através da utilização do algoritmo MSiReader v0.05 foram definidas diferentes regiões de interesse (ROI) que correspondem aos principais centros nervosos no cérebro das abelhas; os dados de cada uma das 18 regiões do cérebro foram processados e analisados separadamente para a criação do mapa de calor. O algoritmo determina o número de pixels dentro de cada ROI e posteriormente calcula o espectro médio dessa região. A título de exemplo, as figuras 19 e 20 mostram o espectro médio de duas regiões do cérebro dos indivíduos do grupo controle. É gerada, também, uma lista de picos e informações sobre cada pico desta lista, tais como os valores centroides de  $m/z$ , a intensidade e as coordenadas  $x$  e  $y$  dos diferentes picos, dentre outras informações.

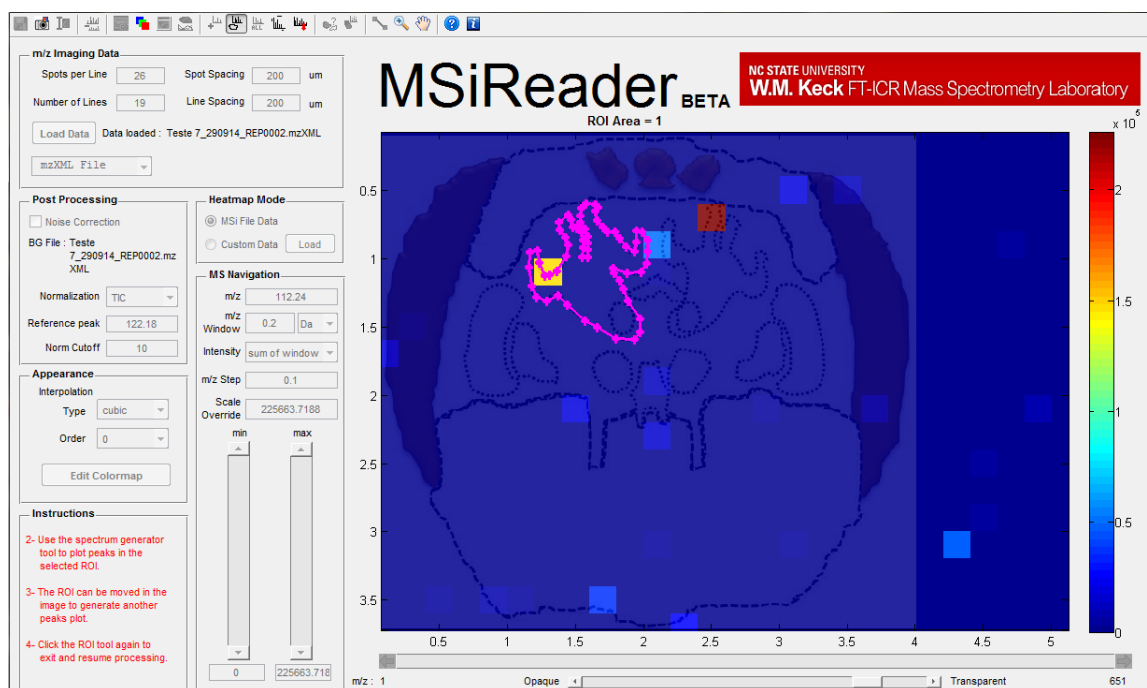


**Figura 19.** Espectro médio da região do lobo antenal esquerdo (grupo controle), gerados a partir do EIC, através do software MSiReader v0.05. Nesse espectro estão representados os principais neurotransmissores e neuromoduladores identificados nessa região. Os valores de intensidade do eixo y está expresso em unidades arbitrárias definidas pelo próprio algoritmo.



**Figura 20.** Espectro médio da região do gânglio sub-esofágico (grupo controle) gerados a partir do EIC, através do software MSiReader v0.05. Nesse espectro estão representados os principais neurotransmissores e neuromoduladores identificados nessa região. Os valores de intensidade do eixo y está expresso em unidades arbitrárias definidas pelo próprio algoritmo.

Na figura 21 podemos observar a criação de um ROI, correspondente a região dos corpos pedunculados, no software MSiReader v0.05. Para a delimitação exata das diferentes regiões do cérebro com a imagem gerada por espectrometria de massas, foi utilizado a sobreposição do mapa de contorno, criado a partir das imagens de H&E, com a imagem gerada por MALDI MSI, através da utilização da ferramenta de sobreposição do software MSiReader.



**Figura 21.** Delimitação de uma região de interesse (ROI) no software MSiReader v0.05.

Para a construção do mapa de calor a intensidade dos diferentes compostos foi extraída de cada pixel dentro de uma mesma região; após esse processo foi realizado o cálculo da média das intensidades dos metabólitos (incluindo o IS) entre os diferentes pixels de um mesmo ROI, a partir dos EICs de cada região do cérebro (tabela 15 e 16). Posteriormente o valor de intensidade média para cada um dos compostos estudados foi dividido pelo valor da intensidade média do IS dentro do mesmo ROI, e esse procedimento foi repetido para todas as regiões do cérebro estudadas (tabela 17 e 18). O valor numérico desse resultado obtido a partir grupo REP foi dividido pelo valor análogo obtido para o grupo controle em uma mesma região (tabela 19). O logaritmo na base 10 desses resultados pode ser observado na tabela 20.

**Tabela 15.** Média das intensidades\* dos metabólitos (incluindo a média da intensidade do IS) nas 18 diferentes regiões do cérebro de *A. mellifera* para o grupo controle.

	ME-D	LO-D	LC-D	MC-D	Pe-D	$\alpha$ L-D	$\beta$ L-D	AL-D	CB	SOG	AL-E	$\beta$ L-E	$\alpha$ L-E	Pe-E	MC-E	LC-E	LO-E	ME-E
2-Feniletilamina	1150	800	391	418	561	300	612	800	306	690	1201	331	484	439	544	442	766	1093
1,3-Diaminopropano			153					869						460		460		
Ácido Aspártico	255	255	511	358	409	255				357		613	613	357	76	153		510
Ácido Caínico			102		102			306						357	357			51
Ácido Glutâmico	434		447		178	51		51			153					255		255
Cadaverina	357		357														153	102
Epinefrina	937	255	587	357	562	971	153	639		869	204		153	307	281	664	843	729
Espermidina	280	408	255		153	51		869			971			459	459			357
Espermina		51	715		715			204								204		512
GABA	958	983	345	358	244	255	790	613	391	536	153	178	306	587	664	844	638	216
Histamina	357	280	153	102	178	153		204	153	306	1022	614	614	383		280	229	153
Putrescina	1090	1328	2019					510		51	460			767	614	614	255	587
Serotonina	562	460	340	816	51	51			153	102	306			255	76	153	306	163
Tiramina	765	459	792	178	408	127	204	357	561		102	459	459	433	408	459	485	326
Acetilcolina	425	357	204	306	306	306		537	153	229	460			102	1941	332	375	306
Noraepinefrina	204					204	204		1022					1022		153		153

(\*)Os valores de intensidade obtidos com o auxílio do MSiReader v0.05 estão expressos em unidades arbitrárias definidas pelo próprio algoritmo.

**Tabela 16.** Média das intensidades dos metabólitos (incluindo a média da intensidade do IS) nas 18 diferentes regiões do cérebro de *A. mellifera* para o grupo REP.

	ME-D	LO-D	LC-D	MC-D	Pe-D	$\alpha$ L-D	$\beta$ L-D	AL-D	CB	SOG	AL-E	$\beta$ L-E	$\alpha$ L-E	Pe-E	MC-E	LC-E	LO-E	ME-E
2-Feniletilamina	1090	868	549	1021	579	869	869	1022	323	561	957	1046	1072	476	885	459	740	1022
1,3-Diaminopropano	229	255													536			
Ácido Aspártico			665	204	221	357								664	409	459	357	408
Ácido Caínico	306	153	153	153	230					51	229				561	51		51
Ácido Glutâmico	332			374	357			127	357	51	612		357	357				
Cadaverina																		
Epinefrina	997	664	358	793	358	255	255	340	51	280	459	255	255	289	647	255	102	51
Espermidina	562		340	178	306				127				204	204	102			
Espermina	408							102		512	307			578				
GABA	1049	1687	612	485	331	51	51	800	535	433	842	714	714		868	221	1482	562
Histamina			102	127	102				51	51	76				51	204	204	102
Putrescina	1149	357	178	357	153			459	1175	716	852		1175	1175	535	536		
Serotonina	229	357	280	970	306	357		51	1022	51	187	255	638	638	153	255	357	562
Tiramina	868	102	153	600	153			391	306	280	459	306	484	549	681	289	408	102
Acetilcolina	596		255	459	153			613	714	306	255		714	612	894	204	153	127
Noraepinefrina			255	51					153		204		153	153	51	102		102

(\*)Os valores de intensidade obtidos com o auxílio do MSiReader v0.05 estão expressos em unidades arbitrárias definidas pelo próprio algoritmo.

**Tabela 17.** Normalização dos valores de intensidade média dos metabólitos nas 18 regiões do cérebro com base no valor de intensidade do IS, para os indivíduos do grupo controle. Para cada ROI, o valor da intensidade média dos metabólitos foi dividido pelo valor de intensidade média do IS dentro do mesmo ROI. Os valores de intensidade normalizado para os compostos não detectados por MALDI MSI receberam o valor 0,0.

	ME-D	LO-D	LC-D	MC-D	Pe-D	$\alpha$ -D	$\beta$ -D	AL-D	CB	SOG	AL-E	$\beta$ -E	$\alpha$ -E	Pe-E	MC-E	LC-E	LO-E	ME-E
1,3-Diaminopropano	0,0000	0,0000	0,3913	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0863	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0478	0,0000	1,0407	0,0000	0,0000
Ácido Aspártico	0,2217	0,3188	1,3069	0,8565	0,7291	0,8500	0,0000	0,0000	0,0000	0,5174	0,0000	1,8520	1,2665	0,8132	0,1397	0,3462	0,0000	0,4666
Ácido Caínico	0,0000	0,0000	0,2609	0,0000	0,1818	0,0000	0,0000	0,3825	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,8132	0,6563	0,0000	0,0000	0,0467
Ácido Glutâmico	0,3774	0,0000	1,1432	0,0000	0,3173	0,1700	0,0000	0,0638	0,0000	0,0000	0,1274	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5769	0,0000	0,2333
Cadaverina	0,3104	0,0000	0,9130	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1997	0,0933
Epinefrina	0,8148	0,3188	1,5013	0,8541	1,0018	3,2367	0,2500	0,7988	0,0000	1,2594	0,1699	0,0000	0,3161	0,6993	0,5165	1,5023	1,1005	0,6670
Espermidina	0,2435	0,5100	0,6522	0,0000	0,2727	0,1700	0,0000	1,0863	0,0000	0,0000	0,8085	0,0000	0,0000	1,0456	0,8438	0,0000	0,0000	0,3266
Espermina	0,0000	0,0638	1,8286	0,0000	1,2745	0,0000	0,0000	0,2550	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4615	0,0000	0,4684
GABA	0,8330	1,2288	0,8824	0,8565	0,4349	0,8500	1,2908	0,7663	1,2778	0,7768	0,1274	0,5378	0,6322	1,3371	1,2206	1,9095	0,8329	0,1976
Histamina	0,3104	0,3500	0,3913	0,2440	0,3173	0,5100	0,0000	0,2550	0,5000	0,4435	0,8510	1,8550	1,2686	0,8724	0,0000	0,6335	0,2990	0,1400
Putrescina	0,9478	1,6600	5,1637	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6375	0,0000	0,0739	0,3830	0,0000	0,0000	1,7472	1,1287	1,3891	0,3329	0,5371
Serotonina	0,4887	0,5750	0,8696	1,9522	0,0909	0,1700	0,0000	0,0000	0,5000	0,1478	0,2548	0,0000	0,0000	0,5809	0,1397	0,3462	0,3995	0,1491
Tiramina	0,6652	0,5738	2,0256	0,4258	0,7273	0,4233	0,3333	0,4463	1,8333	0,0000	0,0849	1,3867	0,9483	0,9863	0,7500	1,0385	0,6332	0,2983
Acetilcolina	0,3696	0,4463	0,5217	0,7321	0,5455	1,0200	0,0000	0,6713	0,5000	0,3319	0,3830	0,0000	0,0000	0,2323	3,5680	0,7511	0,4896	0,2800
Noraepinefrina	0,1774	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6800	0,3333	0,0000	3,3399	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,3280	0,0000	0,3462	0,0000	0,1400

**Tabela 18.** Normalização dos valores de intensidade média dos metabólitos nas 18 regiões do cérebro com base no valor de intensidade do IS, para os indivíduos do grupo REP. Para cada ROI, o valor da intensidade média dos metabólitos foi dividido pelo valor de intensidade média do IS dentro do mesmo ROI. Os valores de intensidade normalizado para os compostos não detectados por MALDI MSI receberam o valor 0,0.

	ME-D	LO-D	LC-D	MC-D	Pe-D	$\alpha$ -D	$\beta$ -D	AL-D	CB	SOG	AL-E	$\beta$ -E	$\alpha$ -E	Pe-E	MC-E	LC-E	LO-E	ME-E
1,3-Diaminopropano	0,2101	0,2938	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6056	0,0000	0,0000	0,0000
Ácido Aspártico	0,0000	0,0000	1,2113	0,1998	0,3817	0,4108	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,3950	0,4621	1,0000	0,4824	0,3992
Ácido Caínico	0,2807	0,1763	0,2787	0,1499	0,3972	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0909	0,2393	0,0000	0,0000	0,0000	0,6339	0,1111	0,0000	0,0499
Ácido Glutâmico	0,3046	0,0000	0,0000	0,3663	0,6166	0,0000	0,0000	0,1243	1,1053	0,0909	0,6395	0,0000	0,3330	0,7500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Cadaverina	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Epinefrina	0,9147	0,7650	0,6521	0,7767	0,6183	0,2934	0,2934	0,3327	0,1579	0,4991	0,4796	0,2438	0,2379	0,6071	0,7311	0,5556	0,1378	0,0499
Espermidina	0,5156	0,0000	0,6193	0,1743	0,5285	0,0000	0,0000	0,0000	0,3932	0,0000	0,0000	0,0000	0,1903	0,4286	0,1153	0,0000	0,0000	0,0000
Espermina	0,3743	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0998	0,0000	0,9127	0,3208	0,0000	0,0000	1,2143	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
GABA	0,9624	1,9435	1,1148	0,4750	0,5717	0,0587	0,0587	0,7828	1,6563	0,7718	0,8798	0,6826	0,6660	0,0000	0,9808	0,4815	2,0027	0,5499
Histamina	0,0000	0,0000	0,1858	0,1244	0,1762	0,0000	0,0000	0,0000	0,1579	0,0909	0,0794	0,0000	0,0000	0,0000	0,0576	0,4444	0,2757	0,0998
Putrescina	1,0541	0,4113	0,3242	0,3497	0,2642	0,0000	0,0000	0,4491	3,6378	1,2763	0,8903	0,0000	1,0961	2,4685	0,6045	1,1678	0,0000	0,0000
Serotonina	0,2101	0,4113	0,5100	0,9500	0,5285	0,4108	0,0000	0,0499	3,1641	0,0909	0,1954	0,2438	0,5951	1,3403	0,1729	0,5556	0,4824	0,5499
Tiramina	0,7963	0,1175	0,2787	0,5877	0,2642	0,0000	0,0000	0,3826	0,9474	0,4991	0,4796	0,2925	0,4515	1,1534	0,7695	0,6296	0,5514	0,0998
Acetilcolina	0,5468	0,0000	0,4645	0,4496	0,2642	0,0000	0,0000	0,5998	2,2105	0,5455	0,2665	0,0000	0,6660	1,2857	1,0102	0,4444	0,2068	0,1243
Noraepinefrina	0,0000	0,0000	0,4645	0,0500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4737	0,0000	0,2132	0,0000	0,1427	0,3214	0,0576	0,2222	0,0000	0,0998

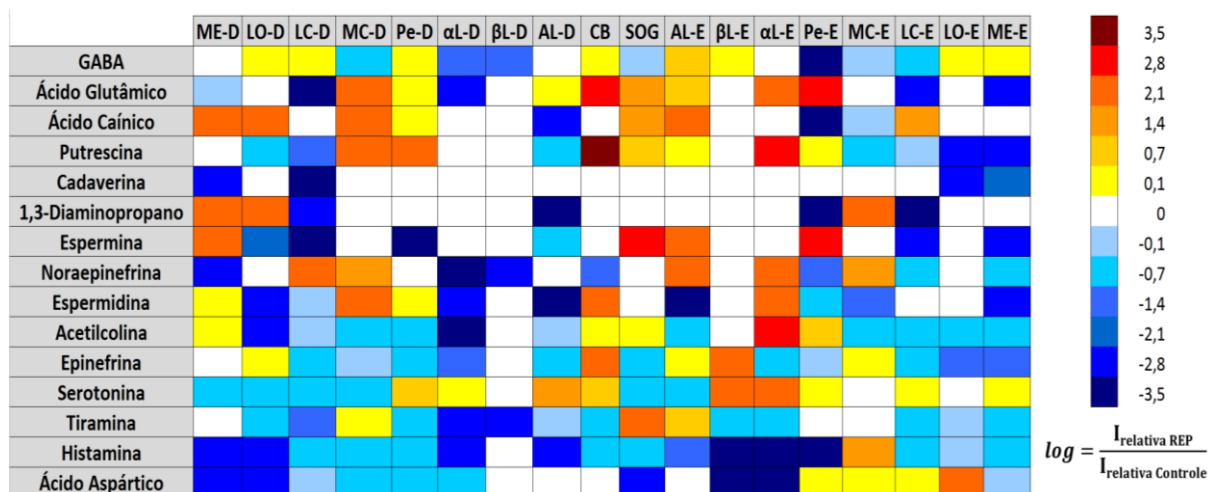
**Tabela 19.** Divisão entre os valores normalizados de intensidade obtidas para o grupo REP pelos valores normalizados de intensidade obtidos para o grupo controle.

	ME-D	LO-D	LC-D	MC-D	Pe-D	$\alpha$ L-D	$\beta$ L-D	AL-D	CB	SOG	AL-E	$\beta$ L-E	$\alpha$ L-E	Pe-E	MC-E	LC-E	LO-E	ME-E
1,3-Diaminopropano	210,092	293,779	0,003	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	0,001	605,650	0,001	-	-
Ácido Aspártico	0,005	0,003	0,927	0,233	0,524	0,483	-	-	-	0,002	-	0,001	0,001	1,715	3,308	2,889	482,432	0,856
Ácido Cainico	280,734	176,267	1,068	149,853	2,185	-	-	0,003	-	90,909	239,289	-	-	0,001	0,966	111,111	-	1,069
Ácido Glutâmico	0,807	-	0,001	366,308	1,943	0,006	-	1,949	1105,263	90,909	5,020	-	333,022	750,000	-	0,002	-	0,004
Cadaverina	0,003	-	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005	0,011
Epinefrina	1,123	2,400	0,434	0,909	0,617	0,091	1,174	0,417	157,895	0,396	-	243,786	0,752	0,868	1,415	0,370	0,125	0,075
Espermidina	2,118	0,002	0,950	174,339	1,938	0,006	-	0,001	393,189	-	0,001	-	190,299	0,410	0,137	-	-	0,003
Espermina	374,312	0,016	0,001	-	0,001	-	-	0,391	-	912,656	320,794	-	-	1214,286	-	0,002	-	0,002
GABA	1,155	1,582	1,263	0,555	1,314	0,069	0,045	1,022	1,296	0,994	6,906	1,269	1,053	0,001	0,804	0,252	2,404	2,783
Histamina	0,003	0,003	0,475	0,510	0,555	0,002	-	0,004	0,316	0,205	0,093	0,001	0,001	0,001	57,627	0,702	0,922	0,713
Putrescina	1,112	0,248	0,063	349,657	264,249	-	-	0,705	3637,771	17,267	2,324	-	1096,082	1,413	0,536	0,841	0,003	0,002
Serotonina	0,430	0,715	0,587	0,487	5,813	2,417	-	49,902	6,328	0,615	0,767	243,786	595,149	2,307	1,237	1,605	1,208	3,687
Tiramina	1,197	0,205	0,138	1,380	0,363	0,002	0,003	0,857	0,517	499,109	5,647	0,211	0,476	1,169	1,026	0,606	0,871	0,335
Acetilcolina	1,480	0,002	0,890	0,614	0,484	0,001	-	0,894	4,421	1,644	0,696	-	666,045	5,534	0,283	0,592	0,422	0,444
Noraepinefrina	0,006	-	464,481	49,951	-	0,001	0,003	-	0,142	-	213,166	-	142,724	0,138	57,627	0,642	-	0,713

**Tabela 20.** Logarítmo na base 10 do resultado da divisão entre os valores normalizados de intensidade obtidas para o grupo REP pelos valores normalizados de intensidade obtidos para o grupo controle.

	ME-D	LO-D	LC-D	MC-D	Pe-D	$\alpha$ L-D	$\beta$ L-D	AL-D	CB	SOG	AL-E	$\beta$ L-E	$\alpha$ L-E	Pe-E	MC-E	LC-E	LO-E	ME-E
1,3-Diaminopropano	2,322	2,468	-2,593	-	-	-	-	-3,036	-	-	-	-	-	-3,020	2,782	-3,017	-	-
Ácido Aspártico	-2,346	-2,503	-0,033	-0,632	-0,281	-0,316	-	-	-	-2,714	-	-3,268	-3,103	0,234	0,520	0,461	2,683	-0,068
Ácido Cainico	2,448	2,246	0,029	2,176	0,339	-	-	-2,583	-	1,959	2,379	-	-	-2,910	-0,015	2,046	-	0,029
Ácido Glutâmico	-0,093	-	-3,058	2,564	0,289	-2,230	-	0,290	3,043	1,959	0,701	-	2,522	2,875	-	-2,761	-	-2,368
Cadaverina	-2,492	-	-2,960	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,300	-1,970
Epinefrina	0,050	0,380	-0,362	-0,041	-0,210	-1,043	0,070	-0,380	2,198	-0,402	0,451	2,387	-0,124	-0,061	0,151	-0,432	-0,902	-1,126
Espermidina	0,326	-2,708	-0,022	2,241	0,287	-2,230	-	-3,036	2,595	-	-2,908	-	2,279	-0,387	-0,865	-	-	-2,514
Espermina	2,573	-1,804	-3,262	-	-3,105	-	-	-0,407	-	2,960	2,506	-	-	3,084	-	-2,664	-	-2,671
GABA	0,063	0,199	0,102	-0,256	0,119	-1,161	-1,342	0,009	0,113	-0,003	0,839	0,104	0,023	-3,126	-0,095	-0,598	0,381	0,444
Histamina	-2,492	-2,544	-0,323	-0,293	-0,256	-2,708	-	-2,407	-0,501	-0,688	-1,030	-3,268	-3,103	-2,941	1,761	-0,154	-0,035	-0,147
Putrescina	0,046	-0,606	-1,202	2,544	2,422	-	-	-0,152	3,561	1,237	0,366	-	3,040	0,150	-0,271	-0,075	-2,522	-2,730
Serotonina	-0,367	-0,146	-0,232	-0,313	0,764	0,383	-	1,698	0,801	-0,211	-0,115	2,387	2,775	0,363	0,093	0,205	0,082	0,567
Tiramina	0,078	-0,689	-0,861	0,140	-0,440	-2,627	-2,523	-0,067	-0,287	2,698	0,752	-0,676	-0,322	0,068	0,011	-0,217	-0,060	-0,475
Acetilcolina	0,170	-2,650	-0,050	-0,212	-0,315	-3,009	-	-0,049	0,646	0,216	-0,158	-	2,824	0,743	-0,548	-0,228	-0,374	-0,353
Noraepinefrina	-2,249	-	2,667	1,699	-	-2,833	-2,523	-	-0,848	-	2,329	-	2,154	-0,860	1,761	-0,192	-	-0,147

Posteriormente esses dados foram representados na forma de um mapa de calor, conforme mostrado na figura 22. No mapa de calor a escala de cor varia do vermelho ao azul, indicando se a concentração relativa de um determinado composto aumentou ou diminuiu em relação ao grupo REP. Desse modo, a coloração azul indica que um composto estava mais presente no grupo controle do que no grupo REP em uma determinada região do cérebro, e a coloração vermelha indica que a concentração desse composto é maior no grupo REP do que no grupo controle.



**Figura 22.** Mapa de calor representando a distribuição dos metabólitos nas 18 diferentes regiões do cérebro de *A. mellifera* comparando os grupos controle e REP. A coloração azul indica que um composto estava mais presente no grupo controle do que no grupo REP em uma determinada região do cérebro, e a coloração vermelha indica que a concentração desse composto é maior no grupo REP do que no grupo controle.

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 Perfil metabólico do cérebro de abelhas

Através da utilização da abordagem LC-ESI foram investigados um total de 65 compostos presentes na biblioteca metabolômica, criada através da utilização de padrões sintéticos, dos quais 31 foram identificados e quantificados nas análises dos extratos de cérebro de abelha. Dos 31 compostos identificados, 27 foram encontrados no grupo controle, sendo que quatro desses compostos são únicos para esse grupo (cadaverina, espermina, glicose e uracila). Isso sugere que esses compostos foram consumidos/degradados durante o ensaio comportamental de REP, o que explicaria a ausência (ou diminuição a níveis não mensuráveis pela técnica aplicada) destes compostos no grupo REP. No grupo REP também foram identificados 27 compostos, dos quais quatro são únicos desse grupo (fenilalanina, betaína, espermidina e serina); isso sugere que esses compostos únicos foram produzidos durante o ensaio comportamental. Um total de 23 compostos são comuns para ambos os grupos, sendo que apenas para quatro compostos foram observadas diferenças quantitativas estatisticamente significantes entre os grupos comparados (arginina, asparagina, guanosina monofosfato e putrescina).

Os 31 compostos identificados foram, então, contrastados com a coleção de banco de dados de rotas metabólicas para *A. mellifera* do KEGG. Com isso, verificou-se que esses compostos se concentravam em algumas rotas metabólicas específicas. Nesse processo observou-se a necessidade da criação de uma segunda biblioteca de metabólitos (criada sem a utilização de padrões sintéticos), para que fosse possível a identificação de metabólitos intermediários presentes nessas rotas. Essa segunda biblioteca foi montada com um total de 47 compostos, dos quais 17 foram identificados e quantificados (quantificação relativa) nas análises dos extratos de cérebro de abelha. Dos 17 compostos identificados, 16 foram encontrados no grupo controle, sendo que apenas um composto é único desse grupo (N-acetil-L-glutamato 5-semialdeído). No grupo REP foram encontrados 16 compostos, sendo que apenas a creatina foi encontrada exclusivamente nesse grupo. Do total de 15 compostos comuns a ambos os grupos analisados, apenas o 4-guanidinobutanoato foi encontrado com diferenças quantitativas estatisticamente significantes entre os grupos comparados.

Nas duas abordagens citadas anteriormente foram investigados os perfis globais de metabólitos presentes no cérebro de abelhas *A. mellifera*. Visando o estudo dos perfis metabólicos regionais (em cada região do cérebro), foi também padronizado o protocolo experimental utilizando-se a estratégia MALDI MSI. Esta estratégia permitiu o mapeamento e o estudo da distribuição espacial dos metabólitos identificados em cortes de cérebro de abelhas, bem como uma melhor compreensão da distribuição dessas moléculas nas diferentes estruturas do cérebro e sua correlação com o comportamento ensaiado.

### **5.1.1 Papel da glicose no metaboloma do cérebro de abelhas**

A glicose é uma aldexose (carboidrato que apresenta um grupo aldeído no carbono 1, e os demais carbonos estão ligados a uma hidroxila) de fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ , considerado de extrema importância para o metabolismo celular. Ao longo das últimas décadas diversos estudos têm sido realizados na tentativa de entender qual o mecanismo de ação da glicose no sistema nervoso de diversos organismos, em especial em humanos e roedores (HALL e GOLD, 1986; GOLD, 1995; KOROL e GOLD, 1998; McNAY, FRIES e GOLD, 2000; MESSIER, 2004).

Diversos estudos com humanos e roedores têm comprovado que a glicose regula diversas funções cerebrais e comportamentais, incluindo a memória e aprendizagem (GOLD, 1995; KOROL e GOLD, 1998). Diversas evidências apontam que a administração de glicose melhora o desempenho cognitivo e pode até reverter parte dos déficits causados por drogas ou por envelhecimento (GOLD, 1995; KOROL e GOLD, 1998). Hoyer e colaboradores (2003) apontam que qualquer dano no metabolismo neuronal da glicose ou em seus mecanismos de controle podem, por conseguinte, gerar interferência na função da memória. Em ratos a glicose atua na regulação da formação da memória e melhora a aprendizagem em várias condições experimentais (GOLD, 1995; KOROL e GOLD, 1998). Ainda que diversos estudos sobre as funções da glicose na modulação do sistema nervoso e na cognição tenham sido realizados, o mecanismo bioquímico pelo qual a glicose atua em processos cognitivos ainda estão sendo investigados (MESSIER, 2004). Dentre as diversas hipóteses, acredita-se que os mecanismos mais prováveis de atuação da glicose sob a cognição seja através (i) do fornecimento de energia adicional, (ii) do fornecimento adicional de substrato para síntese de neurotransmissores e/ou (iii) da modulação da liberação de neurotransmissores.

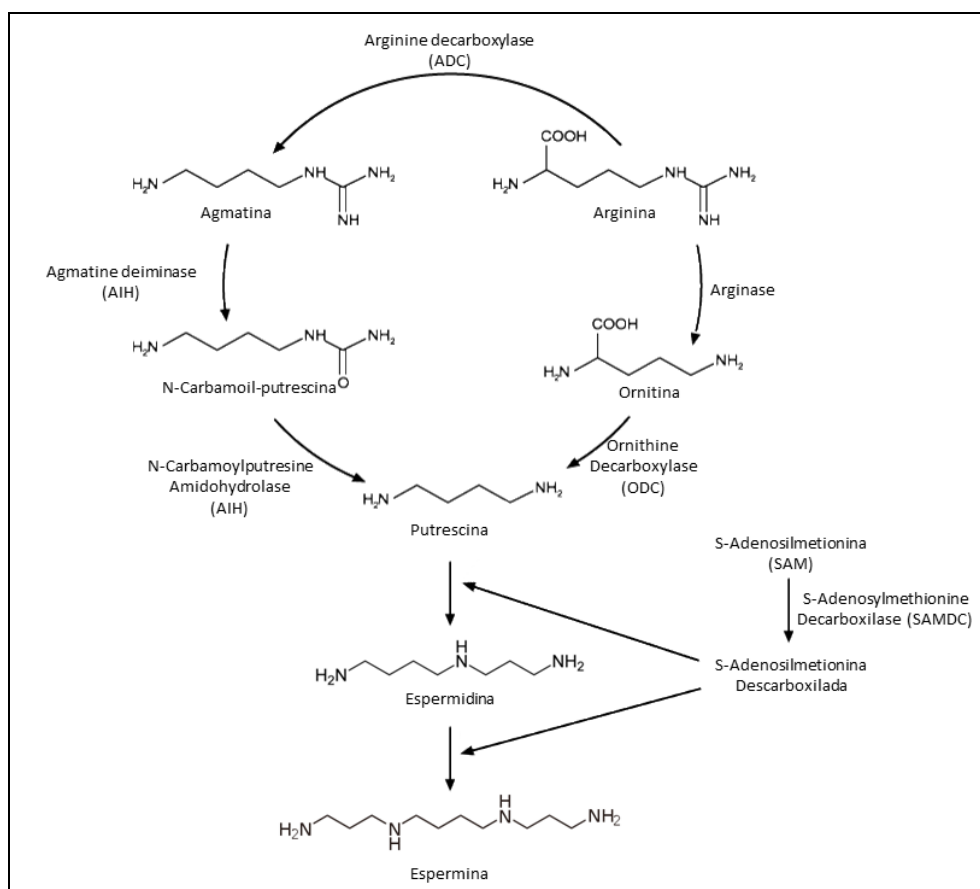
A partir da discussão dos vários aspectos da utilização da glicose na cognição, verifica-se que a maior parte do aumento do consumo de glicose durante a ativação neuronal está relacionada com o aumento na função sináptica (MESSIER, 2004). Essa relação é facilmente entendida ao pensarmos que a glicose é a principal fonte de energia para a atividade neural, através do metabolismo energético celular, e que uma grande quantidade de ATP é necessária para a atividade e a plasticidade sináptica (HOYER, 2003; MESSIER, 2004). A sinapse tem alta necessidade de energia por conta das bombas iônicas envolvidas na neurotransmissão. Além disso, diversos neurotransmissores no cérebro são dependentes de glicose para a sua síntese (MESSIER, 2004). Isso inclui diversas substâncias que desempenham funções importantes na formação da memória e aprendizagem, tais como o glutamato, o GABA e a acetilcolina (KOROL e GOLD, 1998; MESSIER, 2004). Assim, a síntese de neurotransmissores também pode ser responsável por parte do consumo da glicose durante a ativação neuronal.

Ao correlacionarmos essas informações com os dados obtidos para *A. mellifera* no presente trabalho, pode-se explicar o grande consumo de glicose encontrado, no qual a concentração desse carboidrato para os indivíduos do grupo controle corresponde a 481,8 ng/cérebro e diminuiu a níveis indetectáveis no grupo REP. Isso indica que a glicose tenha sido consumida provavelmente no fornecimento de energia adicional ao cérebro e que parte desse consumo esteja relacionado com a síntese de novos neurotransmissores, que utilizam a glicose como substrato; de modo geral essas observações demonstram intensa atividade cerebral dos indivíduos do grupo REP. As imagens geradas por espectrometria de massas da glicose (figura 13) também corroboram para essa observação, uma vez que no grupo controle a glicose concentrava-se especialmente nos lobos ópticos, gânglio sub-esofágico, corpo central e lobos  $\alpha$  e  $\beta$ , e nos indivíduos do grupo REP a glicose foi consumida a níveis indetectáveis.

### **5.1.2 Arginina e algumas poliaminas no metaboloma do cérebro de abelhas**

As poliaminas naturais espermina, espermidina, putrescina e a cadaverina também foram encontradas nas análises do grupo REP e controle. Essas moléculas são caracterizadas por terem natureza policatiônica e apresentar dois ou mais grupo de aminas em suas estruturas moleculares. A cadaverina é sintetizada a partir da lisina em uma reação catalisada pela enzima *Lysina decarboxilase* – LDC (SODA e MORIGUCHI, 1969). A putrescina é sintetizada biologicamente através de duas vias

diferentes, ambas iniciando a partir da arginina; em uma das vias a arginina é convertida em agmatina (arginina descarboxilada) em uma reação catalisada pela *Arginina descarboxilase* (ADC), posteriormente a agmatina é convertida em N-carbamoil-putrescina pela enzima *Agmatina deiminase* (AIH), e finalmente, o N-carbamoil-putrescina é convertido em putrescina pela ação da enzima *N-Carbamoilputrescina amidohidrolase* (CPA); na segunda via a arginina é convertida em ornitina pela ação da *Arginase*, que posteriormente é convertida em putrescina pela ação da enzima *ornitina descarboxilase* – ODC (SRIVENUGOPAL e ADIGA, 1981; PEGG e McCANN, 1982). A espermidina é sintetizada a partir da putrescina utilizando a doação do grupo aminopropil, oriundo do substrato S-adenosilmetionina (SAM), através de uma reação catalisada *espermidina sintase* (SPDS). A espermina é sintetizada a partir da reação da espermidina com a SAM, na presença da enzima *Espermine sintase* – SPMS (ROJE, 2006). Uma representação da rota biossintética das poliaminas pode ser visualizado na figura 23.



**Figura 23.** Representação da rota biossintética das poliaminas, adaptado de ROJE (2006); SHANTZ e PEGG (1999).

Diversos estudos têm apontado que as poliaminas de maneira geral estão presentes em quase todas as células e são extremamente importantes na síntese proteica, na divisão celular e no crescimento celular (WILLIAMS, 1997). Muito se sabe a respeito da biossíntese e degradação das poliaminas, e sobre as propriedades moleculares das enzimas envolvidas nesse processo (WILLIAMS, 1997). Esses metabólitos também têm sido caracterizados por desempenharem funções fundamentais no desenvolvimento do sistema nervoso de invertebrados e vertebrados (STRAMBI et al., 1993; MALATERRE et al., 2004). Dentre outros órgãos, o cérebro é particularmente sensível à depleção de poliaminas durante o desenvolvimento: a inibição da biossíntese de poliaminas resulta em defeitos na morfogênese neural (SCHWEITZER, ROBBINS e SLOTKIN, 1989), enquanto que poliaminas exógenas estimulam a regeneração axonal (CHU, SAITO e ABE, 1995). As poliaminas também foram descritas por influenciarem na excitabilidade celular e na neurotransmissão por interagir com canais iônicos de potássio, em receptores AMPA e NMDA (WILLIAMS, 1997; OLIVER, BAUKROWITZ e FAKLER, 2000; GIAMPIETRO, 2003).

Em insetos a importância das poliaminas nos tecidos neurais tem sido enfatizada por inúmeros autores. Cayre e colaboradores (1997 e 2001) demonstraram que em cérebros de insetos adultos a putrescina potencializa a neurogênese nos corpos pedunculados. Essa é uma das principais estruturas do cérebro de insetos e está envolvida com o processamento de informações de alta ordem no sistema nervoso desses animais, tais como a integração sensorial, na aprendizagem, na memória e na orientação espacial. A espermidina e espermina agem na diferenciação neuronal em grilo – *Acheta domesticus* (CAYRE et al., 2001).

As poliaminas também têm sido descritas por exercerem efeito na fosforilação de proteínas em uma ampla gama de tipos celulares, e atuar na modulação da fosforilação em diversas proteínas do tecido nervoso de insetos (BIRNBAUM et al., 1987; COMBEST, BLOOM e GILBERT, 1988; BLOOM, COMBEST e GILBERT, 1990). Birnbaum e colaboradores (1987) demonstraram, por exemplo, que baixas concentrações de espermina aumentam consideravelmente a fosforilação de proteínas citosólicas localizadas no sistema nervoso de insetos. A fosforilação de proteínas é um mecanismo bem conhecido e bem caracterizado por estar envolvido em processos de formação de memória e aprendizagem (LI et al., 2014).

No presente trabalho a arginina foi encontrado no grupo controle (1433,2 ng/cérebro) e REP (1172,1 ng/cérebro). O teste estatístico aplicado demonstrou que

houve uma diminuição significativa na concentração desse composto no grupo REP em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). As imagens geradas por espectrometria de massas da arginina (Figura 14 A e B) corroboram com essa informação, e demonstram a diminuição desse composto nos indivíduos do grupo REP. A putrescina também foi encontrada no grupo controle (15,6 ng/cérebro) e REP (41,4 ng/cérebro), e o teste estatístico indicou que houve um aumento significativo desse composto no grupo REP em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). As imagens geradas por espectrometria de massas da putrescina (Figura 14 E e F) indicam o aumento da concentração relativa desse composto nos indivíduos do grupo REP, que se deu em especial nos lobos antenais, sugerindo que esse composto possa estar envolvido no processamento de informações do odor de sacarose captados pelas antenas. A espermidina foi encontrada apenas no grupo REP (1,7 ng/cérebro). A cadaverina (15,4 ng/cérebro) e a espermina (6,0 ng/cérebro) foram encontradas exclusivamente no grupo controle. As imagens geradas por espectrometria de massas da cadaverina (Figura 14 C e D) também indicam a presença desse composto apenas nos indivíduos do grupo controle. De modo geral esses resultados sugerem que nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental REP parte da arginina foi consumida, possivelmente nos processos de síntese de putrescina e espermidina. Isso indica que tanto a putrescina quanto a espermidina provavelmente sejam importantes na modulação do comportamento de extensão da probóscide em *A. mellifera*.

Os resultados mostrados acima corroboram com informações previamente descritas para outros insetos (CAYRE et al., 1997; CAYRE et al., 2001). Nesses estudos provou-se que essas moléculas atuam na neurogênese e na diferenciação neuronal, o que confere maior plasticidade celular/cerebral a esses organismos. A plasticidade cerebral é a capacidade que o cérebro tem de se remodelar em função das experiências do indivíduo, reformulando as suas conexões em função das necessidades e dos fatores do meio ambiente. Esta característica faz com que os circuitos neuronais sejam maleáveis, e este é o princípio básico da formação de memórias e da aprendizagem. A plasticidade é responsável por processos que incluem neurogênese em indivíduos adultos, modulação da excitabilidade intrínseca, sinaptogênese e consolidação duradoura das sinapses existentes (GIESE e MIZUNO, 2013).

Além de a arginina fazer parte das vias metabólicas para a formação das poliaminas, como visto anteriormente, atualmente já é bem descrito e amplamente aceito que essa molécula está envolvida com processo de formação de memória através

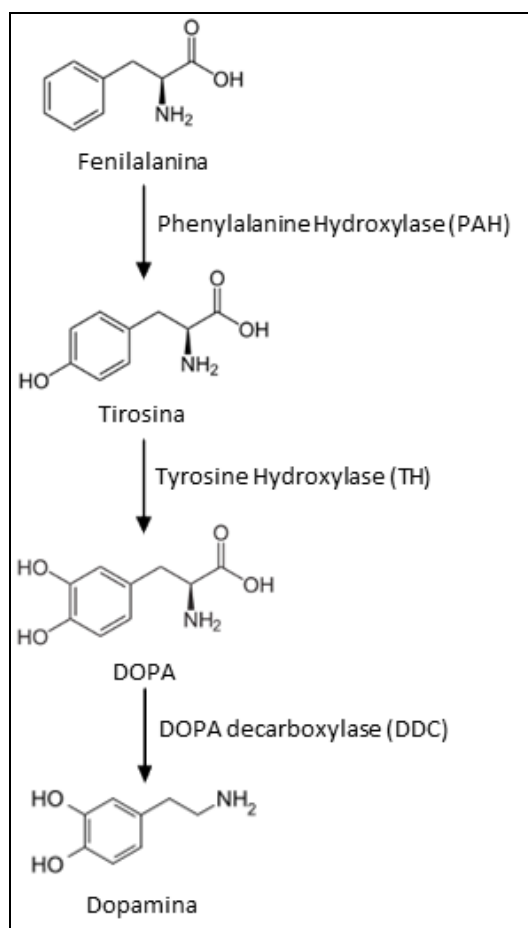
da sinalização do óxido nítrico (CHEN et al., 1997; KENDRICK et al., 1997; MAJLESSI et al., 2008; HOSSEINI et al., 2010; KNOX et al., 2011; ITO, MATSUO e OKADA, 2013). O óxido nítrico (ON) desempenha papéis extremamente importantes na fisiologia dos sistemas biológicos, em especial no sistema nervoso, onde age como mediador na plasticidade sináptica, na potenciação de longa duração - LTP (é uma melhoria duradoura na transmissão de sinal entre neurônios baseado em padrões de atividades recentes), e na consolidação de memória (PRAST e PHILIPPU, 2001; BÖGER, 2007). O ON é sintetizado no cérebro mediante demanda, tais como em estimulação de processos cognitivos, nos quais essa molécula é requerida (PAUL e EKAMBARAM, 2011). O óxido nítrico é gerado em células neuronais como um coproduto da reação no qual a L-arginina é convertida em citrulina e óxido nítrico, utilizando como cofator o NADPH em uma reação catalisada pela enzima ON *Syntetase* (NOS) (MAYER, 1994; PAUL e EKAMBARAM, 2011).

A sinalização do óxido nítrico tem sido relacionada com processos cognitivos tanto em vertebrados (KENDRICK et al., 1997) como em invertebrados (ITO, MATSUO e OKADA, 2013). Em abelhas foi demonstrada a atuação dessa molécula tanto em aprendizagem olfativa quanto em aprendizagem tátil (MÜLLER, 1996; MÜLLER, 2000; DACHER e GAUTHIER, 2008). Diversos estudos indicam que a inibição da enzima NOS pode prejudicar a consolidação da memória (KOPF et al., 2001; YILDIRIM e MARANGOZ, 2004) e bloquear a indução da LTP (BON e GARTHWAITE, 2003). A arginina levogira, precursora do ON, foi caracterizada por melhorar a formação de memória e inverter o efeito de inibidores da enzima NOS (MAJLESSI et al., 2008); além disso, alguns estudos apontam que a administração de arginina é capaz de melhorar a consolidação da memória e aprendizagem (PLECH, KLIMKIEWICZ e MAKSYM, 2003).

Esses estudos, em conjunto com os resultados do presente trabalho, apontam a necessidade de estudos mais detalhados sobre os papéis fisiológicos da arginina, bem como a do óxido nítrico, no sistema nervoso de insetos, na tentativa de melhor compreender os mecanismos bioquímicos envolvendo essas moléculas e a modulação de processos cognitivos em abelhas.

### 5.1.3 Fenilalanina no metaboloma do cérebro de abelhas

A fenilalanina é um aminoácido classificado como não polar, por conta da natureza hidrofóbica conferida pelo grupo benzil da cadeia lateral. Além de ser componente essencial das proteínas, esse aminoácido aromático funciona como precursor de neurotransmissores, tais como a dopamina, no sistema nervoso (COLEMAN e NECKAMEYER, 2005; FERNSTROM e FERNSTROM, 2007). Na figura 24 pode-se observar a via metabólica da fenilalanina, envolvida com a síntese de dopamina. Nessa via a tirosina é originada a partir da fenilalanina em uma reação catalisada pela enzima *Fenilalanina Hidroxilase* (PAH); posteriormente a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) é sintetizada a partir da tirosina pela ação da *Tirosina Hidroxilase* (TH); o DOPA, por sua vez, dá origem a dopamina em uma reação catalisada pela enzima *DOPA decarboxilase* (DDC).



**Figura 24.** Representação da via metabólica da fenilalanina, envolvida com a síntese de dopamina (adaptado de COLEMAN e NECKAMEYER (2005)).

Simcock e colaboradores (2014) ao estudar a influência de diferentes aminoácidos presentes na alimentação de abelhas *A. mellifera* sobre a aprendizagem associativa nesses insetos, concluiu que os aminoácidos essenciais como a fenilalanina, a isoleucina e a metionina afetam a aprendizagem de diversos modos. No presente trabalho a fenilalanina foi encontrada apenas no grupo REP, o que pode estar relacionada com a síntese de dopamina nesses indivíduos. Embora existam muitas evidências do envolvimento de diversos aminoácidos em funções neurológicas (SASE et al., 2013), existe uma quantidade extremamente limitada de informações sobre a atuação da fenilalanina no sistema nervoso de insetos, e em especial em abelhas.

As imagens geradas por espectrometria de massas da fenilalanina (Figura 15) mostram que nos indivíduos controle esse aminoácido estava presente em baixíssimas concentrações relativas, ao passo que nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental REP, esse composto estava presente em concentrações relativas muito maiores, principalmente nas regiões do lobo antenal e dos corpos pedunculados.

#### **5.1.4 Betaína no metaboloma do cérebro de abelhas**

A betaína (N,N,N-trimetilglicina ou glicinabetaína), encontrada exclusivamente no grupo REP, é caracterizado por ser um osmólito intracelular essencial e uma fonte grupos metil (metila). Como osmólito intracelular essa molécula atua regulando o volume celular através do contrabalanceamento de mudanças na tonicidade extracelular, e estabilizando macromoléculas contra uma grande variedade de perturbações fisiológicas (SLOW et al., 2009; ZHOU et al., 2012). Além disso, a betaína tem um papel chave no metabolismo do grupo metila, fornecendo às células um estoque de grupo metila (SLOW et al., 2009; ZHOU et al., 2012). A betaína pode ser oriunda tanto da dieta, quanto pode ser produzida no organismo através da oxidação da colina (LEVER e SLOW, 2010). Embora a betaína exerça funções biológicas importantes, assim como descrito anteriormente para a fenilalanina, existe uma quantidade extremamente limitada de informações acerca dessa molécula no sistema nervoso de insetos.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a betaína tenha sido produzida nos indivíduos do grupo REP, provavelmente através da oxidação da colina (LEVER e SLOW, 2010); esse metabólito pode ser importante para esses indivíduos por fornecer às células nervosas um estoque de grupos metil e por atuar como osmólito intracelular.

### 5.1.5 Uracila no metaboloma do cérebro de abelhas

A uracila, encontrado exclusivamente no grupo controle, é uma base nitrogenada, representada pela letra U no código genético, formada por um anel simples derivado de pirimidina. É caracterizado por substituir a timina na transcrição do DNA para RNA e é, portanto, complementar à adenina, com a qual se liga através de duas ligações de hidrogênio. O nucleotídeo uracila é descrito por desempenhar funções fisiológicas cruciais. Por exemplo, ele participa de reações de glicosilação de proteínas, da biossíntese de fosfolípidos e de glicogênio (HAUGAARD, FRANTZ e HAUGAARD, 1997; SPRONG et al., 2003; CANSEV, 2006). No entanto, além de ser substrato para a síntese de RNA e DNA, sua função no sistema nervoso ainda não é bem compreendida (WANG et al., 2009).

A uracila em *A. mellifera*, além de participar do metabolismo das pirimidinas, participa do metabolismo da  $\beta$ -alanina, de acordo com as rotas metabólicas depositadas no KEGG. Na rota metabólica da  $\beta$ -alanina, a uracila é convertida em 5,6-Dihidrouracil através da ação da enzima *Dihydropyrimidine dehydrogenase*, que posteriormente é convertido em N-carbamoil- $\beta$ -alanina, através da ação da enzima *Dihydropyrimidinase*; esse composto é convertido, então, em  $\beta$ -alanina, através da ação da enzima  *$\beta$ -alanine synthase* (BORYCZ et al., 2012). Embora muitos estudos tenham sido realizados para entender a função no sistema nervoso da  $\beta$ -alanina, um  $\beta$ -amino ácido estruturalmente similar ao GABA e glicina, sua função ainda permanece um mistério (BORYCZ et al., 2012).

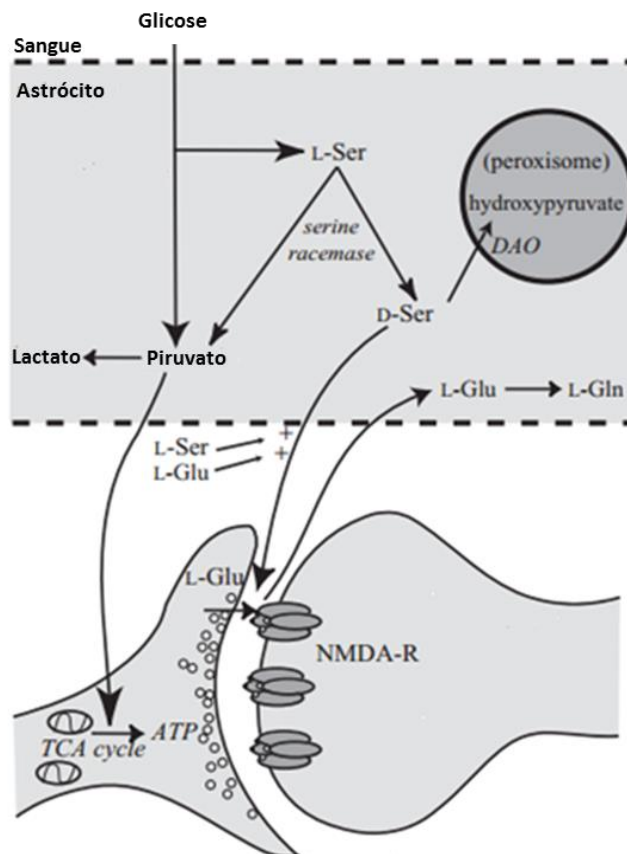
Os dados obtidos no presente trabalho para a uracila sugerem que esse composto tenha sido consumido nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental REP, provavelmente no processo de síntese de RNA, e que esse processo seja importante para adaptar o cérebro ao comportamento de extensão da probóscide.

### 5.1.6 Serina no metaboloma do cérebro de abelhas

Outra molécula encontrada exclusivamente no grupo REP foi a serina, um aminoácido de fórmula molecular  $C_3H_7NO_3$ , caracterizado como polar devido a presença do grupo hidroxila. Inúmeros estudos têm relatado a importância desse aminoácido, em especial do isômero óptico dextrogiro (D-serina), na promoção da migração neuronal, na plasticidade sináptica, na neurotransmissão e no desenvolvimento e na maturação do sistema nervoso (MARTINEAU, BAUX e

MOTHET, 2006). Esses estudos também apontam a função moduladora da serina sob o receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA), um tipo de receptor glutamatérgico (DANYSZ e PARSONS, 1998; MARTINEAU, BAUX e MOTHET, 2006; WOLOSKER et al., 2008). Esse receptor de neurotransmissor é considerado essencial no sistema nervoso, estando envolvido com muitos processos fisiológicos, tais como a formação da memória, plasticidade sináptica e o desenvolvimento do sistema nervoso (DANYSZ e PARSONS, 1998; WOLOSKER et al., 2008).

A figura 25 resume parte do metabolismo da serina no cérebro. Inicialmente a glicose é metabolizada via glicólise para produzir piruvato, lactato e L-serina através da via biossintética da glicose-3-fosfatoglicerato-3-fosfoserina; outra via produtora da L-serina é a partir da glicina, através da via da hidroximetiltransferase (MARTINEAU, BAUX e MOTHET, 2006). Além disso, a enzima *Serina racemase* (SR) catalisa a formação de D-serina a partir da L-serina, com a liberação de água e formação de piruvato, que é uma potencial fonte de lactato para os neurônios, fornecendo energia durante os períodos de elevada atividade sináptica (FOLTYN et al., 2005; MARTINEAU, BAUX e MOTHET, 2006). A conversão de L-serina em D-serina está relacionada com o metabolismo energético e ao metabolismo de outros aminoácidos. O piruvato, derivado da reação catalisada pela enzima SR, pode ser utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) mitocondrial, onde é descarboxilado para gerar a produção de diversas moléculas importantes para o sistema nervoso, tais como o GABA, o glutamato e a glicina, além da geração de adenosina trifosfato (ATP) (MARTINEAU, BAUX e MOTHET, 2006). Além disso, essas moléculas de piruvato podem ser utilizados pela enzima *Piruvato carboxilase* para formar ácido aspártico (MARTINEAU, BAUX e MOTHET, 2006). A D-serina age nos neurônios ativando receptores glutamatérgicos NMDA-dependentes (SCHELL, 2004; MARTINEAU, BAUX e MOTHET, 2006; WOLOSKER et al., 2008).



**Figura 25.** Metabolismo da serina no cérebro, adaptado de SCHELL, 2004.

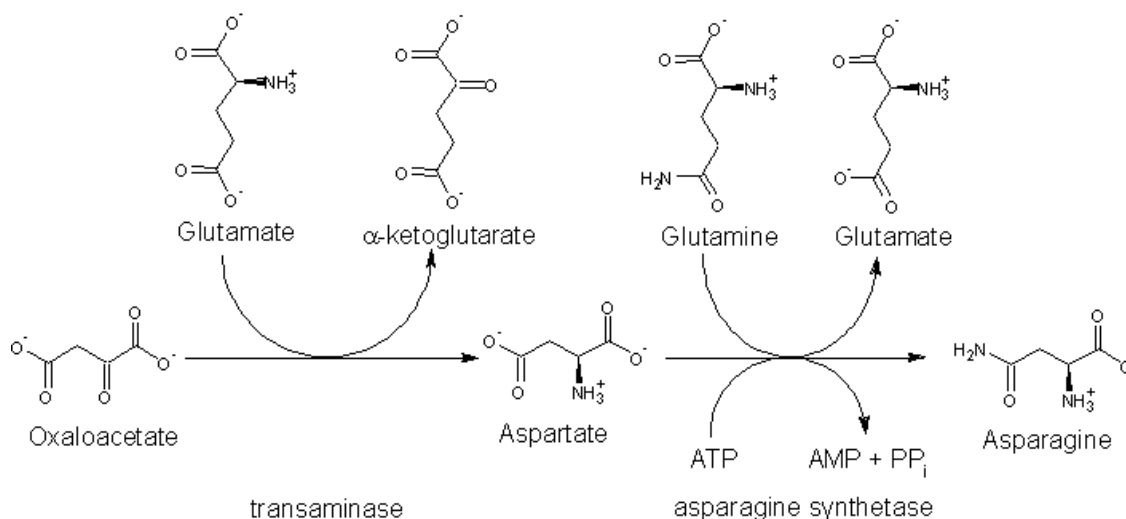
Nesse contexto, a produção de serina observada nos indivíduos submetidas ao ensaio comportamental REP sugere que essa molécula seja importante para adaptar o cérebro ao comportamento de extensão da probóscide. Alguns estudos também apontam que a serina, assim como a glicose, está envolvida com o metabolismo energético, proporcionando o fornecimento de energia aos neurônios durante períodos de intensa ativação neuronal, através do aumento na função sináptica. De modo similar ao descrito anteriormente para as poliaminas, a serina também está relacionada com a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA-dependentes. A carência de estudos sob a serina evidencia a grande necessidade de estudos detalhados do metabolismo dessa molécula em abelhas.

### 5.1.7 Asparagina no metaboloma do cérebro de abelhas

A asparagina é uma amino ácido utilizado na síntese de proteínas. É um composto orgânico de fórmula química  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , que possui uma carboxamida como grupo funcional de sua cadeia lateral, fazendo com que ele seja

classificado como um amino ácido alifático polar. A asparagina é sintetizada biologicamente através da conversão de oxaloacetato em aspartato, através da enzima *transaminase*, que transfere o grupo amina de um glutamato para o oxaloacetato, produzindo  $\alpha$ -cetoglutarato e aspartato; a enzima *asparagine synthetase* produz asparagina, AMP, glutamato e pirofosfato a partir de aspartato, glutamina e ATP (RUZZO et al., 2013), como representado na figura 26. Em humanos a síntese de asparagina foi descrita como sendo essencial para o desenvolvimento e função do cérebro; problemas na produção desse amino ácido podem resultar em diversos problemas neurológicos (RUZZO et al., 2013).

No presente trabalho a asparagina foi encontrada tanto no grupo REP quanto no grupo controle, porém houve um aumento estatisticamente significativo da presença desse amino ácido no cérebro dos indivíduos do grupo REP. A síntese de asparagina nos indivíduos submetidos ao ensaio comportamental REP sugere um possível aumento na demanda por esse amino ácido para a síntese protéica no cérebro desses indivíduos, e que esse processo seja importante para adaptar o cérebro ao comportamento de extensão da probóscide.



**Figura 26.** Biossíntese da asparagina a partir de oxaloacetato.

### 5.1.8 Guanosina Monofosfato no metaboloma do cérebro de abelhas

A guanosina monofosfato (GMP), também conhecido ácido guanílico, é um nucleotídeo utilizado como monômero de RNA. GMP é constituído de um grupo fosfato, um açúcar ribose (pentose) e uma base nitrogenada guanina, sendo, portanto, classificado como ribonucleosídeo de monofosfato. As bases purínicas de guanina,

guanosina –tri, –di, e monofosfato (GTP, GDP e GMP, respectivamente) são caracterizadas por exercerem funções regulatórias nas células, como a evidência clássica da modulação intracelular de proteínas G na transdução de sinal transmembranar (GUDERMANN, SCHORNEBERG e SCHULTZ, 1997). Além disso, esses compostos também já foram relacionados por exercerem efeitos tróficos em células neuronais e por exercerem efeitos antagônicos na neurotransmissão glutamatérgica (BARON et al., 1989; RUBIN et al., 1996; MALCON et al., 1997). Em *A. mellifera* a guanosina monofosfato está envolvida no metabolismo das purinas, onde age como precursora de guanosina, guanina, GDP e xantosina, de acordo com as rotas metabólicas depositadas no KEGG.

Em ratos foi observado que durante a discriminação de luzes, houve aumento na incorporação de precursores de RNA (tais como o GMP) dentro de neurônios de diversas regiões do cérebro. Resultados similares foram obtidos por diversos trabalhos com outros modelos de aprendizagem e com diferentes métodos. Esses resultados sugerem que o processo de aprendizagem que resulta na formação de memória está correlacionado com o aumento da síntese de RNA em diversas regiões do cérebro; isso leva a alterações na síntese de proteínas durante experimentos de aprendizagem, induzindo, assim, mudanças nas células neuronais e nas sinapses. Anally e colaboradores (2016 – dados em processo de publicação) observaram que abelhas *A. mellifera* submetidas ao ensaio comportamental de REP apresentaram regulação positiva (*up-regulation*) de diversas proteínas do cérebro quando comparadas a abelhas do grupo controle, em especial de proteínas relacionadas com o metabolismo de compostos cíclicos, heterocíclicos, aromáticos, nitrogenados e de proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos. No presente trabalho o GMP foi encontrado tanto no grupo REP quanto no grupo controle, porém houve um aumento estatisticamente significativo da presença desse monômero de RNA no cérebro dos indivíduos do grupo REP. A síntese de GMP no grupo REP sugere um possível aumento na demanda desse nucleotídeo para a síntese de RNA no cérebro das abelhas, que levaria a mudanças na síntese de proteínas. Esses processos parecem ser extremamente importantes para adaptar o cérebro das abelhas a coordenar o reconhecimento de odor e associar esse odor com a realização de um comportamento reflexo.

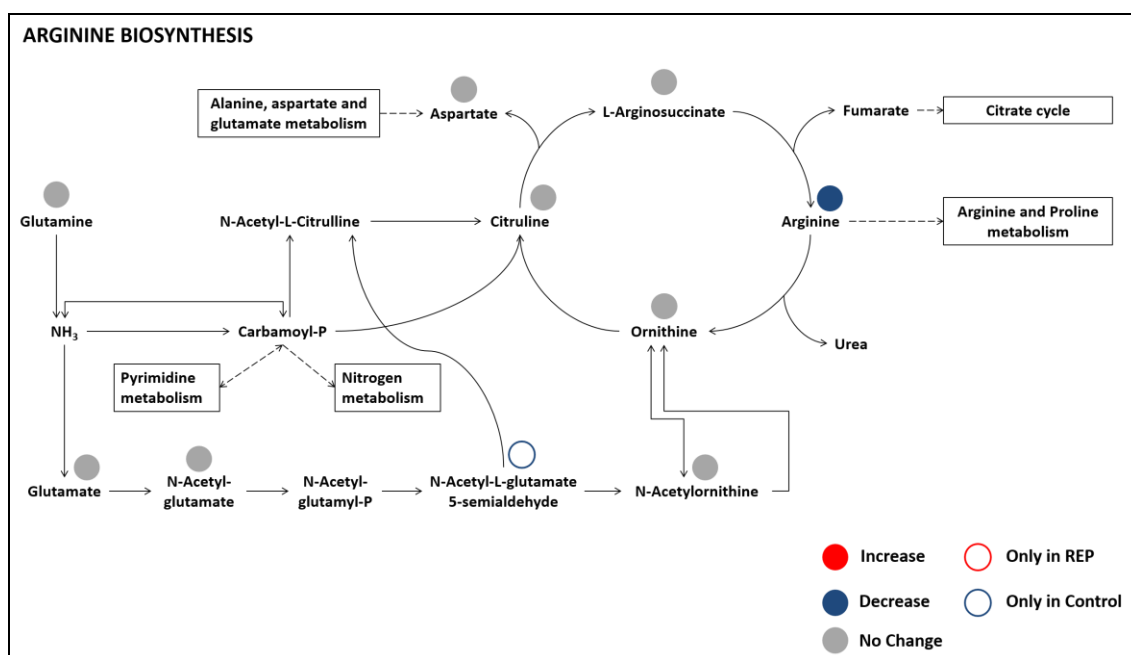
As imagens geradas por espectrometria de massas da guanosina monofosfato (figura 16) mostram aumento da concentração relativa desse composto nos indivíduos do grupo REP em relação aos indivíduos do grupo controle. Além disso, é possível

observarmos que o aumento da concentração relativa se deu em especial nas regiões do lobo antenal e dos corpos pedunculados, que são as principais estruturas responsáveis pelo processamento olfativo em abelhas. O aumento da concentração relativa observado para o GMP nos indivíduos do grupo REP corroboram com o que foi observado a partir das análises solúveis do cérebro de abelhas por LC-ESI.

## **5.2 Principais rotas metabólicas no cérebro de abelhas envolvidas no comportamento REP**

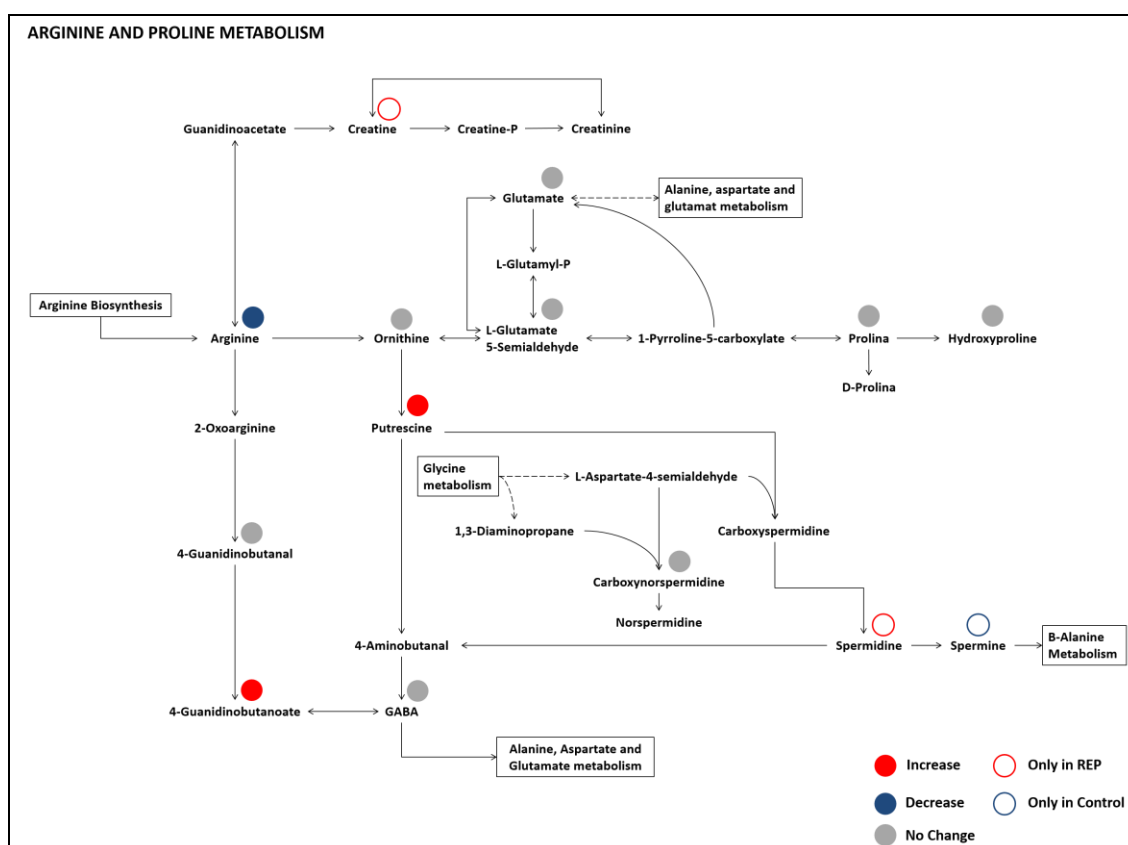
Para a melhor compreensão dos papéis biológicos dos metabólitos identificados, foi feita a busca desses compostos na coleção de banco de dados de rotas metabólicas para *A. mellifera* do KEGG. Todas as rotas metabólicas contendo pelo menos um dos compostos identificados foram separadas e analisadas individualmente. Dentre essas rotas temos principalmente vias de biossíntese de aminoácidos: metabolismo da glicina, serina e prolina; biossíntese de aminoácidos; metabolismo da  $\beta$ -alanina; metabolismo da cisteína e da metionina; metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; metabolismo da taurina e hipotaurina; metabolismo da glutatona; metabolismo das purinas; biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano; biossíntese da lisina; metabolismo da histidina; biossíntese da valina, leucina e isoleucina; metabolismo da fenilalanina. Nessa análise, observou-se que grande parte dos compostos identificados se concentram na rota de biossíntese da arginina (figura 27) e na rota metabólica da arginina e prolina (figura 28).

Na figura 27 temos parte da rota de biossíntese da arginina. Nessa rota observa-se a alteração metabólica que ocorreu entre os indivíduos do grupo controle e os indivíduos submetidos ao ensaio comportamental de extensão da probóscide. Os círculos em vermelho indicam os metabólitos que aumentaram de concentração no grupo REP ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ); em azul são os metabólitos que diminuiram de concentração; em cinza são os metabólitos que não sofreram alteração significativa de concentração; o restante dos compostos não foi monitorado. Dentre os compostos que não sofreram alteração de concentração estão: glutamina, glutamato, N-acetil-glutamato, aspartato, citrulina, L-arginosuccinato, ornitina e a N-acetilornitina; a arginina foi consumida, e o N-acetil-glutamato-5-semialdeído foi identificado apenas no grupo controle.



**Figura 27.** Segmento da rota metabólica da biossíntese da arginina. Os círculos em vermelho representam as mudanças metabólicas que são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), de acordo com os dados metabolômicos obtidos por LC-ESI-MS/MS, para abelhas submetidas ao ensaio comportamental de extensão da probóscide e os indivíduos controle. Em azul são os metabólitos que diminuíram de concentração; em cinza são os metabólitos que não sofreram alteração significativa de concentração; o círculo vermelho representa os compostos identificados apenas no grupo REP; o círculo azul representa os compostos identificados apenas no grupo controle; os restantes dos compostos não foram monitorados (metabólitos sem círculos). Os dados estatísticos utilizados nessa figura foram obtidos das tabelas 10 e 14.

Na figura 28 podemos visualizar um segmento da rota metabólica da arginina e prolina. Nessa rota a arginina diminuiu de concentração no grupo REP. A espermidina e a creatina foram encontradas apenas no grupo REP e a espermina apenas no grupo controle. Os compostos 4-guanidinobutanal, GABA, ornitina, glutamato, L-glutamato-5-semialdeído, prolina, hidroxiprolina e carboxinorspermidina não sofreram alteração significativa de concentração na comparação entre o grupo REP e controle. Esses resultados demonstram que os cérebros de abelhas submetidas ao ensaio de REP sofreram uma série de transformações metabólicas que, provavelmente, foram importantes para coordenar o reconhecimento da molécula de sacarose, e associar esse odor com o comportamento reflexo para a extensão da probóscide (estímulo não condicionado). Nesse processo a arginina presente no cérebro é metabolizada culminando na produção de creatina, 4-guanidinobotanoato, putrescina e espermidina no cérebro dos indivíduos do grupo REP. O aumento na concentração do 4-guanidinobotanoato e da putrescina provavelmente estão relacionadas com a produção do neurotransmissor GABA; além disso a putrescina também parece originar espermidina nos indivíduos do grupo REP.



**Figura 28.** Segmento da rota metabólica da arginina e prolina. Os círculos em vermelho representam as mudanças metabólicas que são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), de acordo com os dados metabolômicos obtidos por LC-ESI-MS/MS, para abelhas submetidas ao ensaio comportamental de extensão da probóscide e os indivíduos controle. Em azul são os metabólitos que diminuíram de concentração; em cinza são os metabólitos que não sofreram alteração significativa de concentração; o círculo vermelho representa os compostos identificados apenas no grupo REP; o círculo azul representa os compostos identificados apenas no grupo controle; os restantes dos compostos não foram monitorados (metabólitos sem círculos). Os dados estatísticos utilizados nessa figura foram obtidos das tabelas 10 e 14.

A creatina encontrada apenas no grupo REP foi possivelmente originada a partir da conversão de arginina em guanidinoacetato, que é, por sua vez, convertido em creatina através da ação da enzima *Guanidinoacetate methyltransferase*. Posteriormente, a enzima *Creatine kinase* catalisa a fosforilação da creatina para gerar fosfocreatina, fornecendo ao cérebro um sistema tampão de fosfato de alta energia durante o estado de síntese e utilização de ATP (STOCKLER et al., 1994; RAE et al., 2003). Diversos estudos têm demonstrado que a creatina representa um reservatório de energia ao cérebro tanto de vertebrados quanto em invertebrados, podendo aumentar o desempenho do cérebro em situações de forte ativação neural e gasto energético (MORRISON, 1973; PEREIRA et al., 2000; RAE et al., 2003).

Desse modo, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a síntese de creatina nos indivíduos do grupo REP tenha ocorrido devido ao aumento na atividade

cerebral desses indivíduos e consequente diminuição na quantidade de ATP disponível para os neurônios; nesse contexto, a creatina teria a função de aumentar o desempenho do cérebro. Provavelmente, esse processo pode ter sido acentuado devido a depleção de glicose, e consequentemente de ATP disponível no cérebro, conforme discutido anteriormente.

### **5.3 Aplicação da técnica de MALDI MSI semi-quantitativo na compreensão da distribuição regionalizada de metabólitos no cérebro de abelhas**

Com a finalidade de controlar as alterações nas variações de sinal dos analitos, e identificar variações de sinal específicas das diferentes microrregiões do cérebro das abelhas foi desenvolvida uma plataforma de MALDI MSI semi-quantitativa, através da aplicação do padrão interno 2-feniletilamina.

Na tabela 15 e 16 podemos observar grandes variações de intensidade do padrão interno entre as 18 regiões do cérebro. Essa variação não era esperada, uma vez que o PI foi aplicado de modo homogêneo sob todo o tecido. Na tabela 16, correspondente ao grupo controle podemos observar que a maior intensidade observada para o PI foi de 1201 no lobo antenal esquerdo, e a menor intensidade foi de 300 no lobo  $\alpha$ - direito, indicando uma redução de intensidade do PI da ordem de quatro vezes. Mesmo ao analisarmos regiões análogas, tais como lóbula direita e lóbula esquerda, podemos observar variações na intensidade do PI, que é de 800 para a lóbula direita e de 766 para a lóbula esquerda. Todavia, foi observado uma menor variação entre os valores de intensidade para regiões análogas, do que quando comparamos diferentes neurópilos entre si. Os espectros médios das regiões do lobo antenal esquerdo e do gânglio subesofageal, mostrados nas figuras 19 e 20, também evidenciam a variação de intensidade do PI. As diferenças de intensidades podem ocorrer por diversos fatores, tais como a ineficiência na extração de íons, a baixa cocristalização entre o analito e a matriz, ou devido a supressão de íons gerada por compostos endógenos presentes nas diferentes regiões do cérebro; todavia não é possível determinar qual fator é dominante. Esses resultados indicam que as diferentes microrregiões do cérebro da abelha são bioquimicamente diferentes, e que essas diferenças resultam em variações nos sinais dos íons analisados por MALDI MSI.

Embora não seja possível determinar qual fator, extração ou ionização dos analitos, é a principal fonte da variação de sinal, alguns trabalhos sugerem que pode ocorrer uma combinação desses dois fatores (PIRMAN et al., 2013b). Para a análise de

proteínas por MALDI MSI, por exemplo, normalmente múltiplos passos de lavagens são aplicados durante os passos de preparação de amostra, com a finalidade de remover sais, lipídeos e outros contaminantes que possam suprimir os sinais dos íons de interesse. Todavia, esses passos de lavagem não foram aplicados no presente trabalho, devia a alta solubilidade dos metabólitos analisados nas soluções de lavagem. Normalmente essas lavagens não são aplicadas para análises de pequenas moléculas por ocasionar em migração ou perda do analito (PIRMAN et al., 2013b). Diferenças qualitativa ou quantitativa de lipídeos nos tecidos, por exemplo, podem ser suficientes para ocasionar diferenças significativas na ionização dos analitos durante análises de MALDI MSI (PIRMAN et al., 2013b). A preparação de amostra pode ser otimizada para um determinado tipo de tecido, todavia, mesmo em um tecido tão pequeno quanto o cérebro das abelhas, podem existir variações regionais. Nesse contexto, a normalização dos valores de intensidade dos metabólitos, com base na intensidade do PI, desenvolvido no presente trabalho, mostrou-se extremamente eficiente no controle das variações decorrentes dos problemas de extração e/ou ionização dos analitos.

Após a aquisição e o processamento dos dados de MALDI MSI, foi criado um mapa de calor para representar a variação de intensidade relativa de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores por região do cérebro entre os grupos REP e controle. Na figura 22 podemos observar que os compostos presentes na parte superior do mapa de calor (GABA, ácido glutâmico, ácido caínico e putrescina) são os que aumentaram de concentração no grupo REP na maioria das regiões do cérebro. Por outro lado, os compostos presentes na parte inferior do mapa de calor (ácido aspártico, histamina, tiramina) são os que diminuíram de concentração no grupo REP na maioria das regiões do cérebro.

De modo geral, o mapa de calor demonstra uma grande assimetria na distribuição dos neurotransmissores e neuromoduladores no cérebro de *A. mellifera*. A lateralização no cérebro, ou seja, diferentes especializações funcionais e/ou estruturais dos lados direito e esquerdo do cérebro, consideradas anteriormente por serem únicas de seres humanos, agora é bem conhecido por estar presente em outras classes de vertebrados (VALLORTIGARA e ROGERS, 2005). Recentemente, evidências de lateralização em invertebrados têm surgido, sugerindo que a lateralização do sistema nervoso pode não ser apenas uma característica de cérebros mais complexos, mas também uma característica dos cérebros mais simples (FRASNELLI, VALLORTIGARA e ROGERS, 2012). Acredita-se que a assimetria no cérebro auxilia

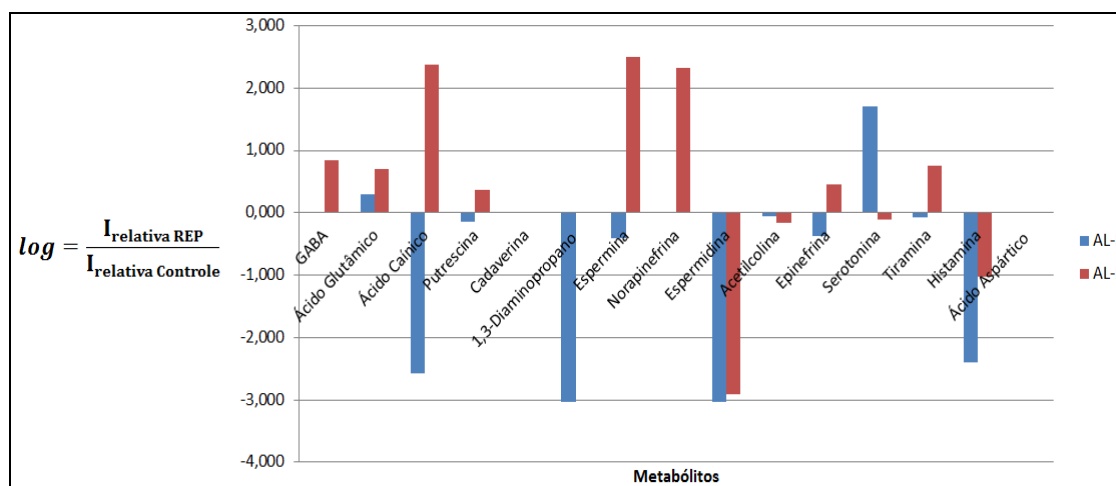
na otimização do circuito neural, evitando duplicações de funções e promovendo o processamento paralelo (VALLORTIGARA e ROGERS, 2005; ROGERS, VALLORTIGARA e ANDREW, 2013).

Diversos estudos têm fornecido evidências da lateralização do sistema sensorial em abelhas, em particular do sistema olfativo e do sistema visual. O primeiro estudo a reportar evidências de lateralização no olfato em abelhas *A. mellifera* foi conduzido por Letzkus e colaboradores (2006). Nesse trabalho os autores demonstraram a lateralização na aprendizagem associativa de um odor com a fonte de alimento, através da utilização de duas versões diferentes do teste REP. Os resultados desse trabalho revelaram que abelhas com a antena direita coberta aprendem menos que abelhas com a antena esquerda coberta e abelhas com ambas as antenas descobertas. Frasnelli e colaboradores (2010) analisaram as diferenças morfológicas do número de sensilas entre as antenas direita e esquerda de abelhas. Os resultados demonstraram que a antena direita apresenta um número significativamente maior de sensilas olfativas em sua superfície, quando comparado com a antena esquerda (3 a 7 % de diferença).

De modo geral, ainda é difícil entender se a lateralização no olfato em abelhas é oriunda da assimetria nas antenas ou devido a diferenças na recuperação da aprendizagem e memória entre os caminhos olfativos direito e esquerdo. Ainda permanece questionável se mesmo a pequena diferença de sensilas (3-7 %) pode explicar, por completo, o desempenho superior da antena direita na recuperação da memória e aprendizagem (FRASNELLI, VALLORTIGARA e ROGERS, 2012). Rogers e Vallortigara (2008) demonstraram, em contrapartida, que a recuperação da memória após 23-24 horas do treinamento é melhor quando a antena esquerda está em uso do que quando a antena direita está em uso. Isso sugere que a memória de longo prazo é acessada principalmente pela antena esquerda, e que o processo de recuperação da memória olfativa é um processo tempo-dependente.

Embora o mapa de calor (figura 22) tenha demonstrado a grande assimetria na distribuição dos neurotransmissores e neuromoduladores em quase todas as regiões do cérebro das abelhas, essa assimetria fica ainda mais evidente na região dos lobos antenais. Na figura 29, podemos visualizar a variação na distribuição dos diferentes neurotransmissores e neuromoduladores entre os lobos antenais direito e esquerdo. Nesse gráfico os valores positivos no eixo *x* significa que um determinado composto estava mais concentrado no grupo REP do que no grupo controle; os valores negativos significam que a concentração do composto diminuiu no grupo REP em relação ao

controle. A região do lobo antenal é caracterizada por ser o principal centro nervoso olfativo (centro olfativo primário), responsável por processar informações de odores captados pelas antenas; essa região também é considerada como um dos principais centros nervosos envolvidos na aprendizagem olfativa.



**Figura 29.** Distribuição dos diferentes neurotransmissores e neuromoduladores no AL-D: lobo antenal direito (em azul) e AL-E: lobo antenal esquerdo (em vermelho).

Na figura 29 alguns compostos, tais como o ácido caínico, putrescina, espermina, epinefrina, serotonina e a tiramina sofreram uma diminuição de concentração em um dos lobos antenais, enquanto que no outro lobo, observou-se o oposto para o mesmo composto. Compostos como o GABA, 1,3-Diaminopropano e norepinefrina foram identificados apenas em um dos lobos antenais. De modo geral, esses resultados demonstram uma grande lateralização do cérebro, a nível molecular, em abelhas submetidas ao estímulo REP. Embora a lateralização do processamento sensorial tenha sido bem estudada, existe pouca informação na literatura sobre como a assimetria é representada a nível molecular no sistema nervoso de abelhas.

A putrescina foi um dos compostos identificados tanto pela análise solúvel por LC-ESI-MS/MS quanto pela análise de MALDI MSI. Na análise solúvel, esse composto foi encontrado no grupo controle (15,6 ng/cérebro) e REP (41,4 ng/cérebro), e o teste estatístico indicou que houve um aumento significativo desse composto no grupo REP em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), conforme citado anteriormente. Nessa abordagem os valores quantitativos absolutos obtidos representam a média das concentrações globais obtidas para um determinado composto no cérebro das abelhas. Os dados de MALDI

MSI sugerem que para alguns compostos, tais como a putrescina, as variações na concentração ocorram em centros nervosos específicos.

Na figura 22 podemos observar que a concentração relativa da putrescina diminui na lóbula direita, cálice lateral direito, lobo antenal direito, cálice medial esquerdo, cálice lateral esquerdo, lóbula esquerda e medula esquerda; por outro lado, a concentração relativa desse composto aumenta no cálice medial direito, pedúnculo direito, corpo central,  $\alpha$ -Lobo esquerdo e pedúnculo esquerdo. Ao fazermos uma análise em conjunto dos resultados obtidos pelas duas estratégias, é possível inferir não só que a putrescina aumentou no grupo REP, mas que esse aumento não ocorreu em todos os centros nervosos, mas sim em regiões específicas do cérebro. Esses resultados sugerem que a putrescina é importante para o processamento do estímulo ao qual as abelhas foram submetidas, e que a ação desse composto é região-específica. Além disso, as duas técnicas utilizadas para o estudo de metabólitos demonstram-se complementares, e auxiliam na melhor compreensão dos processos cognitivos em *A. mellifera*.

De modo geral, a comparação dos dados de MALDI MSI obtidos para o grupo controle e REP revelam a alteração de todos os padrões de distribuição dos metabólitos estudados, comprovando que o ensaio comportamental ao qual as abelhas foram submetidas teve efeito no comportamento e na fisiologia desses insetos. Além disso, esses resultados demonstraram uma grande assimetria na distribuição desses metabólitos no cérebro de *A. mellifera*, corroborando para a hipótese de que a lateralização do sistema nervoso não seja apenas uma característica de cérebros mais complexos, mas também uma característica dos cérebros menos derivados. Aparentemente, mesmo os cérebros menores e mais simples se beneficiam por quebrar a simetria entre o eixo “esquerda-direita”. A simplicidade relativa desses organismos faz deles excelentes modelos experimentais para elucidar mecanismos neurobiológicos básicos da assimetria dos cérebros. Nesse contexto, a plataforma de MALDI MSI desenvolvida apresenta-se como uma ferramenta inovadora e singular para o estudo da lateralização a nível molecular no sistema nervoso em abelhas.

## 6 CONCLUSÕES

Por serem intermediários nas reações bioquímicas, os metabólitos desempenham função muito importante na conexão de diferentes vias metabólicas, e fazem parte dos sistemas regulatórios que operam dentro das células. Uma vez que a metabolômica reflete diretamente o estado fisiológico, como resultado da interação do genoma com o ambiente, e fornece grande conhecimento sobre o funcionamento celular, ela pode ser considerada uma ferramenta poderosa e útil para estudar o metabolismo e fisiologia dos organismos vivos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a investigação do perfil metabolômico de abelhas submetidas e não submetidas ao experimento de reflexo da extensão da probóscide, na tentativa de compreender as transformações moleculares que ocorrem no cérebro desses insetos durante o reconhecimento de odor (glicose – estímulo não condicionado) e associação desse odor com um comportamento reflexo (extensão da probóscide).

Para a análise do perfil global de metabólitos foram criadas duas bibliotecas de compostos de baixas massas moleculares característicos de cérebro de insetos; além disso foi padronizado o uso do sistema LC-ESI-MS e MS<sup>2</sup> para a análise dos extratos de cérebros. Essa abordagem mostrou-se extremamente eficaz, pois permitiu a identificação e quantificação de 48 metabólitos presentes no cérebro desses insetos. Além disso, foi desenvolvida uma plataforma analítica de MALDI MSI que permite a localização (distribuição espacial) e semi-quantificação de metabólitos no cérebro de *A. mellifera*. Esse novo método envolveu a otimização dos métodos de preparação de amostra, seguido pela reprodutível e uniforme deposição de padrão interno de baixa massa molecular (2-FEA) nas secções de cérebro de abelha, utilizando a impressora química ChIP-1000; essa metodologia permitiu a comparação mais precisa entre diferentes amostras analisadas.

De modo geral, no presente estudo o ensaio de REP parece agir como gatilho de algumas cascatas neurais. Ao tocar a antena com a solução de sacarose, as moléculas de carboidrato se ligam aos receptores específicos na antena, causando uma série de transformações metabólicas, através da transdução de sinais, que provavelmente foram importantes para coordenar o reconhecimento da molécula de sacarose, e associar esse odor com um comportamento reflexo para a extensão da probóscide (estímulo não condicionado).

Através dos dados obtidos pode-se inferir que os indivíduos do grupo REP apresentaram intensa atividade cerebral, alto gasto energético, intensa sinalização química e a ativação de algumas cascatas metabólicas específicas. As seguintes diferenças foram encontradas: a ausência de glicose no grupo REP indica que essa molécula tenha sido consumida, provavelmente no fornecimento de energia adicional ao cérebro e como substrato para a síntese de novos neurotransmissores; esse resultado sugere intensa ativação neuronal nos indivíduos do grupo REP. A uracila, encontrada exclusivamente no grupo controle, provavelmente foi consumida nos indivíduos do grupo REP nos processos de síntese de RNA. A fenilalanina foi encontrada apenas no grupo REP, o que pode estar relacionado com a síntese do neurotransmissor dopamina nesses indivíduos. A betaína, encontrada exclusivamente no grupo REP, provavelmente foi originada através da oxidação da colina; esse metabólito pode ser importante para esses indivíduos por fornecer às células nervosas um estoque de grupos metil e por atuar como osmólito intracelular. O aminoácido serina, presente exclusivamente no grupo REP, provavelmente está envolvido com o metabolismo energético e metabolismo de outros aminoácidos nesses indivíduos. A asparagina, encontrada em maior concentração no grupo REP, provavelmente foi sintetizada biologicamente devido ao aumento na demanda desse aminoácido para a síntese proteica nesses indivíduos. A guanosina monofosfato presente em maior concentração nos indivíduos do grupo REP sugere que esse nucleotídeo tenha sido sintetizado, possivelmente devido ao aumento na demanda desse composto para a síntese de RNA, o que levaria a mudanças na síntese de proteínas no cérebro desses indivíduos.

Além desses resultados foi possível observar que a arginina, presente em maiores concentrações no grupo controle, foi consumida na rota metabólica da arginina e prolina no cérebro dos indivíduos do REP. Nesses indivíduos, a arginina foi catabolizada originando creatina, 4-guanidinobotanoato, putrescina e espermidina. O aumento na concentração do 4-guanidinobotanoato e putrescina provavelmente está relacionada com a produção do neurotransmissor GABA. Além disso, a putrescina também parece originar espermidina nos cérebros dos indivíduos do grupo REP, onde essas moléculas atuam na neurogênese e na diferenciação neuronal, conferindo maior plasticidade celular a essas abelhas. As imagens geradas por espectrometria de massas da putrescina mostraram que o maior aumento na concentração da putrescina ocorreu na região dos lobos antenais, sugerindo um possível envolvimento dessa molécula no processamento de informações do odor de sacarose captados pelas antenas. A creatina,

encontrada apenas no grupo REP, possivelmente foi originada da conversão de arginina em guanidinoacetato, e de guanidinoacetato em creatina; isso provavelmente ocorreu devido ao aumento na atividade cerebral desses indivíduos e consequente diminuição na quantidade de ATP disponível para os neurônios, onde a creatina agiria como reservatório energético e teria a função de aumentar o desempenho do cérebro. Esse processo parece ter sido acentuado devido a depleção de glicose, e consequentemente de ATP disponível no cérebro.

As imagens geradas por espectrometria de massas revelaram uma grande assimetria na distribuição dos metabólitos estudados em quase todas as regiões do cérebro das abelhas, corroborando com dados da literatura que sugerem a lateralização no cérebro desses insetos, que é caracterizada por diferentes especializações funcionais e/ou estruturais entre lados direito e esquerdo do cérebro. Embora tenha sido encontrado assimetria na distribuição dos metabólitos em quase todas as regiões do cérebro das abelhas, essa assimetria ficou ainda mais evidente na região dos lobos antenais direito e esquerdo. A comparação entre os dados de MALDI MSI entre o grupo controle e REP revelaram que compostos como o ácido caínico, putrescina, espermina, epinefrina, serotonina e a tiramina sofreram uma diminuição de concentração em um dos lobos antenais, enquanto que no outro lobo, observou-se o oposto para o mesmo composto. Compostos como o GABA, 1,3-Diaminopropano e norepinefrina foram identificados apenas em um dos lobos antenais. Provavelmente a assimetria entre o eixo “esquerda-direita” encontrada auxilia na otimização do circuito neural e no processamento de informações. Nesse contexto, a plataforma de MALDI MSI desenvolvida no presente trabalho apresenta-se como uma ferramenta inovadora e singular para o estudo da lateralização a nível molecular no sistema nervoso em abelhas.

As duas estratégias desenvolvidas no presente trabalho mostraram-se complementares e de fundamental importância para a compreensão da cognição em cérebro de abelhas. Além disso, essas estratégias podem ser aplicadas no estudo de outras questões biológicas de natureza cognitiva em abelhas, bem como em outros organismos. Perante este cenário, estudos que visem, por exemplo, a compreensão do processo de memória e aprendizagem em abelhas podem ser melhor investigados e descritos.

## 7 REFERÊNCIAS

ALBERT, S.; KLAUDINY, J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n.1, p. 51–59, 2004.

Analyze 7.5. Disponível em: <http://eeg.sourceforge.net/>. Acessado em 25/04/2014.

BARON, B. M.; DUDLEY, M. W.; MCCARTY, D. R.; MILLER, F. P.; REYNOLDS, I. J.; SCHMIDT, C. J. Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-methyl-D-aspartate at its receptor site both in vitro and in vivo, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 250 p. 162–169, 1989.

BERNADOU, A.; DEMARES, F.; COURET-FAUVEL, T.; SANDOZ, J. C.; GAUTHIER, M. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. **Journal of Insect Physiology**, vol. 55, n. 12, p. 1099–1106, 2009.

BICKER, G. Biogenic amines in the brain of the honeybee: cellular distribution, development, and behavioral functions. **Microscopy Research and Technique**, vol. 44, p.166–178, 1999.

BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**, vol. 45, p. 174–183, 1999.

BIRKEMEYER, C.; LUEDEMANN, A.; WAGNER, C.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Metabolome analysis: the potential of in vivo labeling with stable isotopes for metabolite profiling. *Trends in Biotechnology*, v.23 n.1, p. 28–33, 2005.

BIRNBAUM, M. J.; CONBEST, W. L.; BLOOM, T. J.; GILBERT, L. I. Polyamine regulation of protein phosphorylation in the brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Neurochemistry**, v. 48, p. 935–942, 1987.

BITTERMAN, M., E.; MENZEL, R.; FIETZ, A.; SCHÄFER, S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of Comparative Psychology**, vol. 97, p. 107–119, 1983.

BLOOM, T. I.; COMBEST, W. I.; GILBERT, L. I. Spermine stimulation of Phosphoprotein dephosphorylation in the brain of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry**, v. 20, p. 29–36, 1990.

BÖGER R. H. The Pharmacodynamics of L-Arginine. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1650S–1655S, 2007.

BON, C. L. M.; GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 1941–1948, 2003.

- BORYCZ, J.; BORYCZ, J. A.; EDWARDS, T. N.; BOULIANNE, G. L.; IAN A. MEINERTZHAGEN, I. A. The metabolism of histamine in the *Drosophila* optic lobe involves an ommatidial pathway:  $\beta$ -alanine recycles through the retina. *Journal of Experimental Biology*, v. 215, p. 1399–1411, 2012.
- BUTCHER, J. Neuroproteomics comes of age. **The Lancet Neurology**, v. 6, p. 850–851, 2007
- CANSEV, M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. **Brain Research Reviews**, v. 52, p. 389–397, 2006.
- CASTRO, R.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Ion-pair liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of quaternary ammonium herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 830, n.1, p.145–154, 1999.
- CAYRE, M.; MALATERRE, J.; STRAMBI, C.; CHARPIN, P.; TERNAUX, J. P.; STRAMBI, A. Short- and long-chain natural polyamines play specific roles in adult cricket neuroblast proliferation and neuron differentiation in vitro. **Journal of Neurobiology**, v. 48, p. 315–324, 2001.
- CAYRE, M.; STRAMBI, C.; CHARPIN, P.; AUGIER, R.; STRAMBI, A. Specific requirement of putrescine for the mitogenic action of juvenile hormone on adult insect neuroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 8238–8242, 1997.
- CHEN, J.; ZHANG, S.; ZUO, P.; TANG, L. Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain. **Neuroreport**, v. 8, p. 1771–1774, 1997.
- CHU, P. J.; SAITO, H.; ABE, K. Polyamines promote regeneration of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 673, p. 233–241, 1995.
- COLEMAN, C. M.; NECKAMEYER, W. S. Serotonin Synthesis by Two Distinct Enzymes in *Drosophila melanogaster*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 59, p. 12–31, 2005.
- COMBEST W. L.; BLOOM T. I.; GILBERT, L. I. Polyamines differentially inhibit cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation in the brain of the Tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Neurochemistry**, v. 57, p. 1581–1591, 1988.
- CONSORTIUM, T. H. G. S. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 931–949, 2006.
- CRISTINO, A. S.; BARCHUK, A. R.; FREITAS F. C. P.; NARAYANAN R. K.; BIERGANS S. D.; ZHAO Z.; SIMÕES, Z. L.; REINHART J.; CLAUDIANOS C. Neuroigin-associated microRNA-932 targets actinand regulates memory in the honeybee. **Nature Communications**, v. 5, n. 5529, p.1 –11, 2014.
- DACHER, M.; GAUTHIER, M. Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee. **Physiology & Behavior**, v. 95, p. 200–207, 2008.

DANYSZ, W.; PARSONS A. C. Glycine and N-methyl-d-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 597–664, 1998.

DECOURTYE, A. DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, p. 242–250, 2005.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; AUPINEL, P.; BRUN, F.; BAGNIS, C.; FOURRIER, J.; GAUTHIER, M. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology**, vol. 20, n. 2, p. 429–437, 2011.

DECOURTYE, A.; LEFORT, S.; DEVILLERS, J.; GAUTHIER, M.; AUPINEL, P.; TISSEUR, M. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **Julius-Kühn-Archiv**, vol. 423, p. 75–83, 2009.

DEUTSCH, E. mzML: a single, unifying data format for mass spectrometer output. **Proteomics**, vol. 8, p. 2776–2777, 2008.

DONATO, E. M.; ZANOTTO, Â. R.; BERGOLD, A. M. Ion-pair HPLC applied to the assay of the vitamin B group mixture: theoretical bases and method validation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.3, 2004.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, N. 4, 2005.

DUNN, W. B.; ERBAN, A.; WEBER, R. J. M.; CREEK, D. J.; BROWN, M.; BREITLING, R.; et al. Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. **Metabolomics**, v.9, p. 44–66, 2012.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol. 82, n. 1, p. 30–39, 2005.

EL HASSANI, A. K.; DUPUIS, J. P.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. **Invertebrate Neuroscience**, vol. 9, n. 2, p. 91–100, 2009.

EL HASSANI, A. K.; GIURFA, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Inhibitory neurotransmission and olfactory memory in honeybees. **Neurobiology of Learning and Memory**, vol. 90, n. 4, p. 589–595, 2008.

ELEANOR, Q.; BLATHERWICK, E. Q.; SVENSSON, C. I.; FRENGUELLI, B. G.; SCRIVENS, J. H. Localisation of adenine nucleotides in heat-stabilised mouse brains using ion mobility enabled MALDI imaging. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 345–347, p. 19–27, 2013

ELLIS, R. S.; BRUINEN, A. L.; HEEREN, R. M. A. A critical evaluation of the current state-of-the-art in quantitative imaging mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 1275–1289, 2014.

FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. **The Journal of Nutrition**, v.137, p. 1539–1547, 2007.

FIALA, A.; MULLER, U.; MENZEL, R. Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 22, 10125–10134. 1999.

FOLTYN, V. N.; BENDIKOV, I.; MIRANDA, J.; PANIZZUTTI, R.; DUMIN, E.; SHLEPER, M.; LI, P.; TONEY, M. D.; KARTVELISHVILY, E.; WOLOSKER, H. Serine racemase modulates intracellular Dserine levels through an a,b-elimination activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 1754–1763, 2005.

FRASNELLI, E.; VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L. J. Left–right asymmetries of behaviour and nervous system in invertebrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 1273–1291, 2012.

FURUSAWA, T.; RAKWAL, R.; NAM, H. W.; SHIBATO, J.; AGRAWAL, G. K.; KIM, Y. S.; OGAWA, Y.; YOSHIDA, Y.; KOUZUMA, Y.; MASUO, Y.; YONEKURA, M. Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one-and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3194–3229, 2008.

GALIZIA, C. G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. **Honeybee neurobiology and behavior – a tribute to Randolf Menzel**. New York: Springer, 509 p., 2012.

GARCIA, L.; GARCIA, C. H. S.; CALABRIA, L. K.; CRUZ, G. C. N.; PUENTES, A. S.; BAO, S. N.; FONTES, W.; RICART, C. A.; ESPINDOLA, F. S.; SOUSA, M. V. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 1464–1473, 2009.

GAUTHIER M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 681, p. 143–149, 2010.

GAUTHIER, M.; GRÜNEWALD, B. Neurotransmitter Systems in the Honey Bee Brain: Functions in Learning and Memory. Em: **Honeybee Neurobiology and Behavior**. Ed. Springer, Parte III, Cap. 3.3, p. 155-169, 2012.

GIAMPIETRO, D. E. P. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends in Neurosciences**, n. 26, p. 9–11, 2003.

- GIESE, K. P.; MIZUNO, K. The roles of protein kinases in learning and memory. **Learning & Memory**, v. 20, p. 540–552, 2013.
- GIURFA, M. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 193, p. 801–824, 2007.
- GIURFA, M. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, p. 726–735, 2003.
- GOLD, E. P. Role of glucose in regulating the brain and cognition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 987–995, 1995.
- GUDERMANN, T.; SCHORNEBERG, T.; SCHULTZ, G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors, **Annual Review of Neuroscience**, v. 20, p. 399–427, 1997.
- HALL, J. L.; GOLD, P. E. The Effects of Training, Epinephrine, and Glucose Injections on Plasma Glucose Levels in Rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, p. 156–167, 1986.
- HAMM, G.; BONNEL, D.; LEGOUFFE, R.; PAMELARD, F.; DELBOS, J. M.; BOUZOM, F.; STAUBER, J. Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor. **Journal of Proteomics**, v. 75, 4952–4961, 2012.
- HAMMER, M. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative learning in honeybees. **Nature**, vol. 366, p. 59–63, 1993.
- HAMMER, M.; MENZEL, R. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. **Learning & Memory**, vol 5, p. 146–156, 1998.
- HAUGAARD, E. S.; FRANTZ, K. B.; HAUGAARD, N. Effect of uridine on cellular UTP and glycogen synthesis in skeletal muscle: stimulation of UTP formation by insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, p. 2339–2342, 1997.
- HAYASAKA, T.; GOTO-INOUE, N.; ZAIMA, N.; KIMURA, Y.; SETOU, M. Organ-Specific Distributions of Lysophosphatidylcholine and Triacylglycerol in Mouse Embryo. **Lipids**, v. 44, p. 837–848, 2009.
- HERNÁNDEZ, L.G.; LU, B.; CRUZ, G.C.N.; CALÁBRIA, L.K.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R.; ESPINDOLA, F.S.; YATES, J.R.; CUNHA, R.B.; SOUSA, M.V. Worker Honeybee Brain Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 1485–1493, 2012.
- HOLLYWOOD, K.; BRISON, D.; GOODACRE, R. Metabolomic: current technologies and future trends. **Proteomics**, v.6, p. 4716–4723, 2006.

HORN, P. J.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics in situ: Insights into plant lipid metabolism from high resolution spatial maps of metabolites. **Progress in Lipid Research**, v. 54 p. 32–52, 2014.

HORN, P. J.; CHAPMAN, K. D. Metabolite Imager: customized spatial analysis of metabolite distributions in mass spectrometry imaging. **Metabolomics**, v. 10, p. 337–348, 2014.

HOSSEINI, M.; HEADARI, R.; ORYAN, S.; HADJZADEH, M. A.; SAFFARZADEH, F.; KHAZAEI, M. The effect of chronic administration of L-arginine on the learning and memory of estradiol-treated ovariectomized rats tested in the morris water maze. **Clinics**, v. 65, p. 803–807, 2010.

HOYER, S. Memory function and brain glucose metabolism. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, p. 62–67, 2003.

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, n. 5799, p. 647–649, 2006.

ITO, E.; MATSUO, R.; OKADA, R. Involvement of nitric oxide in memory formation in microbrains. **Neuroscience Letters**, v. 541, p. 1–3, 2013.

KALLBACK, P.; SHARIATGORJI, M.; NILSSON, A.; ANDREN, P. E. Novel mass spectrometry imaging algorithm assisting labeled normalization and quantitation of drugs and neuropeptides directly in tissue sections. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 4941–4951, 2012.

KEGG. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, acessado em 29/06/15.

KENDRICK, K. M.; GUEVARA-GUZMAN, R.; ZORRILLA, J.; HINTON, M. R.; BROAD, K. D.; MIMMACK, M.; OHKURA, S. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. **Nature**, v. 388, p. 670–674, 1997.

KIM, S. I.; VOSHOL, H.; VAN OOSTRUM, J.; HAST-INGS, T. G.; CASCIO, M.; e GLUCKSMAN, M. J. Neuroproteomics: Expression profiling of the brain's proteomes in health and disease. **Neurochemical Research**, v. 29, p. 1317–1331, 2004.

KLINKERT, I.; CHUGHTAI, K.; ELLIS, S. R.; HEEREN, R. M. A. Methods for full resolution data exploration and visualization for large 2D and 3D mass spectrometry imaging datasets. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 362, p. 40–47, 2014.

KNOX, L. T.; JING, Y.; FLEETE, M. S.; COLLIE, N. D.; ZHANG, H.; LIU, P. Scopolamine impairs behavioural function and arginine metabolism in the rat dentate gyrus. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 1452–1462, 2011.

KOPF, S. R.; BENTON, R. S.; KALFIN, R.; GIOVANNINI, M. G.; PEPEU, G. NO synthesis inhibition decreases cortical ACh release and impairs retention of a conditioned response. **Brain Research**, v. 894, p. 141–144, 2001.

KOROL, D. L.; GOLD, P. E. Glucose, memory, and aging. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 764–771, 1998.

KRISTON, I. Zum Problem des Lernverhaltens von *Apis mellifera* L. gegenüber verschiedenen Duftstoffen. **Zeitschrift für Vergleichende Physiologie**, vol. 74, p. 169–189, 1971.

KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, 2002.

LASKA, M.; GALIZIA, C. G.; GIURFA, M.; MENZEL, R. Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees. **Chemical Senses**, vol. 24, p. 429–438, 1999.

LEBOULLE, G. Glutamate Neurotransmission in the Honey Bee Central Nervous System. Em: **Honeybee Neurobiology and Behavior**. Ed. Springer, Parte III, Cap. 3.4, p. 171-184, 2012.

LETZKUS, P.; RIBI, W. A.; WOOD, J. T.; ZHU, H.; ZHANG, S. W.; SRINIVASAN, M. V. Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. **Current Biology**, v. 16, p. 1471–1476, 2006.

LEVER, M.; SLOW, S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 732–744, 2010.

LI, L.; CSASZAR, E.; SZODORAI, E.; PATIL, S.; POLLAK, A.; LUBEC, G. The differential hippocampal phosphoproteome of *Apodemus sylvaticus* paralleling spatial memory retrieval in the Barnes maze. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 126–134, 2014.

MAJLESSI, N.; CHOOPANI, S.; BOZORGMEHR, T.; AZIZI, Z. Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, p. 413–419, 2008.

MALATERRE, J.; STRAMBI, C.; AOUANE, A.; STRAMBI, A.; ROUGON, G.; CAYRE, M. A novel role for polyamines in adult neurogenesis in rodent brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 317–330, 2004.

MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLOS, F.; PARTATA, W.; SAURESSIG, M.; RAMIREZ, G.; SOUZA, D. O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum, **Neuroscience Letters**, v. 225, p.145–148, 1997.

MARTINEAU, M.; BAUX, G.; MOTHET, J. P. D-Serine signalling in the brain: friend and foe. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 8, 2006

- MAYER, B. Regulation of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase. **Cell Biochemistry and Function**, v. 12, p. 167–177, 1994.
- McNAY, E. C.; FRIES, T. M.; GOLD, P. E. Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2881–2885, 2000.
- MENZEL R.; GIURFA M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 2, n. 2, p. 62–71, 2001.
- MENZEL, R. The Honeybee as a model for understanding the basis of cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v.13, p. 758-768, 2012.
- MENZEL, R.; ERBER, J. Learning and memory in bees. **Scientific American**, New York, v. 239, p. 80–87, 1978.
- MENZEL, R.; LÉBOULLE, G.; EISENHARDT, D. Small Brains, Bright Minds. **Cell**, Cambridge, v. 124, p. 237–239, 2006.
- MESSIER, C. Glucose improvement of memory: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, p. 33–57, 2004.
- MORRISON J. F. The Enzymes. **Ed. Boyer P. D.**, Academic Press, New York, v. 8, p. 457–486, 1973.
- MÜLLER, U. Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. **Neuron**, v. 16, p. 541–549, 1996.
- MÜLLER, U. Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. **Neuron**, v. 27, p. 159–168, 2000.
- MÜLLER, U. The Molecular Biology of Learning and Memory – Memory Phases and Signaling Cascades. In: **Honeybee neurobiology and Behavior**. Part VI, Chap. 6.7, p. 409-421, 2012.
- NGUYEN, P. V.; ABEL, T.; KANDEL, E. R. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. **Science**, vol. 265, n. 5175, p.1104–1107, 1994.
- NILSSON, A.; FEHNIGER, T. E.; GUSTAVSSON, L.; ANDERSSON, M.; KENNE, K.; MARKO-VARGA, G.; ANDREN, P. E. Fine Mapping the Spatial Distribution and Concentration of Unlabeled Drugs within Tissue Micro-Compartments Using Imaging Mass Spectrometry. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, e11411, 2010.
- NORRIS, J. L.; CAPRIOLI, R. M. Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research. **Chemical Reviews**, Washington, v. 113, p. 2309–2342, 2013.

- OLIVEIRA, D. N.; SARTOR, S. B.; FERREIRA, M. S.; CATHARINO, R. R. Cosmetic Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). **Materials**, v. 6, p. 1000–1010, 2013.
- OLIVER, D.; BAUKROWITZ, T.; FAKLER, B. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5824–5829, 2000.
- OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B., BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373–378, 1998.
- PAUL, V.; EKAMBARAM, P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 5, p. 471–478, 2011.
- PEDRIOLI, P. G.; ENG, J. K.; HUBLEY, R.; VOGELZANG, M.; DEUTSCH, E. W.; RAUGHT, B.; PRATT, B.; NILSSON, E.; ANGELETTI, R. H.; APWEILER, R.; CHEUNG, K.; COSTELLO, C. E.; HERMJAKOB, H.; HUANG, S.; JULIAN, R. K.; KAPP, E.; MCCOMB, M. E.; OLIVER, S. G.; OMENN, G.; PATON, N. W.; SIMPSON, R.; SMITH, R.; TAYLOR, C. F.; ZHU, W.; AEBERSOLD, R. A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. **Nature Biotechnology**, v. 22, n.11, p. 1459–1466, 2004.
- PEGG, A. E., McCANN, P. P. Polyamine metabolism and function. **American Journal of Physiology**, v. 243, n. 12, p. 212–221, 1982.
- PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; PAVETO, M. C.; IRIBARREN, A.; CABANAS, M. L.; TORRES, H. N.; FLAWIÁ, M. M. *Trypanosoma cruzi* Arginine Kinase Characterization and Cloning: a novel energetic pathway in protozoan parasites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 1495-1501, 2000.
- PIRMAN, D. A.; KISS, A.; HEEREN, R. M. A; YOST, R. A. Identifying Tissue-Specific Signal Variation in MALDI Mass Spectrometric Imaging by Use of an Internal Standard. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 1090–1096, 2013b.
- PIRMAN, D. A.; REICH, R. F.; KISS, A.; HEEREN, R. M. A.; YOST, R. A. Quantitative MALDI Tandem Mass Spectrometric Imaging of Cocaine from Brain Tissue with a Deuterated Internal Standard. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 1081–1089, 2013a.
- PIRMAN, D. A.; YOST, R. A. Quantitative tandem mass spectrometric imaging of endogenous acetyl-L-carnitine from piglet brain tissue using an internal standard. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 8575–8581, 2011.
- PLECH, A.; KLIMKIEWICZ, T.; MAKSYM, B. Effect of l-arginine on memory in rats. **Polish journal of pharmacology and pharmacy**, v. 55, p. 987–992, 2003.
- PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 51–68, 2001.

PRATAVIEIRA, M.; MENEGASSO, A. R. S.; GARCIA, A. M. C.; DOS SANTOS, D. S.; GOMES, P. C.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. MALDI Imaging Analysis of Neuropeptides in the Africanized Honeybee (*Apis mellifera*) Brain: Effect of Ontogeny. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 3054–3064, 2014.

RAAD, M.; FISCHER, C. R.; NORTHEN, T. R. High-throughput platforms for metabolomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 30, p. 7–13, 2016.

RAE, C.; DIGNEY, A. L.; MCEWAN, S. R.; BATES, T. C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 2147–2150, 2003.

ROBICHAUD, G.; GARRARD, K. P.; BARRY, J. A.; MUDDIMAN, D. C. MSiReader: An Open-Source Interface to View and Analyze High Resolving Power MS Imaging Files on Matlab Platform, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 5, p. 718–721, 2013.

ROGERS, L. J.; VALLORTIGARA, G. From antenna to antenna: lateral shift of olfactory memory in honeybees. **PLoS ONE**, v. 3, e2340, 2008.

ROGERS, L. J.; VALLORTIGARA, G.; ANDREW, R. J. Divided brains the biology and behaviour of brain asymmetries. New York, NY: **Cambridge University Press**, 2013.

ROHNER, T. C.; STAAB, D.; STOECKLI, M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p.177–85, 2005.

ROJE, S. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. **Phytochemistry**, n. 67, v. 15, p. 1686–1698, 2006.

RÖMPP, A. S. T.; HESTER, A.; KLINKERT, I.; HEEREN, R., STÖCKLI M, BOTH, J. -P.; BRUNELLE, A.; SPENGLER, B. Imaging mzML (imzML) — a common data format for imaging mass spectrometry. Em: Hamacher, M.; Stephan, C.; Eisenacher, M. Editores. Data mining in proteomics. **Methods in molecular biology**, New York: Humana Press; pp. 205–224, 2010.

RÖMPP, A.; SCHRAMM, T.; HESTER, A.; KLINKERT, I.; BOTH, J. -P.; HEEREN, R. M. A.; STÖCKLI, M.; SPENGLER, B. imzML: Imaging Mass Spectrometry Markup Language: a common data format for mass spectrometry imaging. **Methods in Molecular Biology**, v. 696, p. 205–224, 2011

RUBIN, M. A.; JURACH, A.; COSTA, E. M.; LIMA, T. T.; JIMENEZ BERNAL, R. E.; BEGNINI, J.; SOUZA, D. O.; MELLO, C. F. GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats, **NeuroReport**, v. 7, p. 2078–2080, 1996.

RUZZO, E. K.; CHICHI, J. M. C.; ZEEV, B. B.; CHITAYAT, D.; et al. Deficiency of asparagine synthetase causes congenital microcephaly and a progressive form of encephalopathy. **Neuron**, v. 80, n.2, p. 429–441, 2013.

- SACHSE, S.; GALIZIA, G. C. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. **Journal of Neurophysiology**, vol. 87, p. 1106–1117, 2002.
- SANCHEZ, J. C.; CORTHALS, G. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Biomedical Applications of Proteomics. Wiley-vch Verlag; Gmbh Weinheim: p. 373, 2004.
- SANDOZ, J. C. Olfaction in Honey Bees: From Molecules to Behavior. Em: **Honeybee Neurobiology and Behavior**. Ed. Springer, Parte IV, Cap. 4.1, p. 235-252, 2012.
- SANTOS, K. S.; DOS SANTOS, L. D.; MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35 n. 1, p. 85–91, 2005.
- SASAKI, K.; NAGAO, T. Distribution and levels of dopamine and its metabolites in brains of reproductive workers in honeybees. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 1205–1216, 2001.
- SASE, A.; DAHANAYAKA, S.; HÖGER, H.; WU, G. LUBEC, G. Changes of hippocampal beta-alanine and citrulline levels are paralleling early and late phase of retrieval in the Morris Water Maze. **Behavioural Brain Research**, v. 249, p. 104–108, 2013.
- SATTELLE, D. B.; BUCKINGHAM, S.D. Invertebrate studies and their ongoing contributions to neuroscience. **Invertebrate Neuroscience**, v. 6, n.1. p. 1–3, 2006.
- SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 579, p. 1332–1337, 2005.
- SCHEINER, R.; BAUMANN, A.; BLENAU, W. Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. **Current Neuropharmacology**, vol. 4, p. 259–276, 2006.
- SCHELL, M. J. The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 359, p. 943–964, 2004.
- SCHRAMM, T.; HESTER, A.; KLINKERT, I.; BOTH, J. -P.; HEEREN, R. M. A.; BRUNELLE, A.; LAPRÉVOTE, O.; DESBENOIT, N.; ROBBE M. -F.; STOECKLI, M.; SPENGLER, B.; RÖMPP, A. imzML - A common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 16, p. 5106-5110, 2012.
- SCHWAMBORN, K.; CAPRIOLI, R. M. Molecular imaging by mass spectrometry - looking beyond classical histology. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 10, p. 639–646, 2010.

SCHWEITZER, L.; ROBBINS, A. J.; SLOTKIN, T. A. Dendritic development of Purkinje and granule cells in the cerebellar cortex of rats treated postnatally with alpha-difluoromethylornithine. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 48, p. 11–22, 1989.

SHANTZ, L. M.; PEGG, A. E. Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 107–122, 1999.

SHAPIRA, M.; THOMPSON, C. K.; SOREQ, H.; ROBINSON, G. E. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2001.

SIMCOCK, N. K.; GRAY, H. E.; WRIGHT, G. A. Single amino acids in sucrose rewards modulate feeding and associative learning in the honeybee. **Journal of Insect Physiology**, v. 69, p.41–48, 2014.

SLOW, S.; LEVER, M.; CHAMBERS, S. T.; GEORGE, P. M. Plasma Dependent and Independent Accumulation of Betaine in Male and Female Rat Tissues. **Physiological Research**, v. 58, p. 403–410, 2009.

SODA, K.; MORIGUCHI, M. Crystalline lysine decarboxylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 34, n. 1, p. 34–39, 1969.

SPRONG, H.; DEGROOTE, S.; NILSSON, T.; KAWAKITA, M.; ISHIDA, N.; van DER SLUIJS, P.; van MEER, G. Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 3482–3493, 2003.

SRIVENUGOPAL, K. S.; ADIGA P. R. Enzymic conversion of agmatine to putrescine in *Lathyrus sativus* seedlings - Purification and properties of a multifunctional enzyme (putrescine synthase). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n.18 p. 9532–9541, 1981.

STOCKLER, S.; HOLZBACH, U.; HANEFELD, F.; MARQUARDT, I.; HELMS, G.; REQUART, M.; HANICKE, W.; FRAHM, J. Creatine Deficiency in the Brain: A New, Treatable Inborn Error of Metabolism. **Pediatric Research**, v. 36, n.3, 409–413, 1994.

STOECKLI, M.; STAAB, D.; SCHWEITZER, A. Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 260, p. 195–202, 2007.

STOECKLI, M.; STAAB, D.; STAUFENBIEL, M.; WIEDERHOLD, K. H.; SIGNOR, L. Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 33–39, 2002.

STOPFER, M.; BHAGAVAN, S.; SMITH, B. H.; LAURENT, G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. **Nature**, vol. 390, n. 6655, p. 70–74, 1997.

STOYANOVSKY, D. A.; SPARVERO, L. J.; AMOSCATO, A. A.; HE, R. R.; WATKINS, S.; PITT, B. R.; BAYIR, H.; V. E. KAGAN, V. E. Improved spatial resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of lipids in the brain by alkylated derivatives of 2,5-dihydroxybenzoic acid. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n. 28, p. 403–412, 2014.

STRAMBI, C.; FAURE, P.; RENUCCI, M.; CHARPIN, P.; AUGIER, R.; TIRARD, A.; STRAMBI, A. Tissue-Specific Changes in Polyamine Levels of Neural Tissue and Fat Body in Adult Crickets. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 24, p. 203–217, 1993.

SUGIURA, Y.; TAGUCHI, R.; SETOU, M. Visualization of Spatiotemporal Energy Dynamics of Hippocampal Neurons by Mass Spectrometry during a Kainate-Induced Seizure. **PLoS One**, v. 6, e17952, 2011.

SZEPESI, G. HPLC in pharmaceutical analysis. Boston: **CRC Press**, v.1, p. 49–65, 1990.

TSUCHIMOTO, M.; AOKI, M.; TAKADA, M.; KANOU, Y.; SASAGAWA, H.; KITAGAWA, Y.; KADOWAKI, T. The changes of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. **Zoological Science**, v. 21, n. 1, p. 23–28, 2004.

UNO, Y.; FUJIYUKI, T.; MORIOKA, M.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Identification of proteins whose expression is up- or down-regulated in the mushroom bodies in the honeybee brain using proteomics. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 581 n. 1, p. 97–101, 2007.

VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L. J. Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 28, p. 575–589, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613–646, 2005.

VON FRISCH, K. Über den Geruchsinne der Biene und seine blütenbiologische Bedeutung. **Zoologisches Jahrbuch Teil Physiologie**, v. 37, p. 1–238, 1919.

WANG, T. L.; WU, C. F.; YANG, J. Y.; WANG, F.; SONG, W. Effect of morphine on brain uracil release in mouse striatum detected by microdialysis. **Neuroscience letters**, v. 457, p. 89–92, 2009.

WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; SMITH, C. A.; BRANDON, T. R.; URITBOONTHAI, W.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; SIUZDAK, G. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 743–752, 2006.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, n. 325, p. 289–297, 1997.

WOLOSKER, H.; DUMIN, E.; BALAN, L.; FOLTYN, V. N. D-Amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. **FEBS Journal**, v. 275, p. 3514–3526, 2008.

WU, C.; DILL, A. L.; EBERLIN, L.S.; COOKS, R.G.; IFA, D.R. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 32, p. 218–243, 2013.

YE, H.; GEMPERLINE, E.; VENKATESHWARAN, M.; CHEN, R.; DELAUX, P. M.; HOWES-PODOLL, M.; ANÉ, J. M.; LI, L. MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium melilotis* symbiosis. **The Plant Journal**, v. 75, n. 1, p. 130–145, 2013c.

YE, H.; HUI, L.; KELLERSBERGER, K.; LI, L. Mapping of Neuropeptides in the Crustacean Stomatogastric Nervous System by Imaging Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, p. 134–147, 2013a.

YE, H.; WANG, J.; GREER, T.; STRUPAT, K.; LI, L. Visualizing Neurotransmitters and Metabolites in the Central Nervous System by High Resolution and High Accuracy Mass Spectrometric Imaging. **ACS Chemical Neuroscience**, n. 4, p. 1049–1056, 2013b.

YILDIRIM, M.; MARANGOZ, C. Effects of nitric oxide on passive avoidance learning in rats. **International Journal of Neuroscience**, v. 114, p. 597–606, 2004.

ZHOU, Y.; HOLMSETH, S.; HUA, R.; LEHRE, A. C.; OLOFSSON, A. M.; POBLETE-NAREDO, I.; KEMPSON, S. A. The betaine-GABA transporter (BGT1, slc6a12) is predominantly expressed in the liver and at lower levels in the kidneys and at the brain surface. **American Journal of Physiology**, v. 302, p. 316–328, 2012.

## **ANEXO I**

### **CURVAS DE CALIBRAÇÃO**

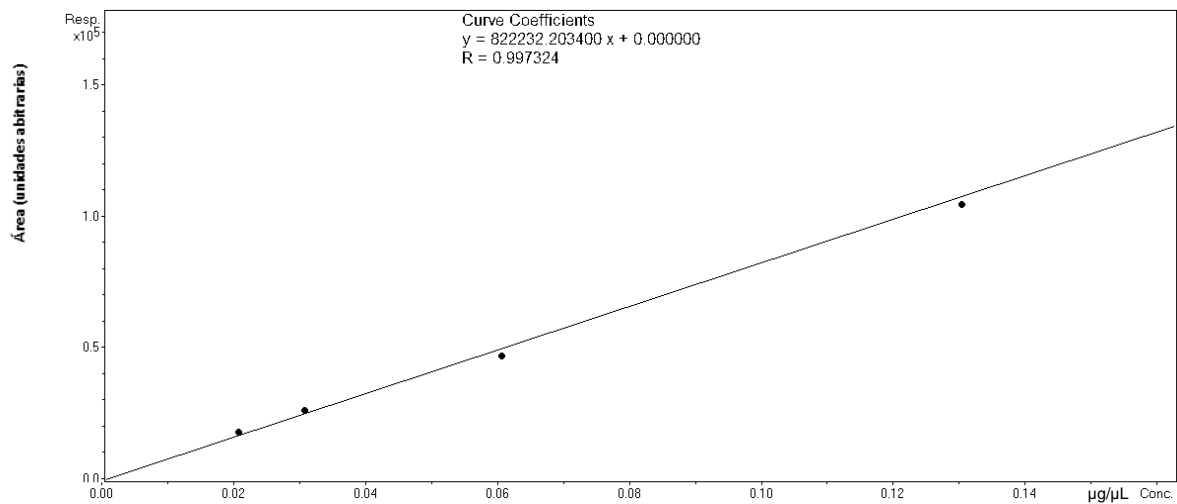


Figura S1. Curva de calibração obtida para o composto 1,3-diaminopropano.

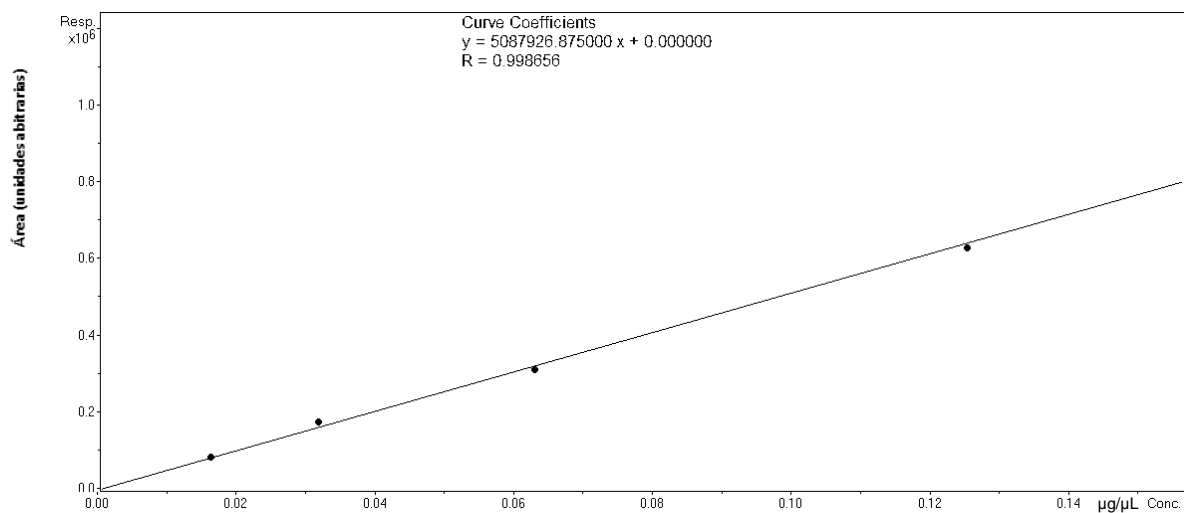


Figura S2. Curva de calibração obtida para o composto 2-feniletilamina.

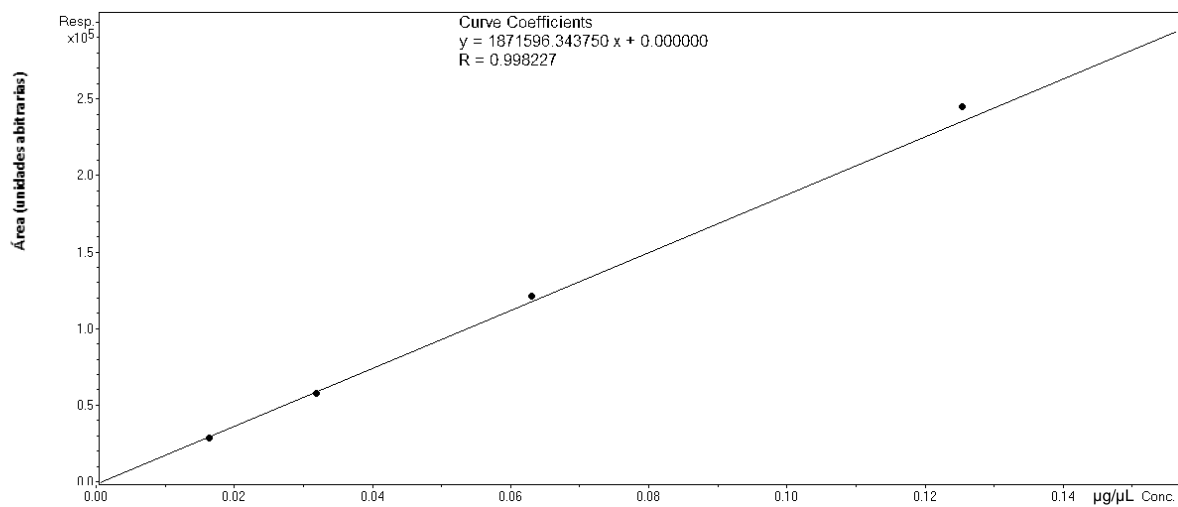


Figura S3. Curva de calibração obtida para o composto ácido ascórbico.

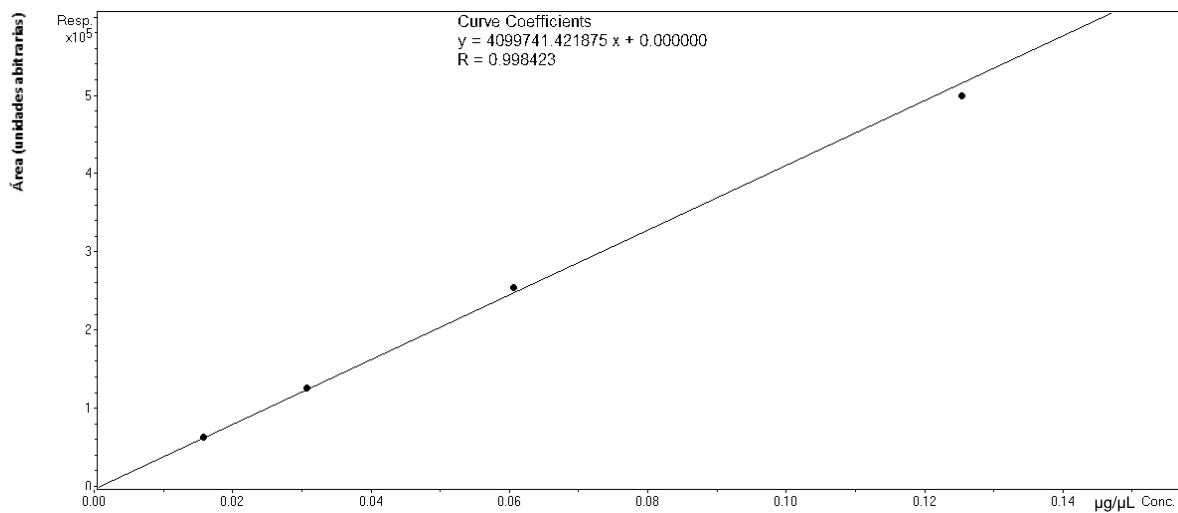


Figura S4. Curva de calibração obtida para o composto ácido aspártico.

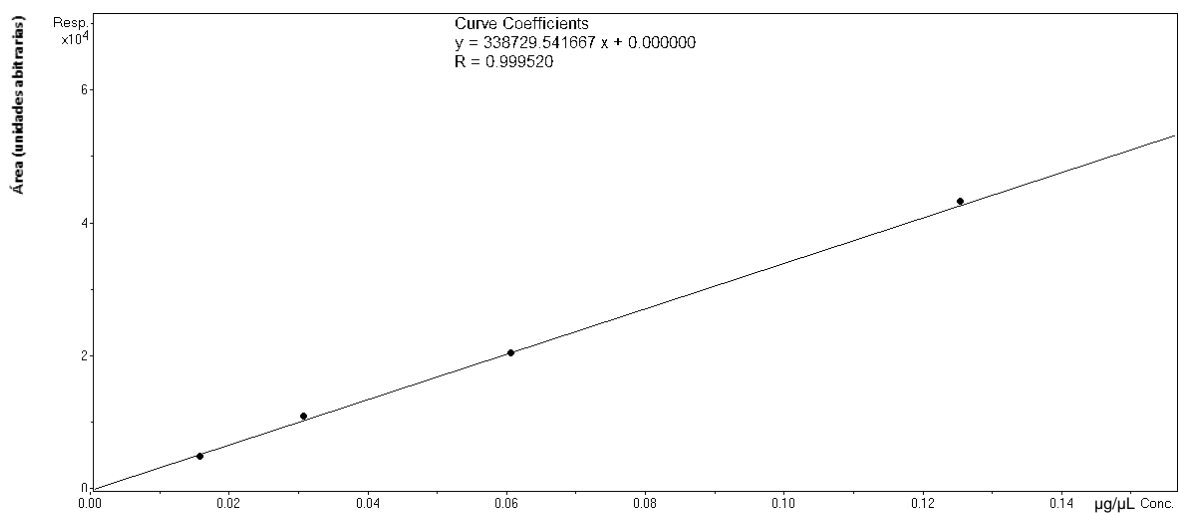


Figura S5. Curva de calibração obtida para o composto ácido caféico.

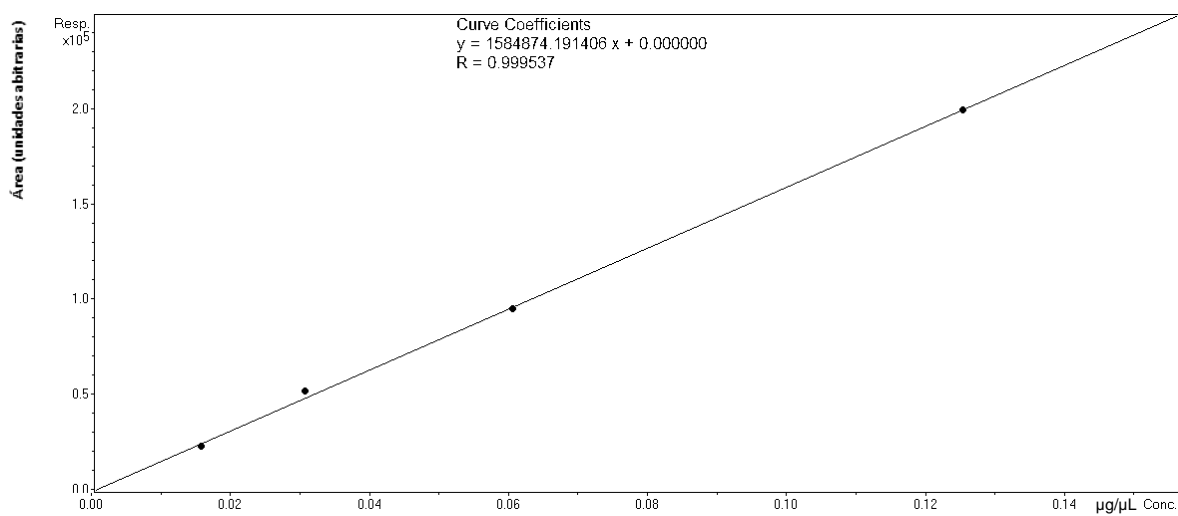
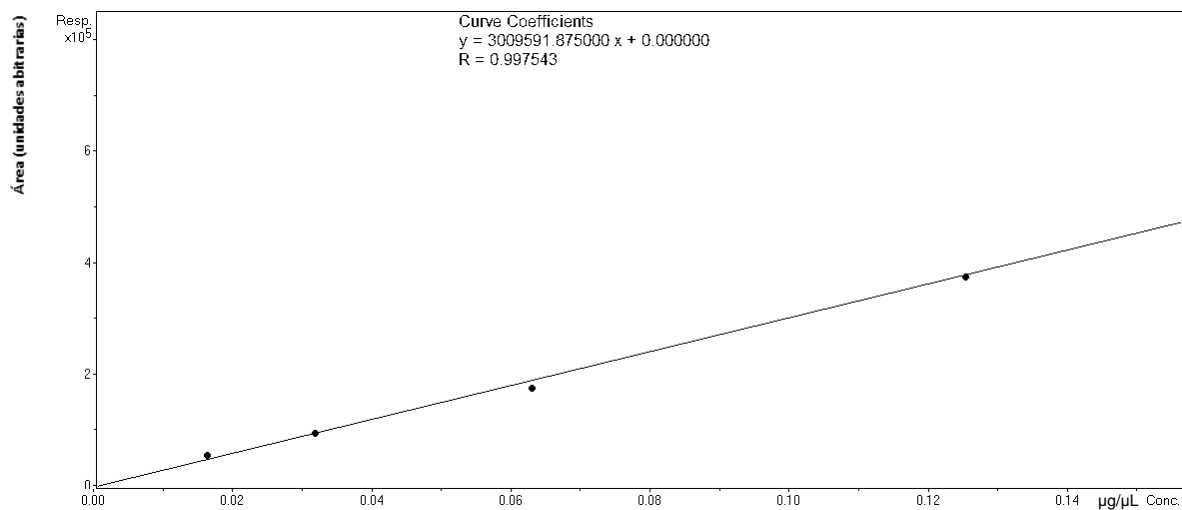
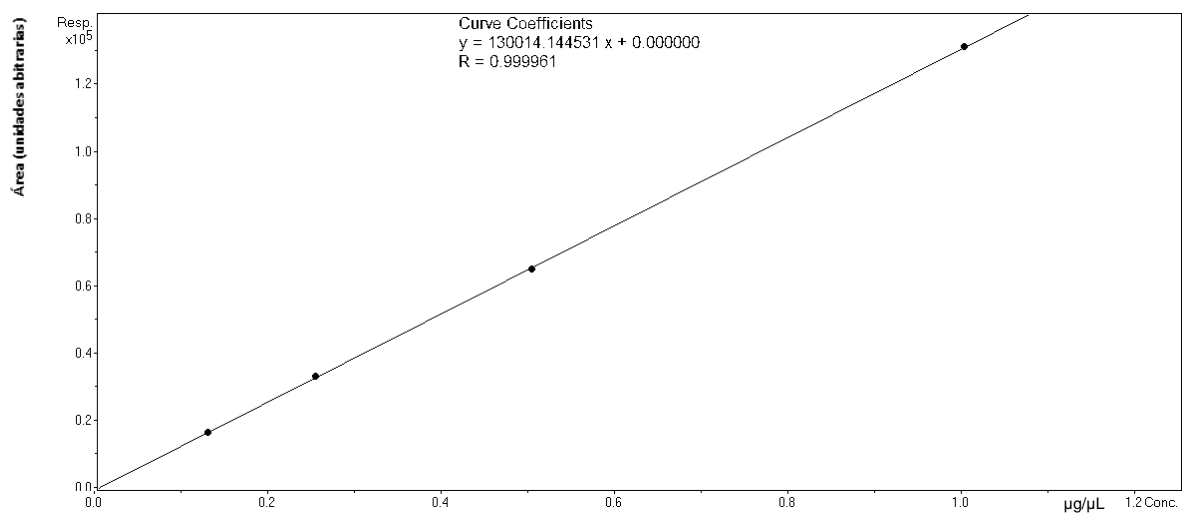


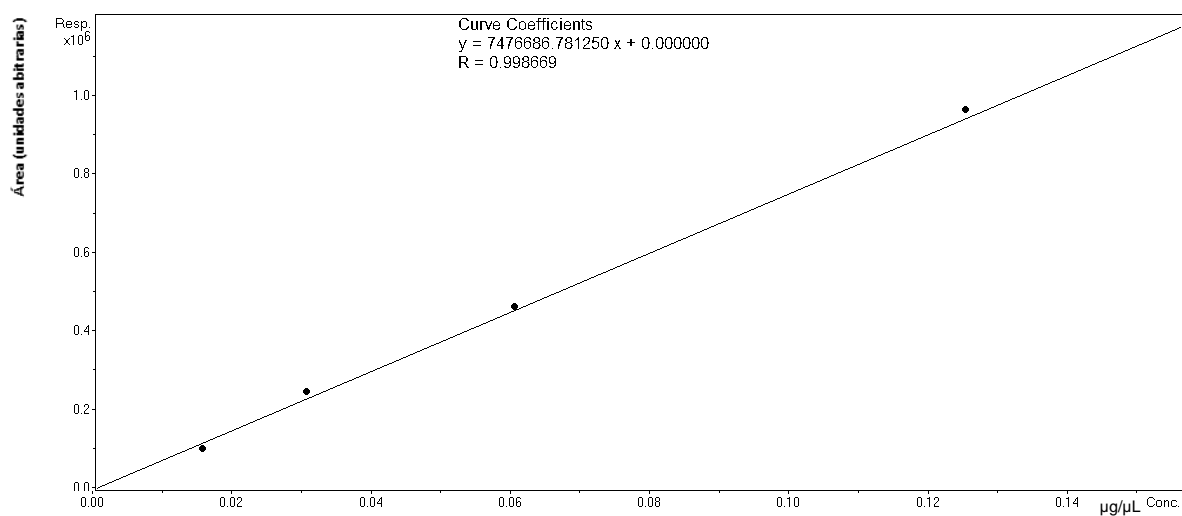
Figura S6. Curva de calibração obtida para o composto ácido cistéico.



**Figura S7.** Curva de calibração obtida para o composto ácido glutâmico.



**Figura S8.** Curva de calibração para o composto ácido 3,4-hidroxifenilacético.



**Figura S9.** Curva de calibração obtida para o composto ácido 4-hidroxifenilacético.

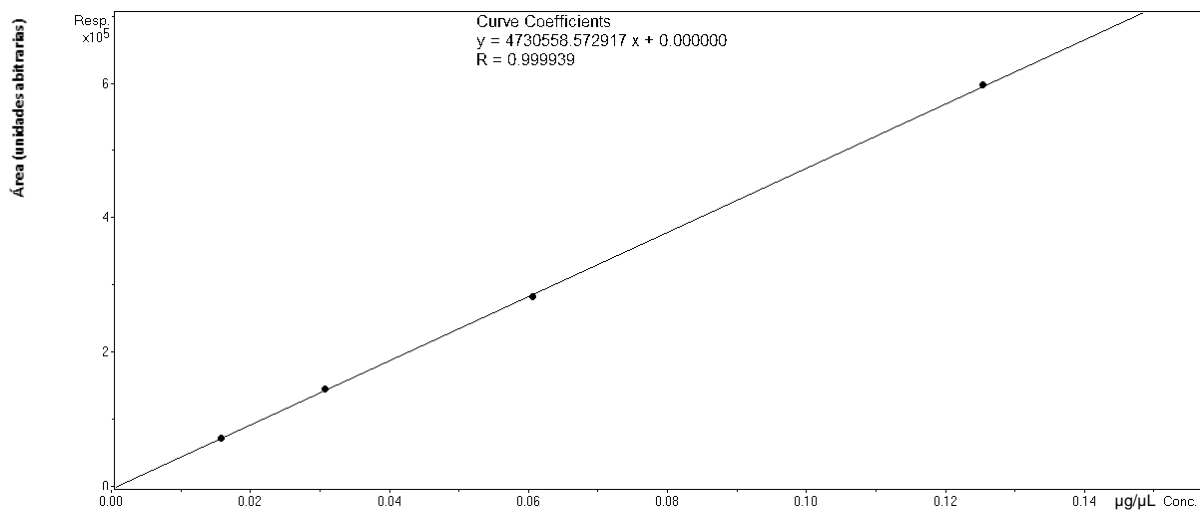


Figura S10. Curva de calibração obtida para o composto ácido 5-hidroxiindolacético.

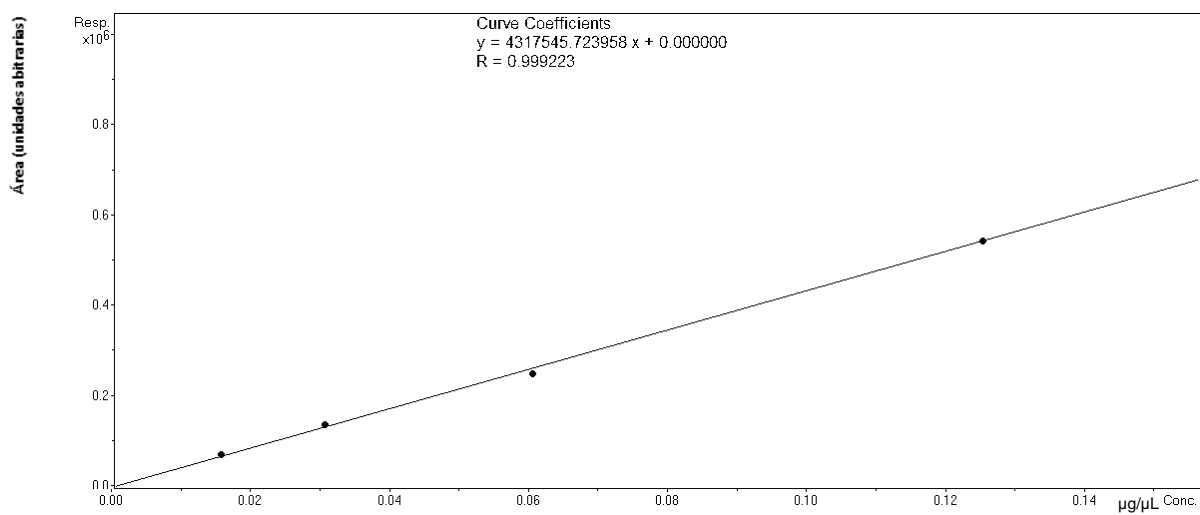


Figura S11. Curva de calibração obtida para o composto ácido indolacético.

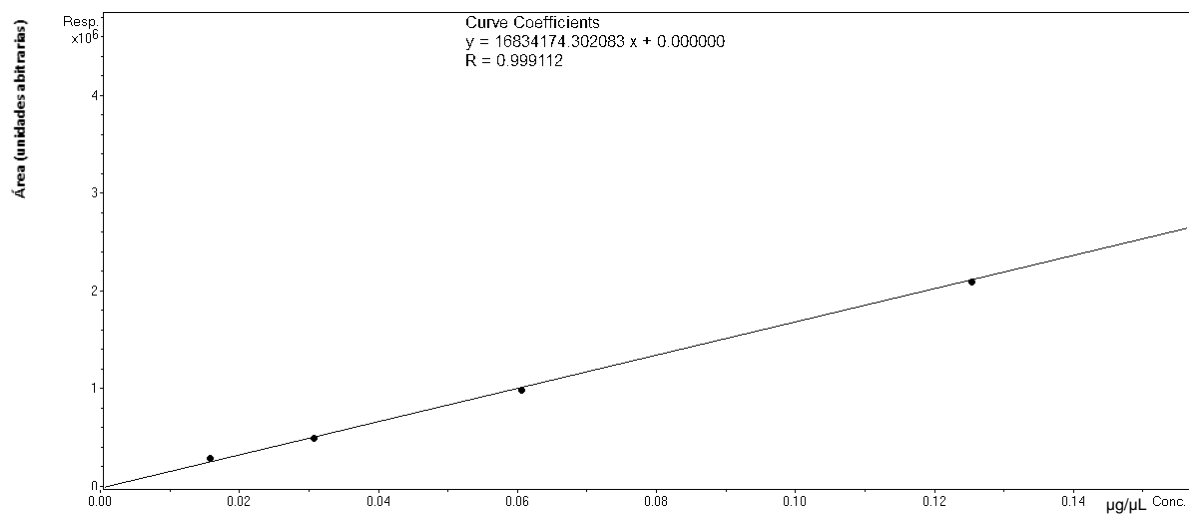


Figura S12. Curva de calibração obtida para o composto ácido cáfnico.

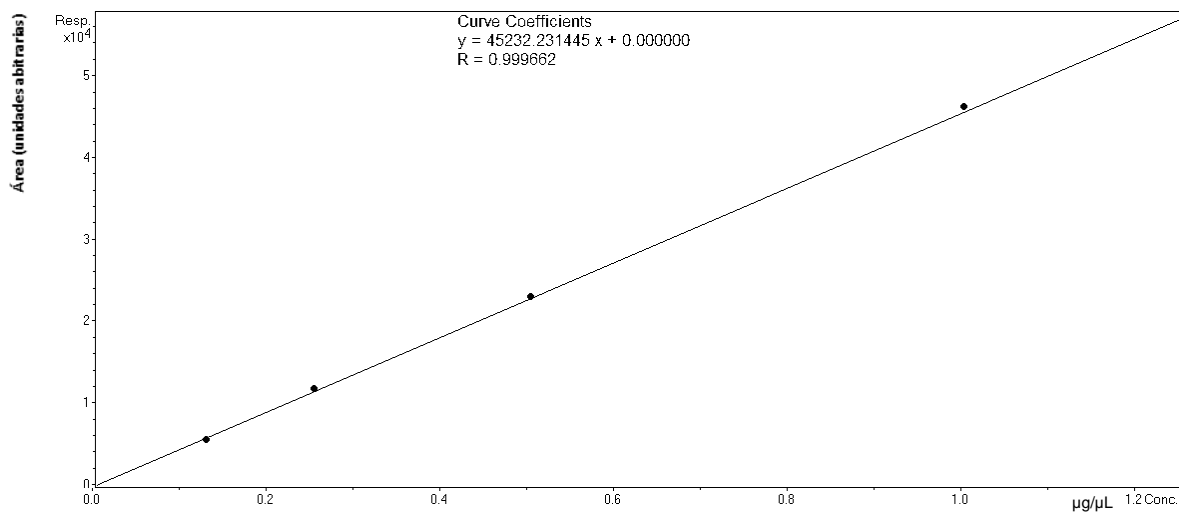


Figura S13. Curva de calibração obtida para o composto ácido maléico.

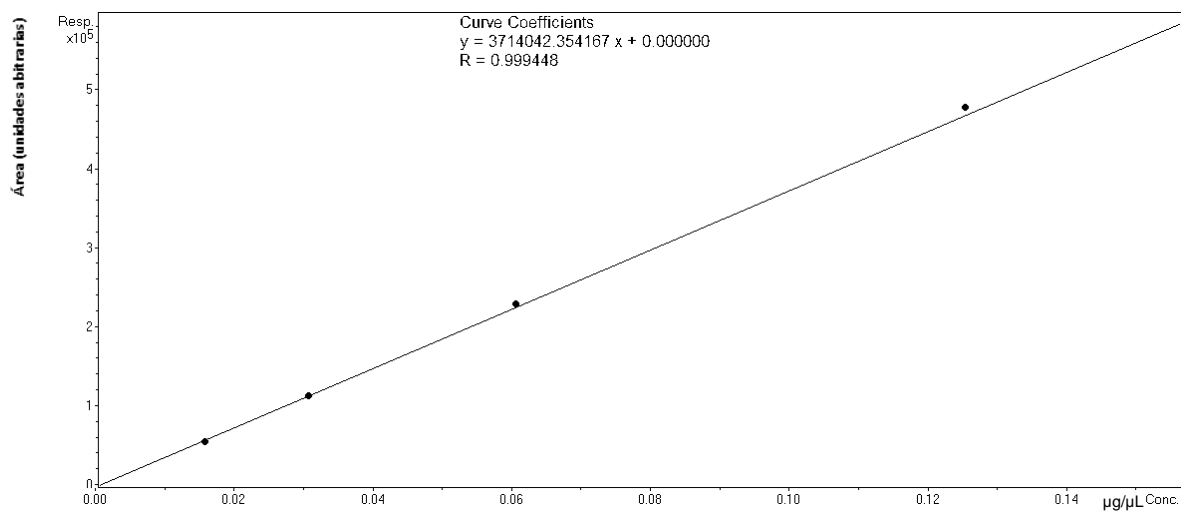


Figura S14. Curva de calibração obtida para o composto adenosina difosfato.

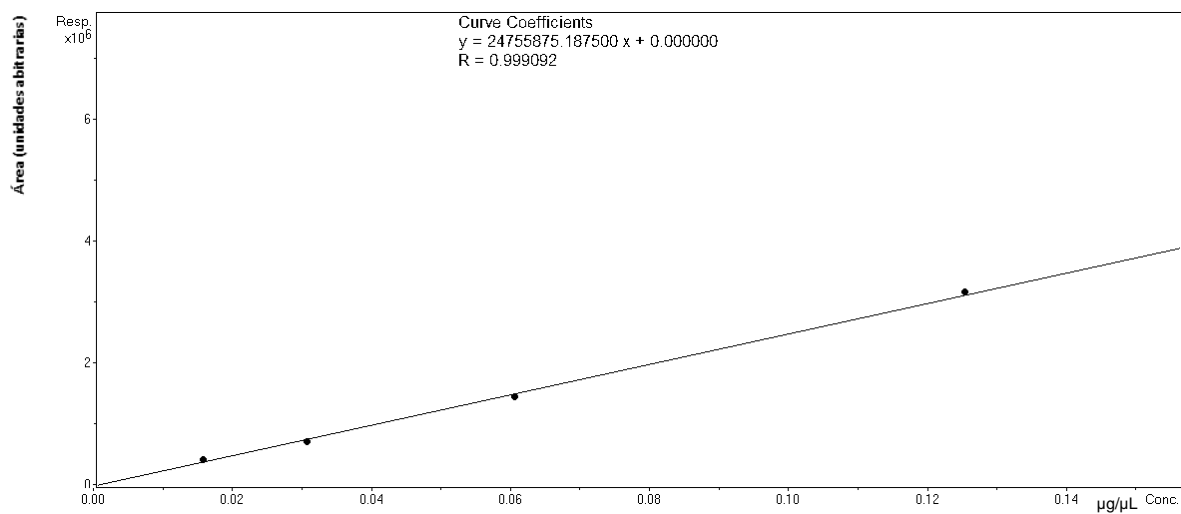


Figura S15. Curva de calibração obtida para o composto adenina.

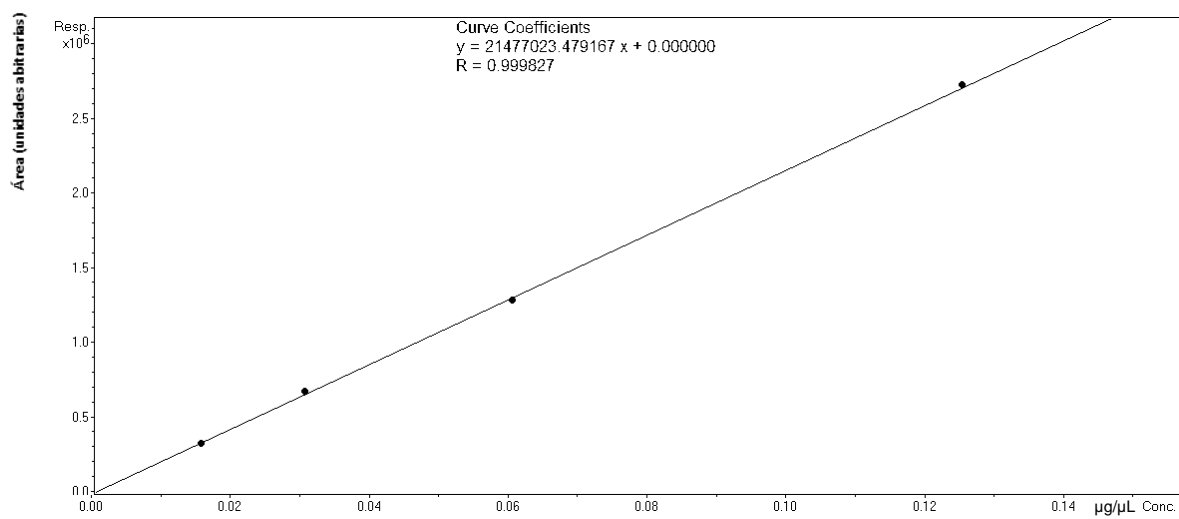


Figura S16. Curva de calibração obtida para o composto adenosina monofosfato cíclica.

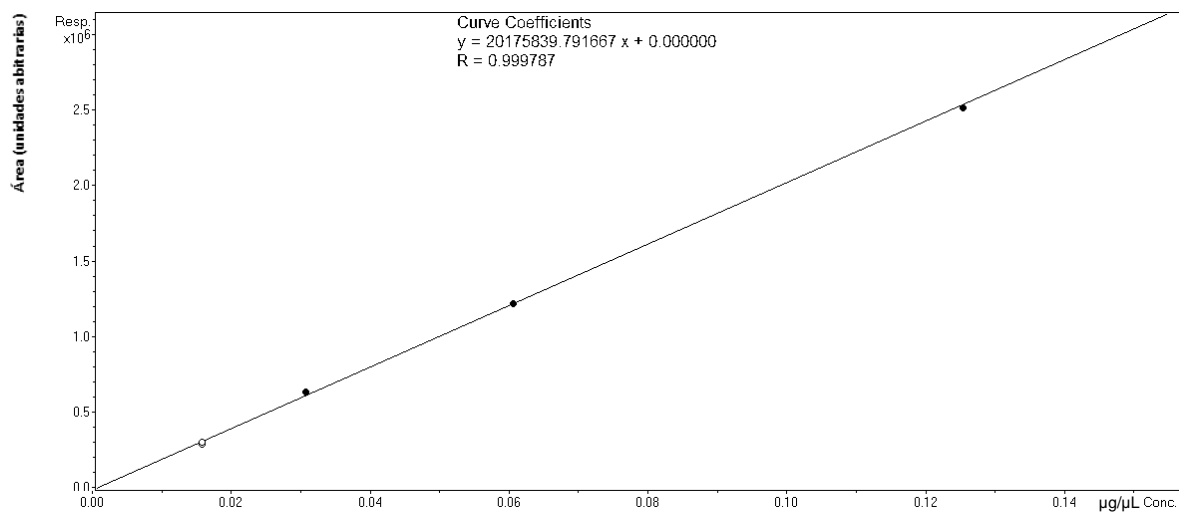


Figura S17. Curva de calibração obtida para o composto adenosina 5-monofosfato.

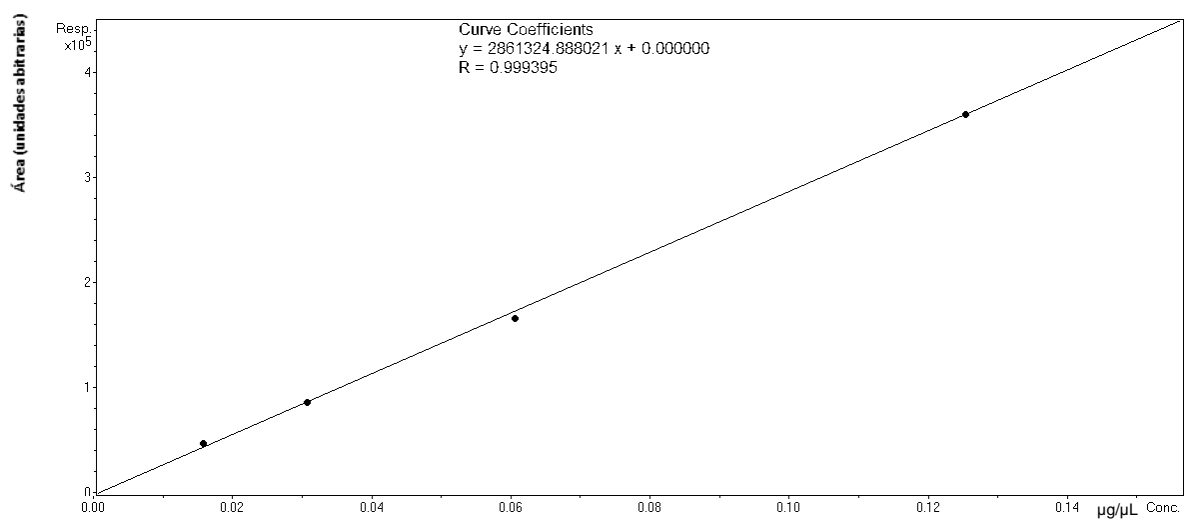


Figura S18. Curva de calibração obtida para o composto adenosina.

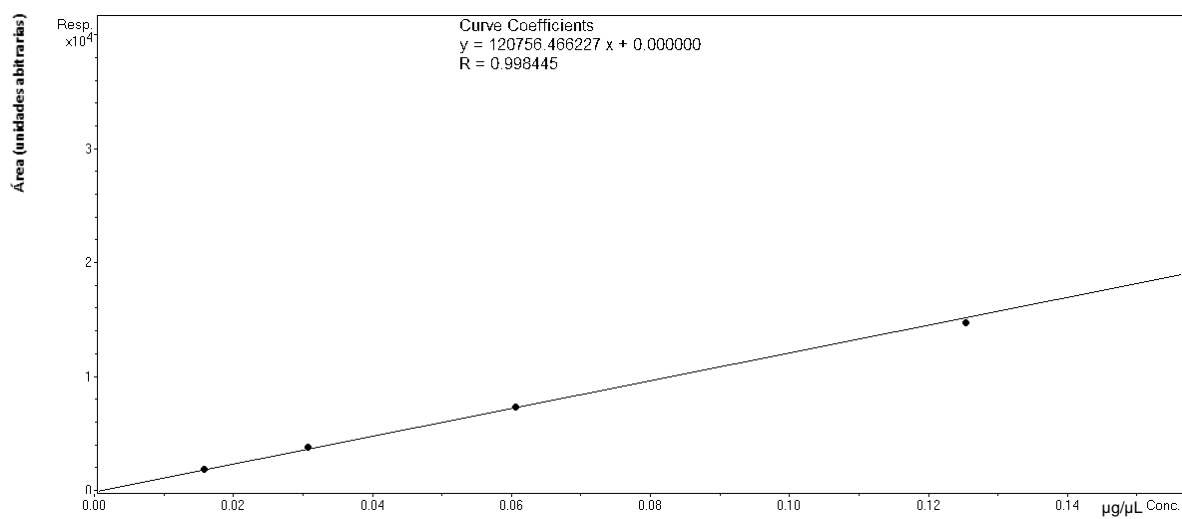


Figura S19. Curva de calibração obtida para o composto alanina.

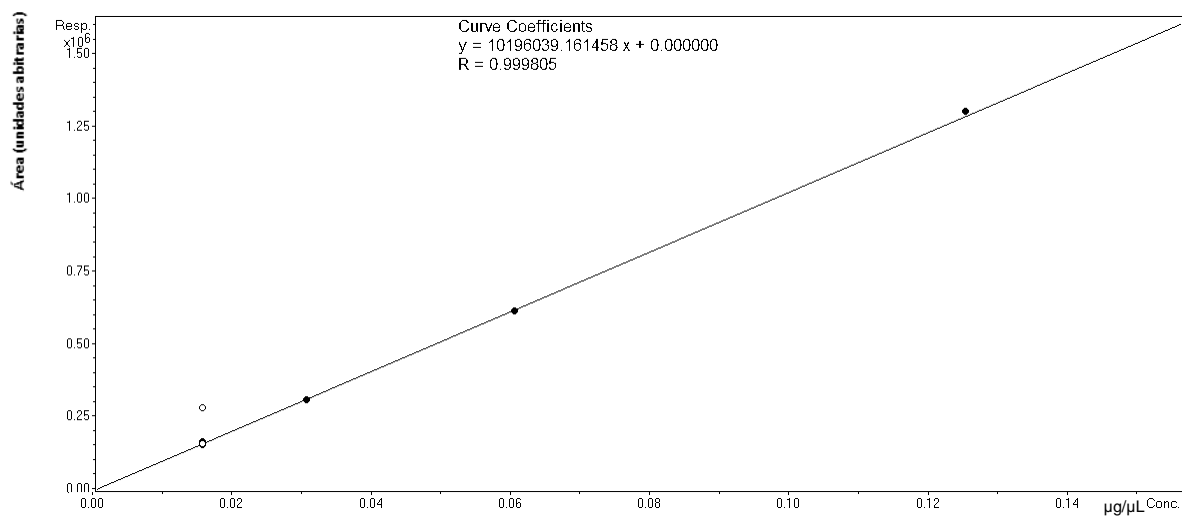


Figura S20. Curva de calibração obtida para o composto arginina.

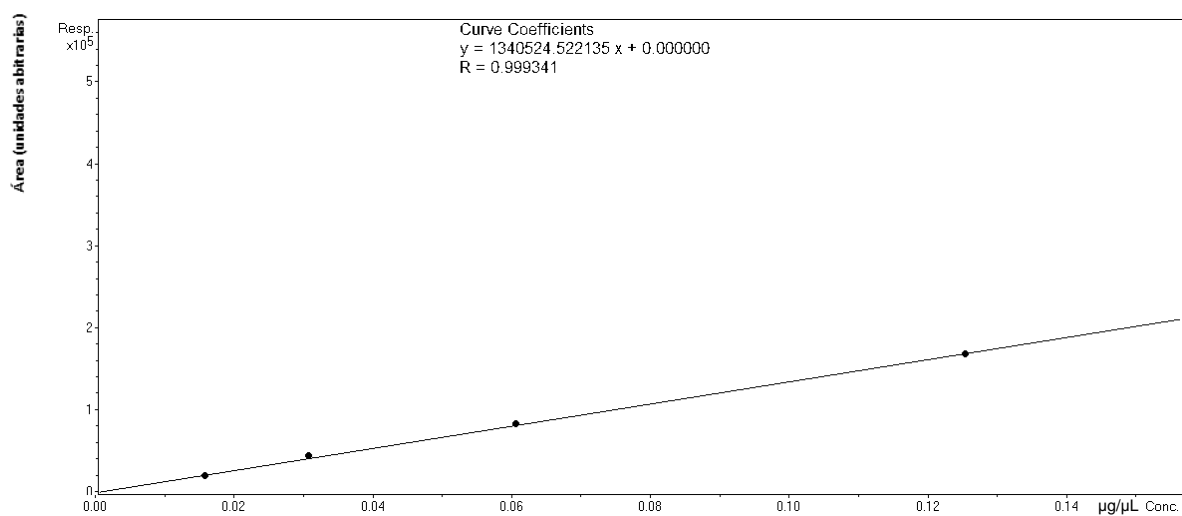


Figura S21. Curva de calibração obtida para o composto asparagina.

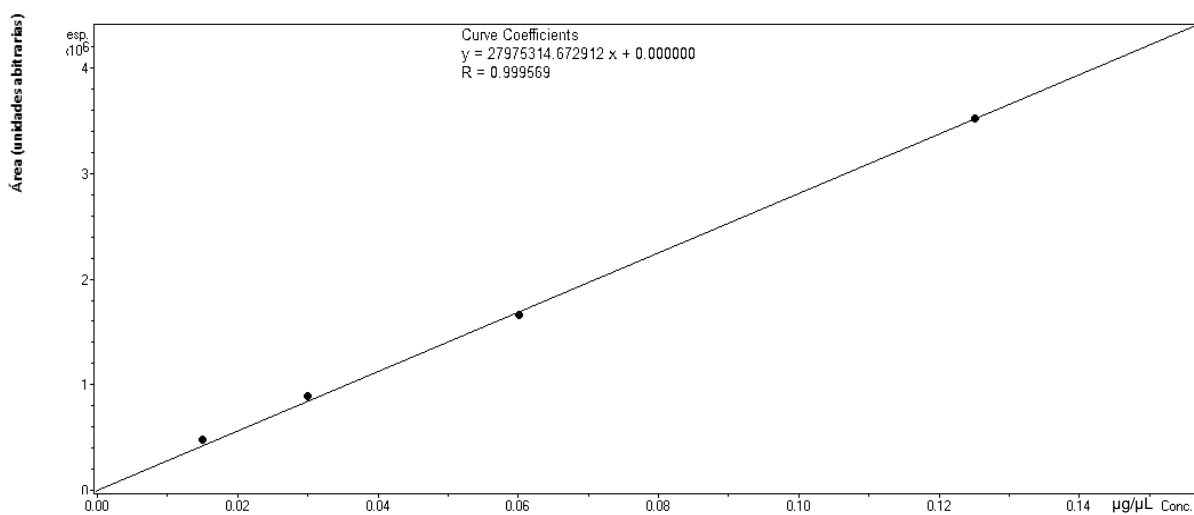


Figura S22. Curva de calibração obtida para o composto betaína.

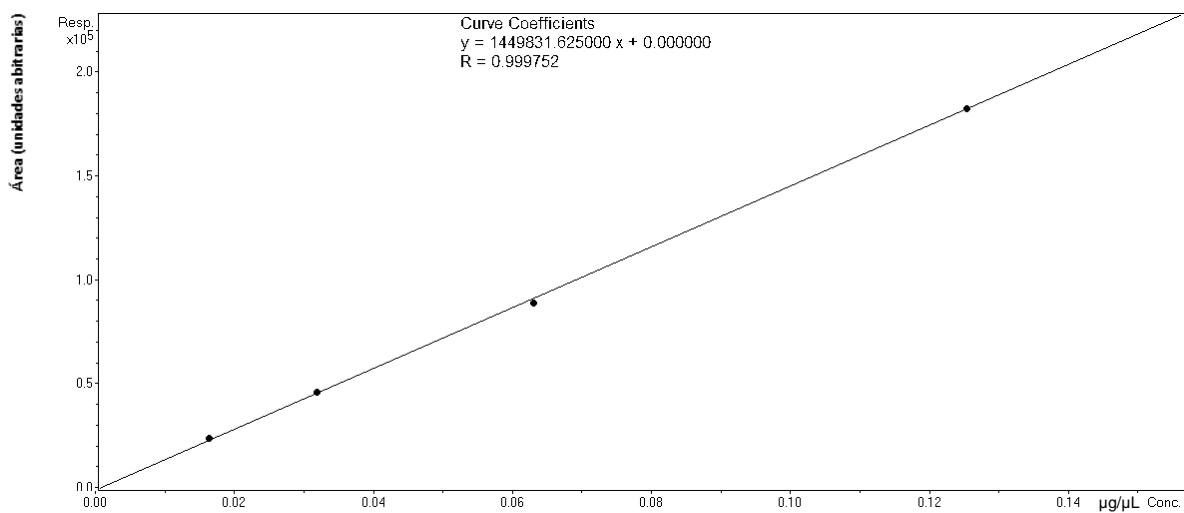


Figura S23. Curva de calibração obtida para o composto cadaverina.

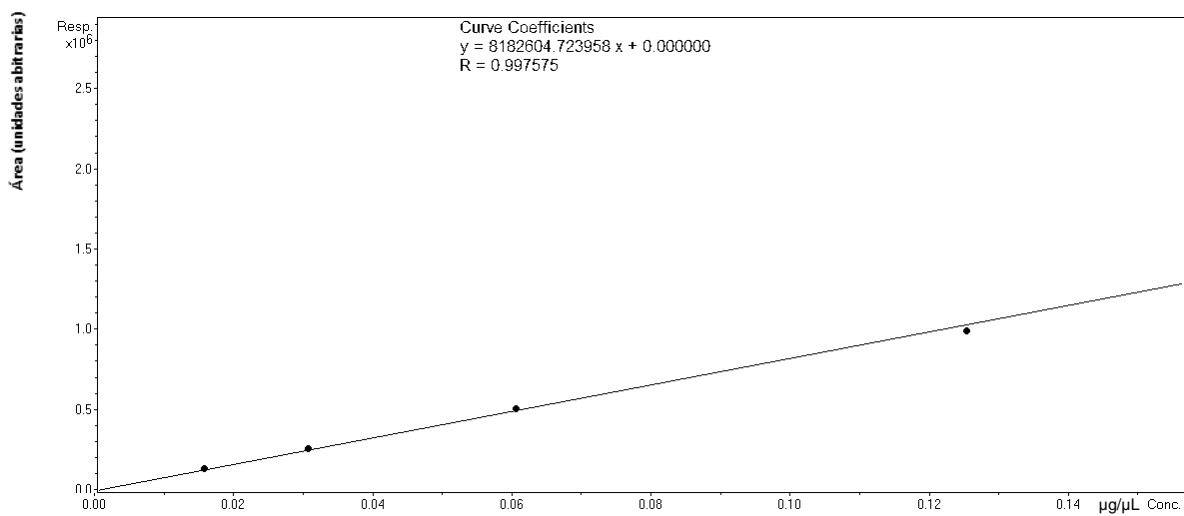


Figura S24. Curva de calibração obtida para o composto citosina.

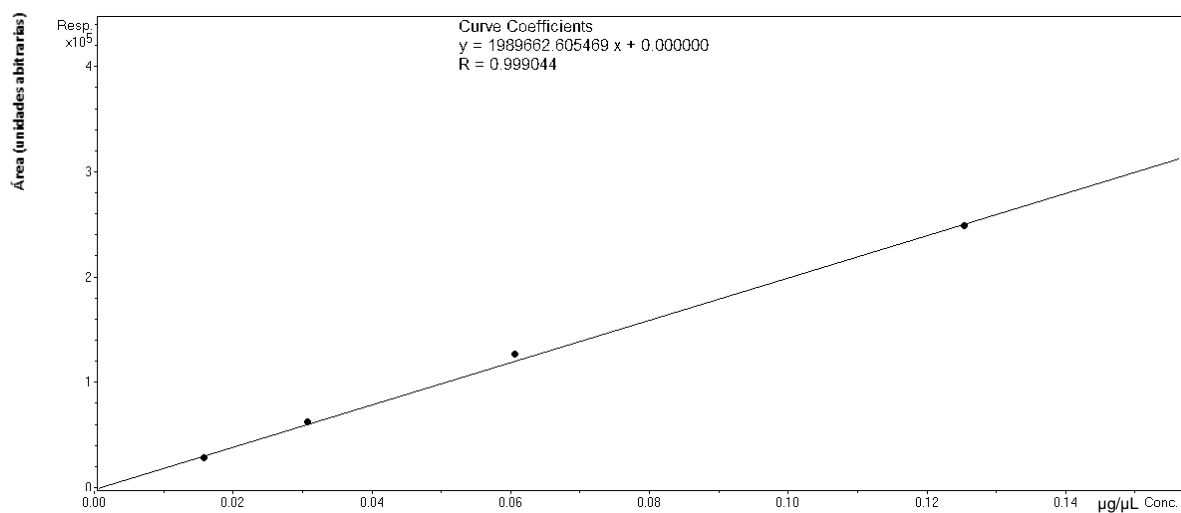


Figura S25. Curva de calibração obtida para o composto dopamina.

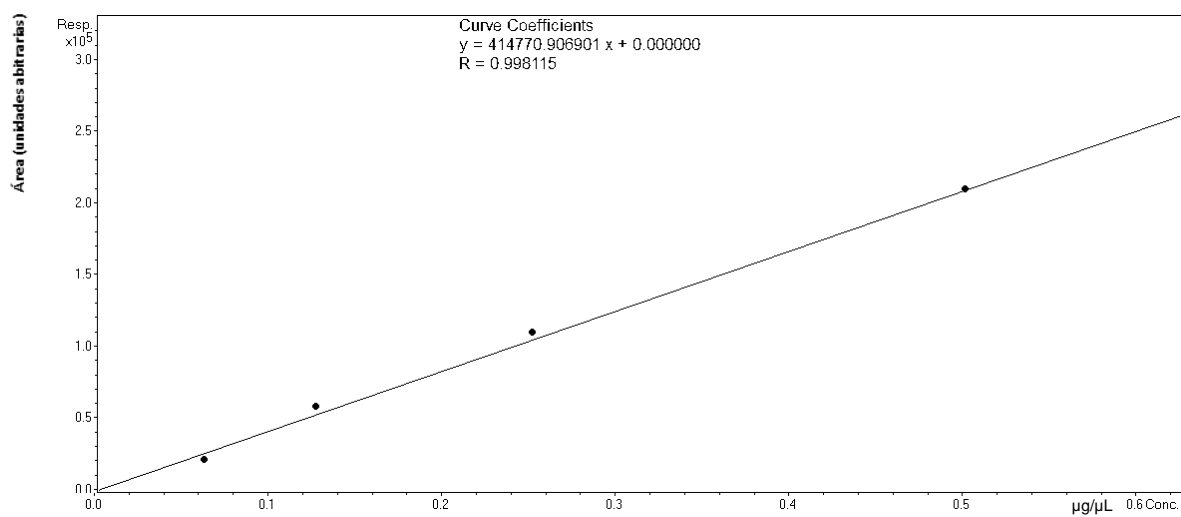


Figura S26. Curva de calibração obtida para o composto epinefrina.

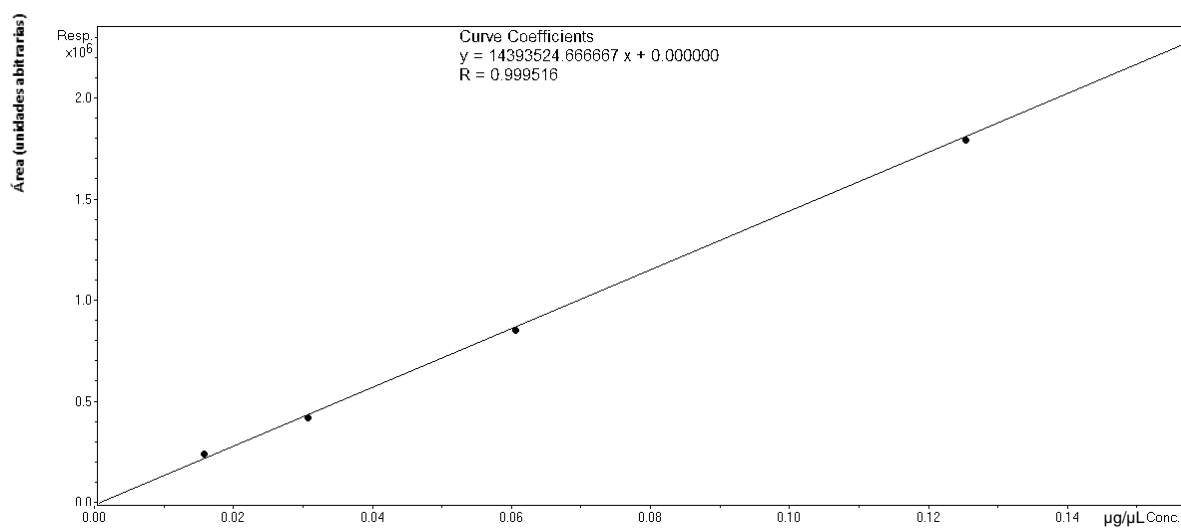


Figura S27. Curva de calibração obtida para o composto espermidina.

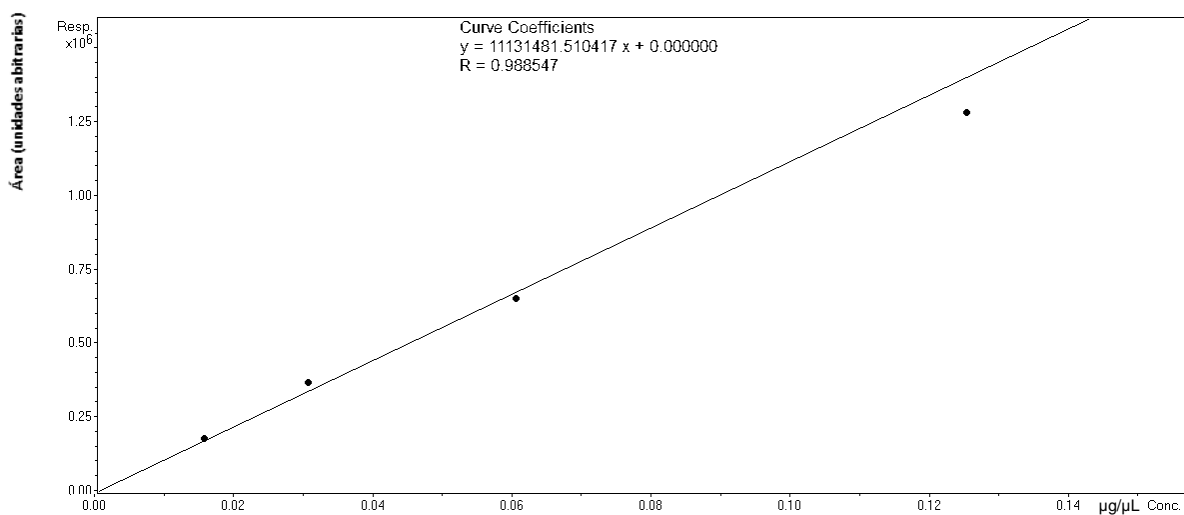


Figura S28. Curva de calibração obtida para o composto espermina.

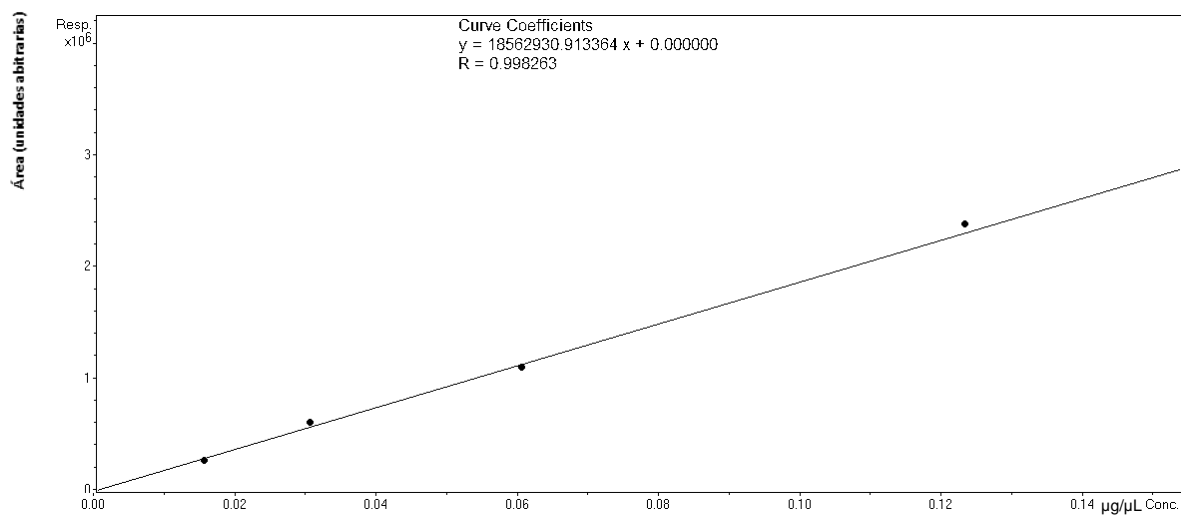


Figura S29. Curva de calibração obtida para o composto fenilalanina.

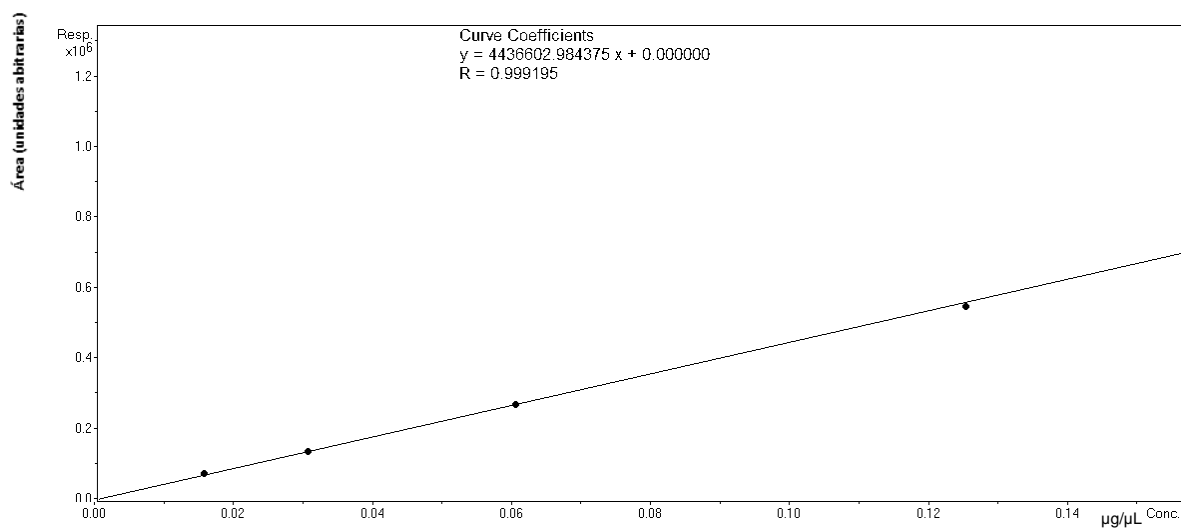


Figura S30. Curva de calibração obtida para o composto GABA.

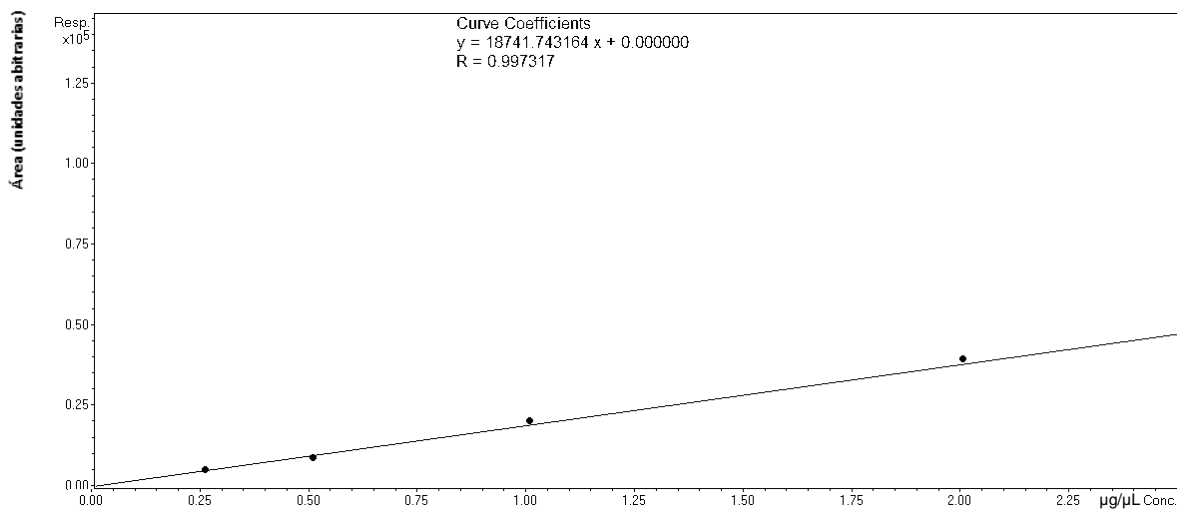


Figura S31. Curva de calibração obtida para o composto glicina.

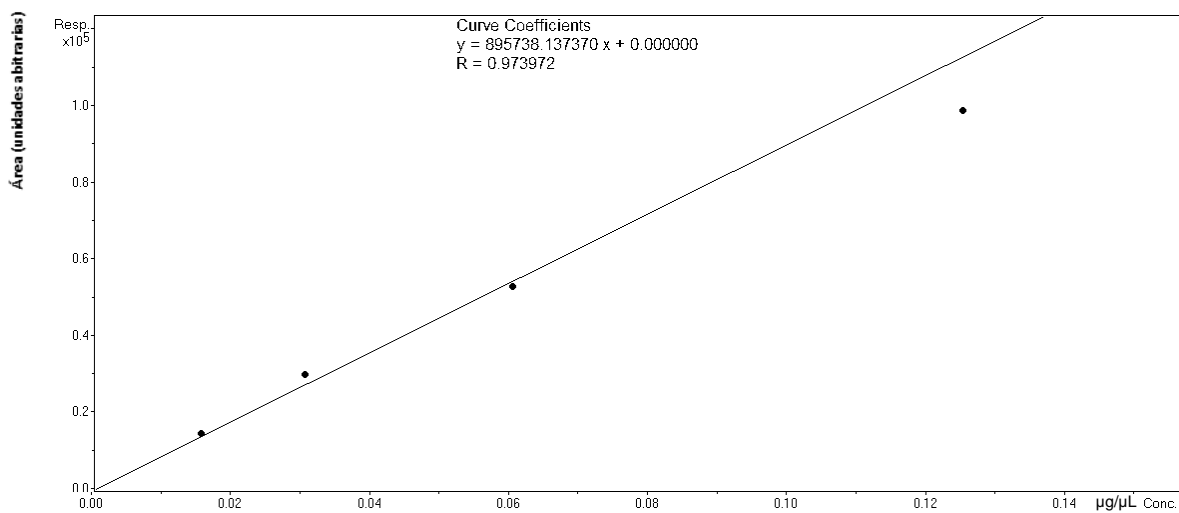


Figura S32. Curva de calibração obtida para o composto glicose.

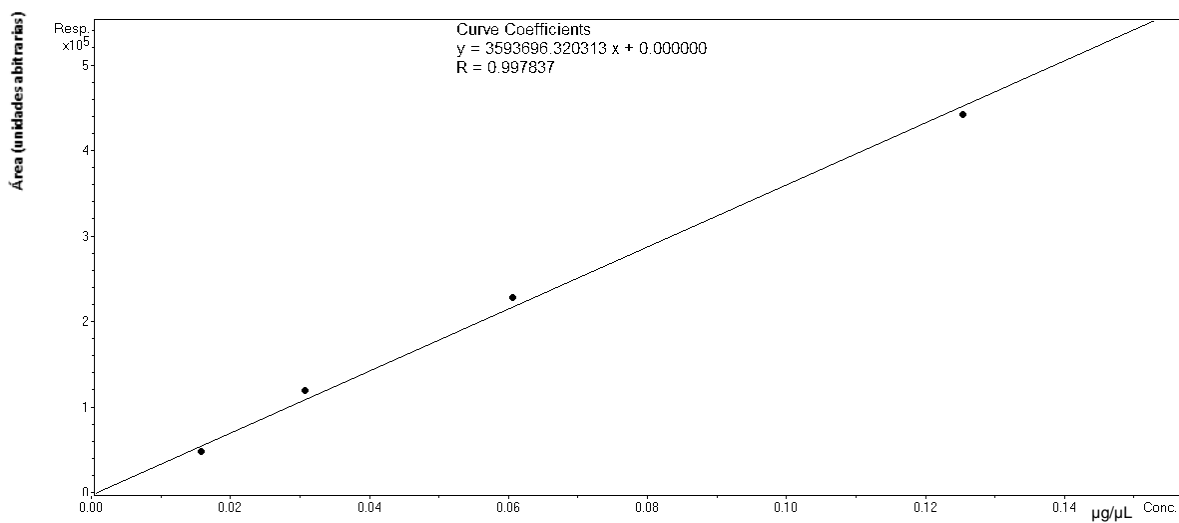


Figura S33. Curva de calibração obtida para o composto glutamina.

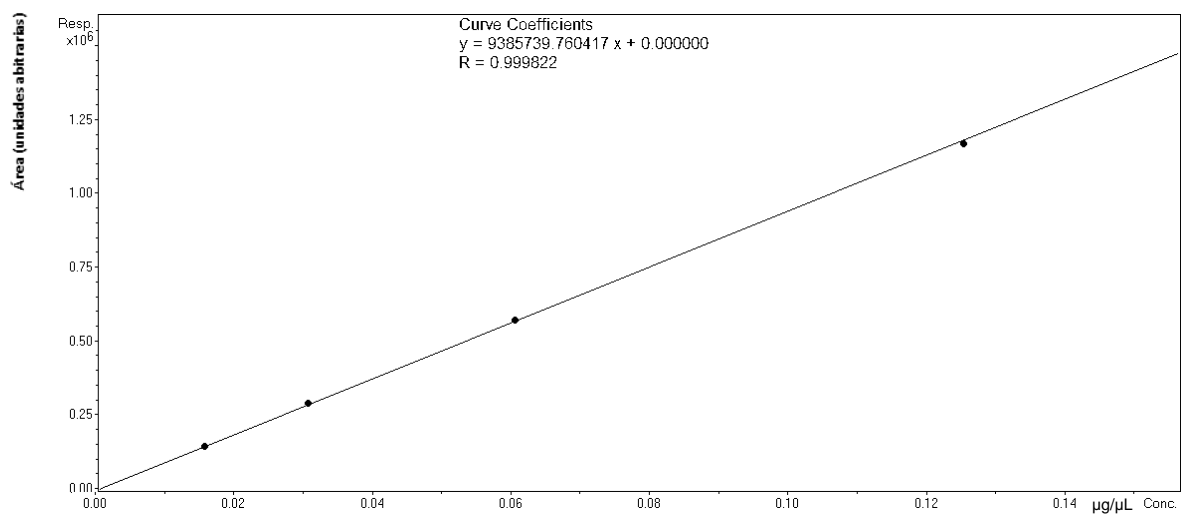


Figura S34. Curva de calibração obtida para o composto guanina.

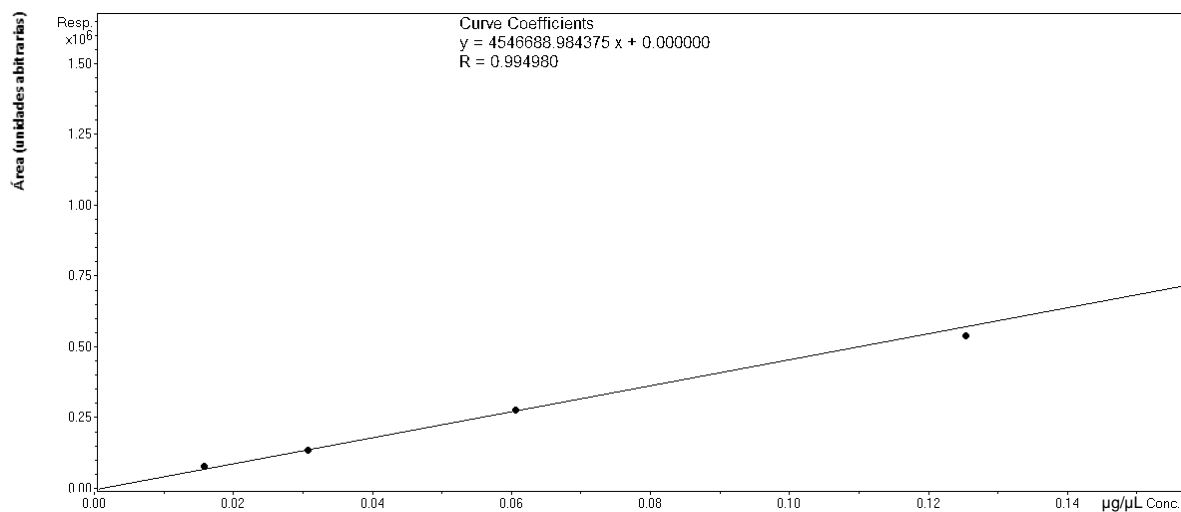


Figura S35. Curva de calibração obtida para o composto guanosina.

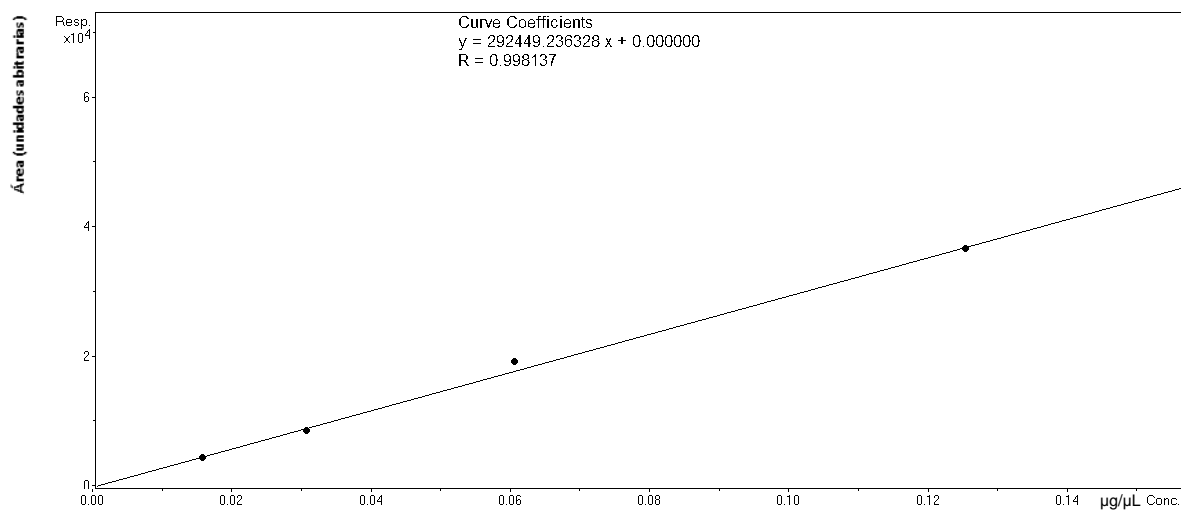


Figura S36. Curva de calibração obtida para o composto guanosina difosfato.

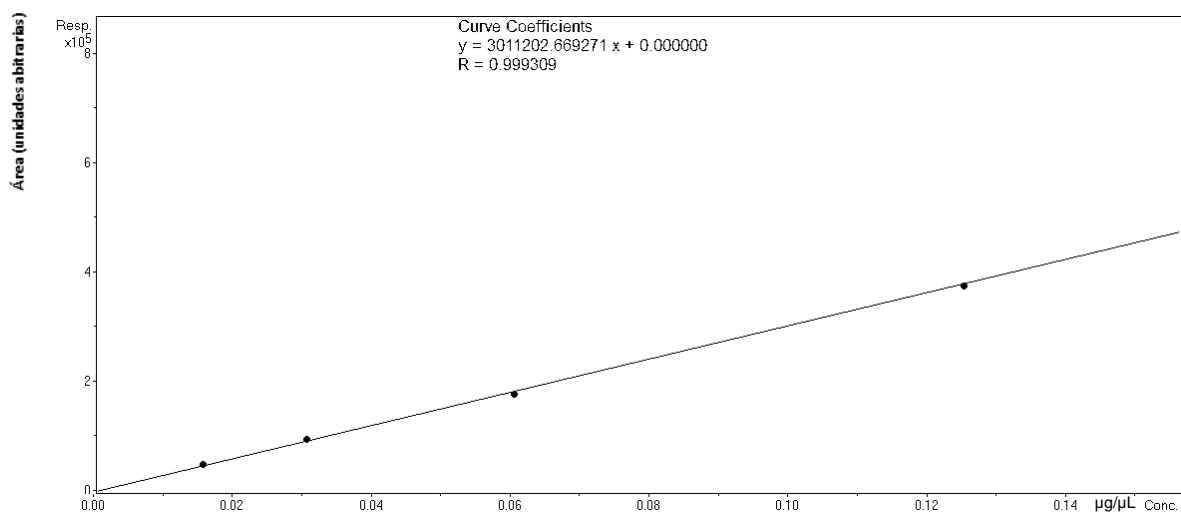


Figura S37. Curva de calibração obtida para o composto guanosina monofosfato.

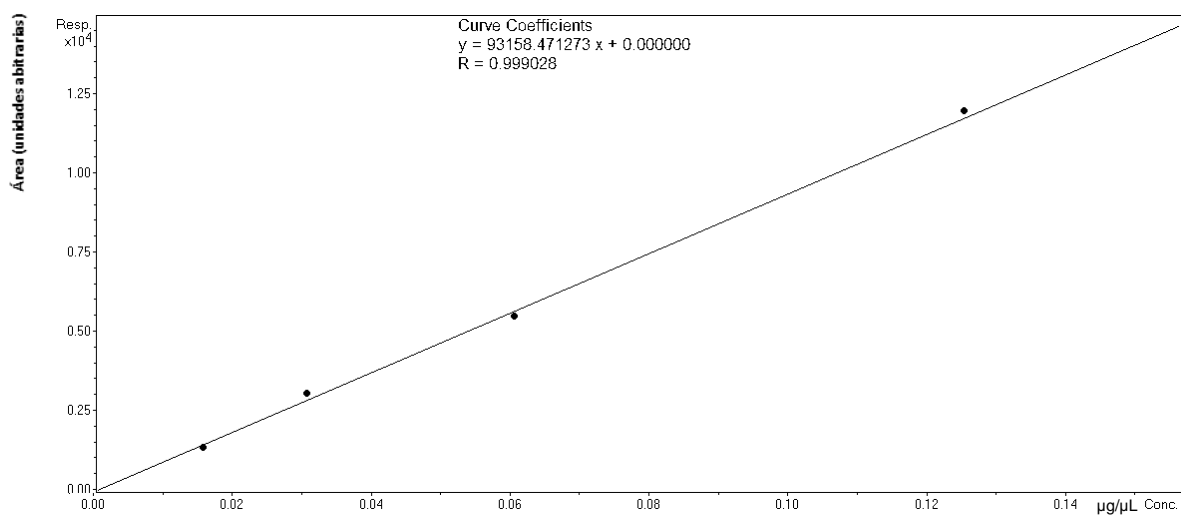


Figura S38. Curva de calibração obtida para o composto guanosina trifosfato.

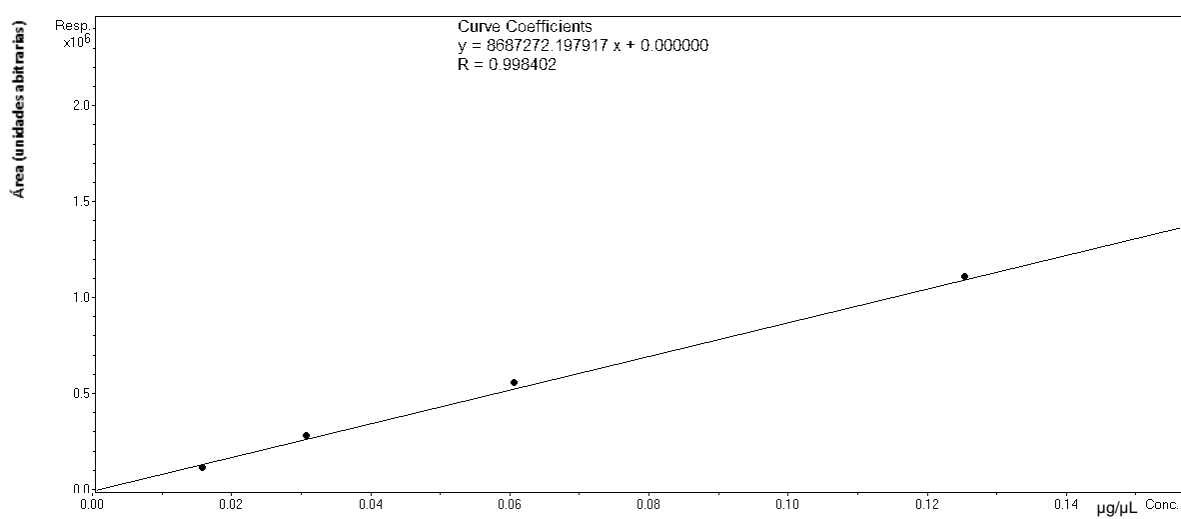


Figura S39. Curva de calibração obtida para o composto hidroxitriptarginina.

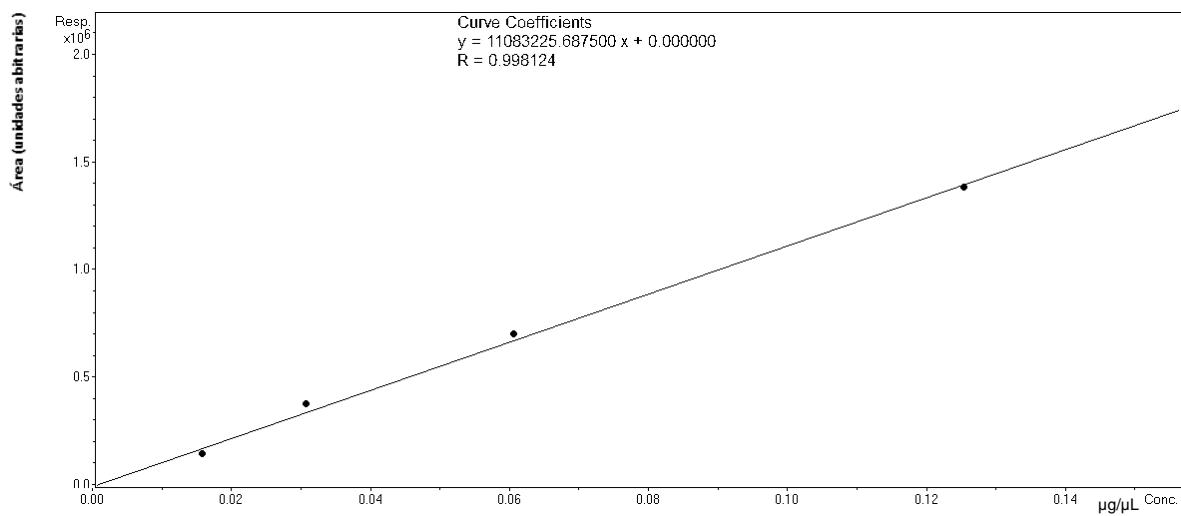


Figura S40. Curva de calibração obtida para o composto histamina.

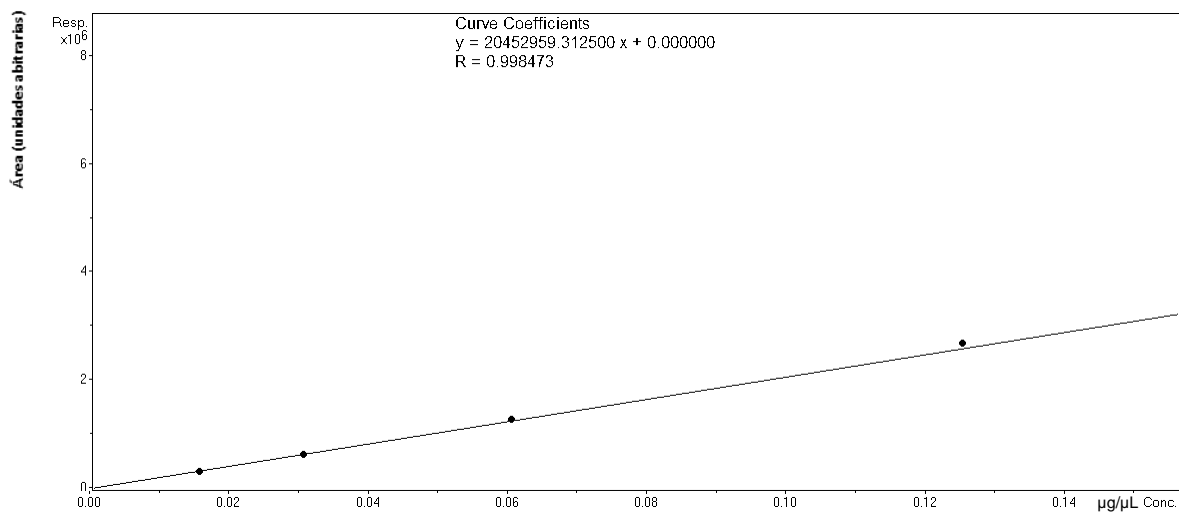


Figura S41. Curva de calibração obtida para o composto histidina.

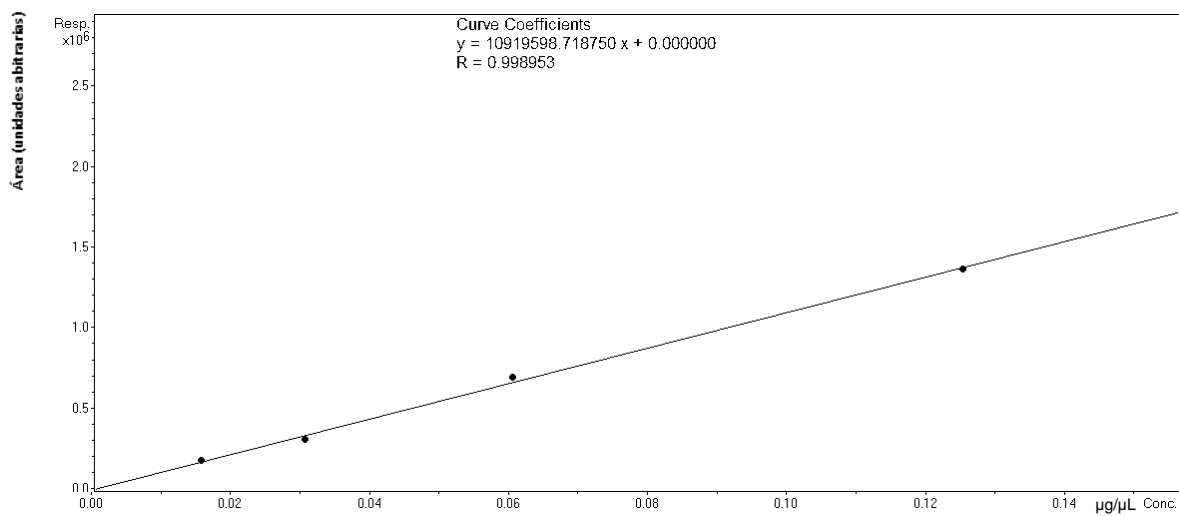


Figura S42. Curva de calibração obtida para o composto hidroxiprolina.

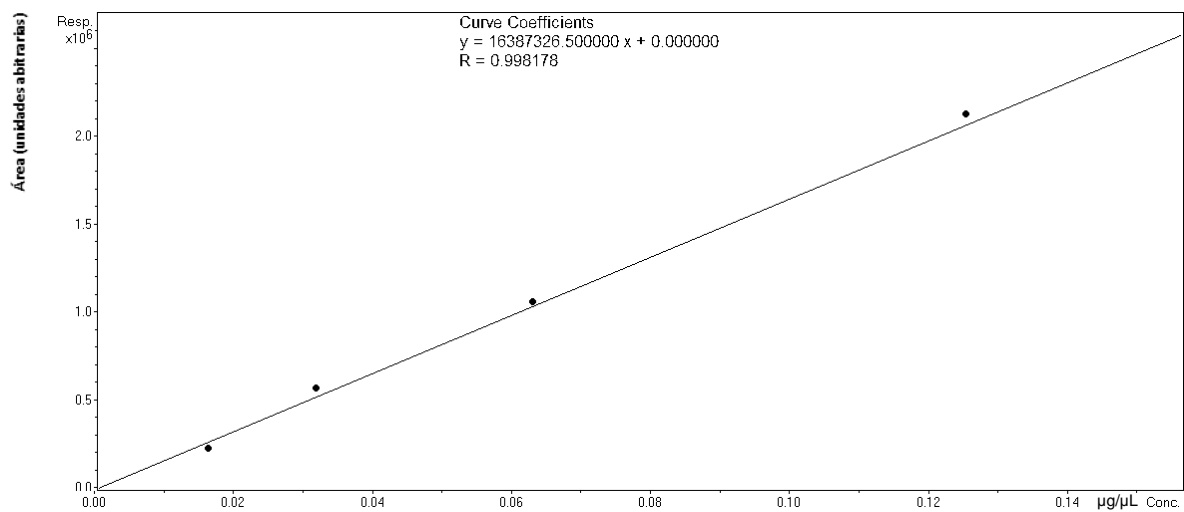


Figura S43. Curva de calibração obtida para o composto isoleucina.

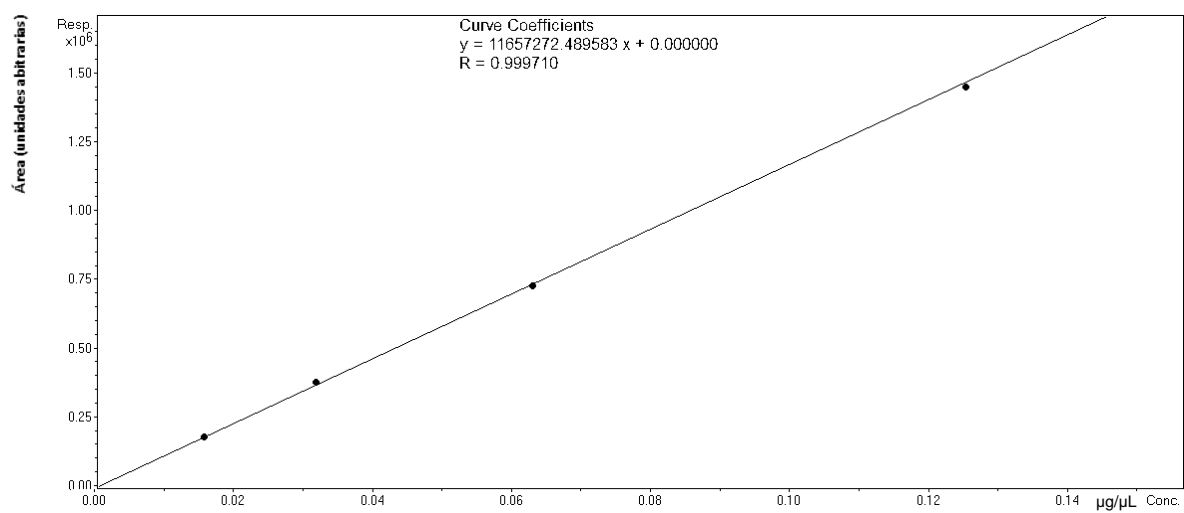


Figura S44. Curva de calibração obtida para o composto leucina.

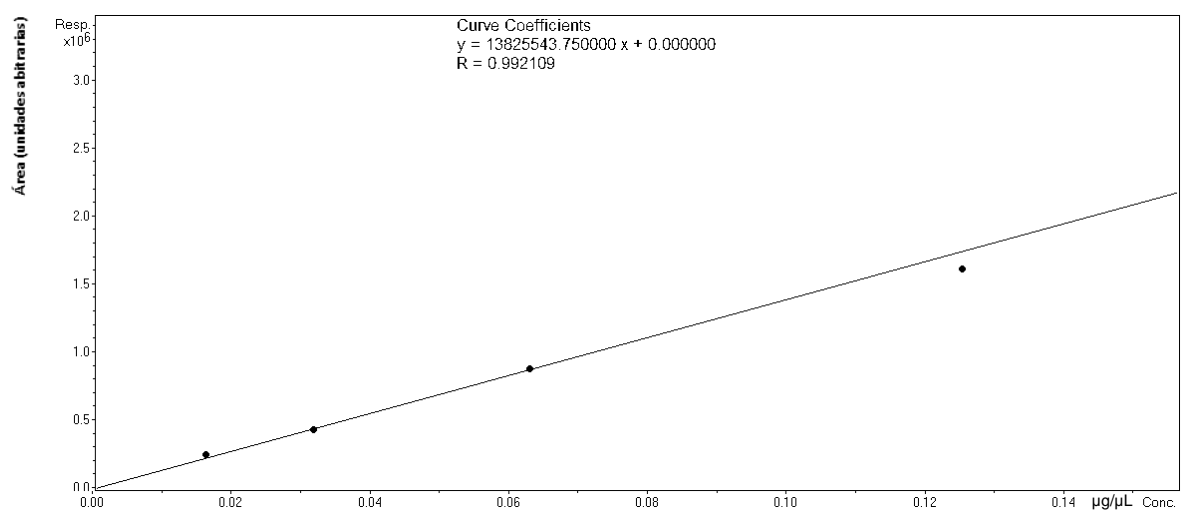


Figura S45. Curva de calibração obtida para o composto lisina.

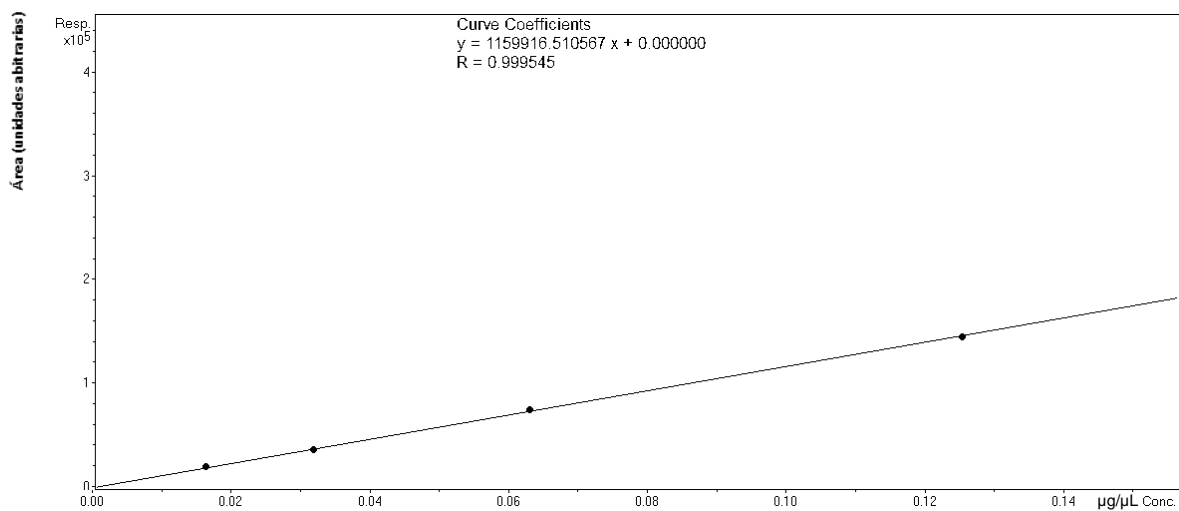


Figura S46. Curva de calibração obtida para o composto manose.

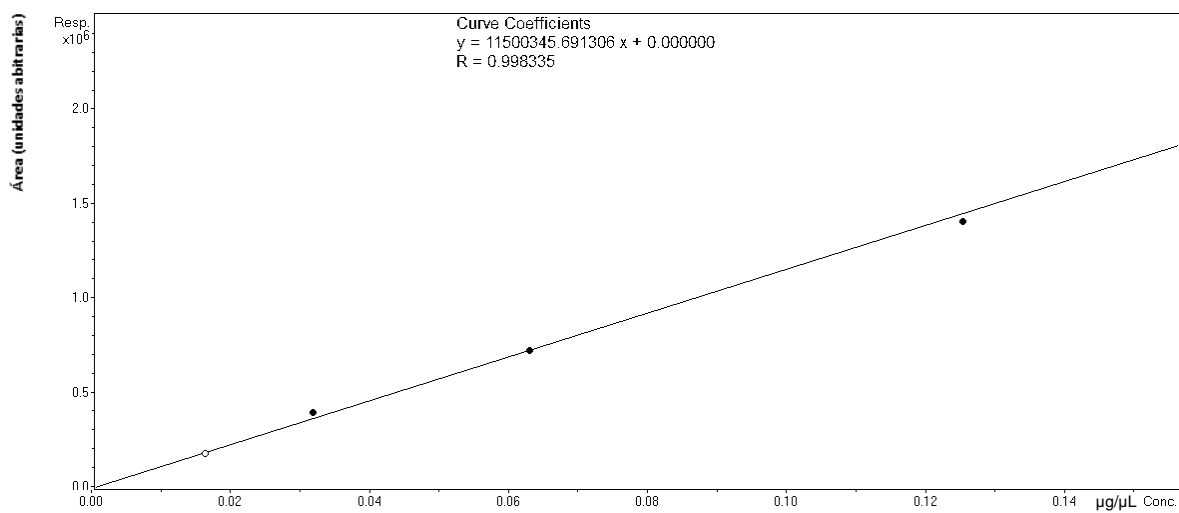


Figura S47. Curva de calibração obtida para o composto metionina.

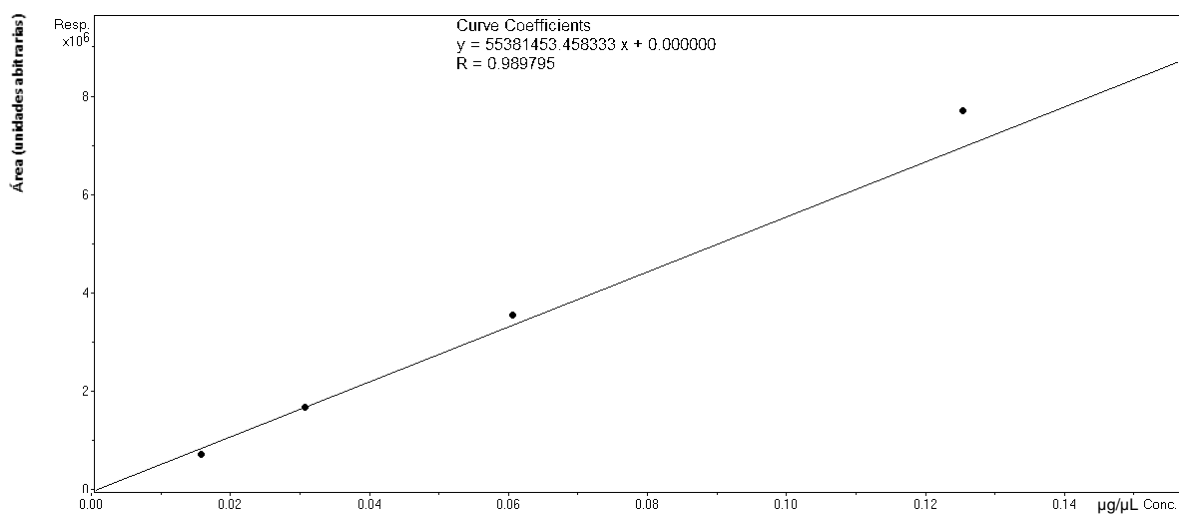


Figura S48. Curva de calibração obtida para o composto nicotina.

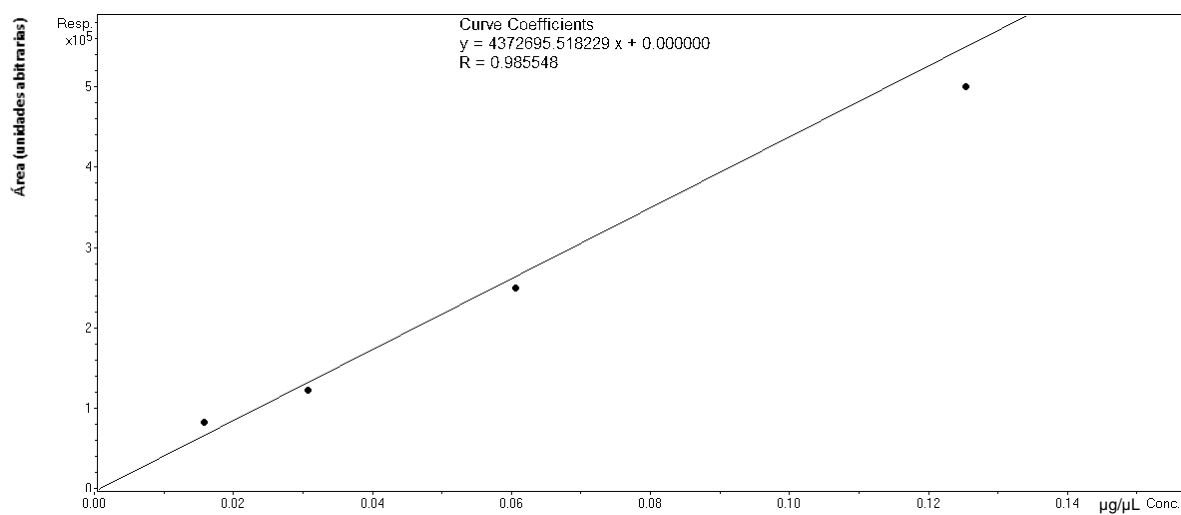


Figura S49. Curva de calibração obtida para o composto octopamina.

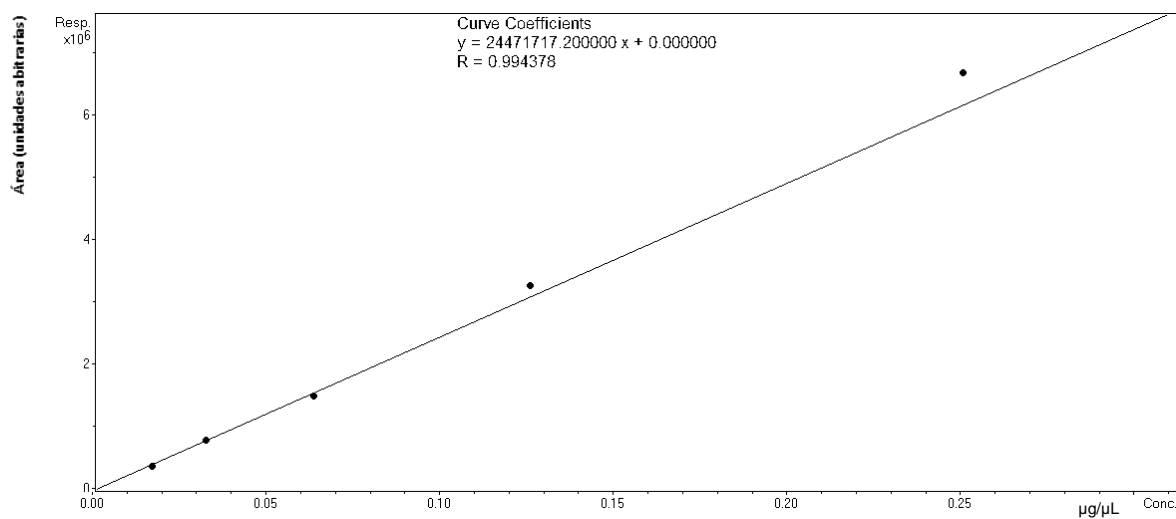


Figura S50. Curva de calibração obtida para o composto polibiosídeo.

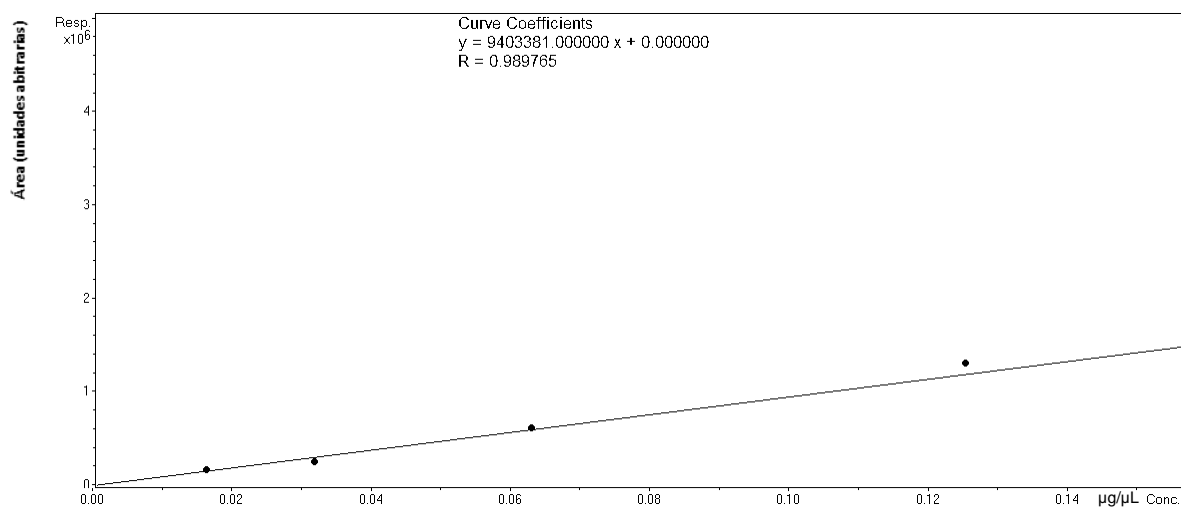


Figura S51. Curva de calibração obtida para o composto prolina.

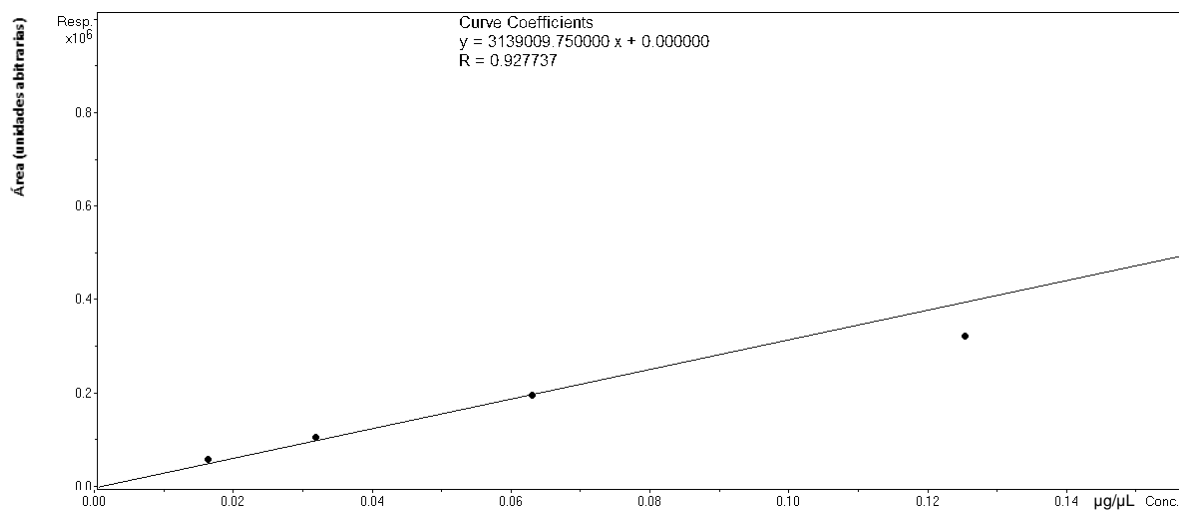


Figura S52. Curva de calibração obtida para o composto putrescina.

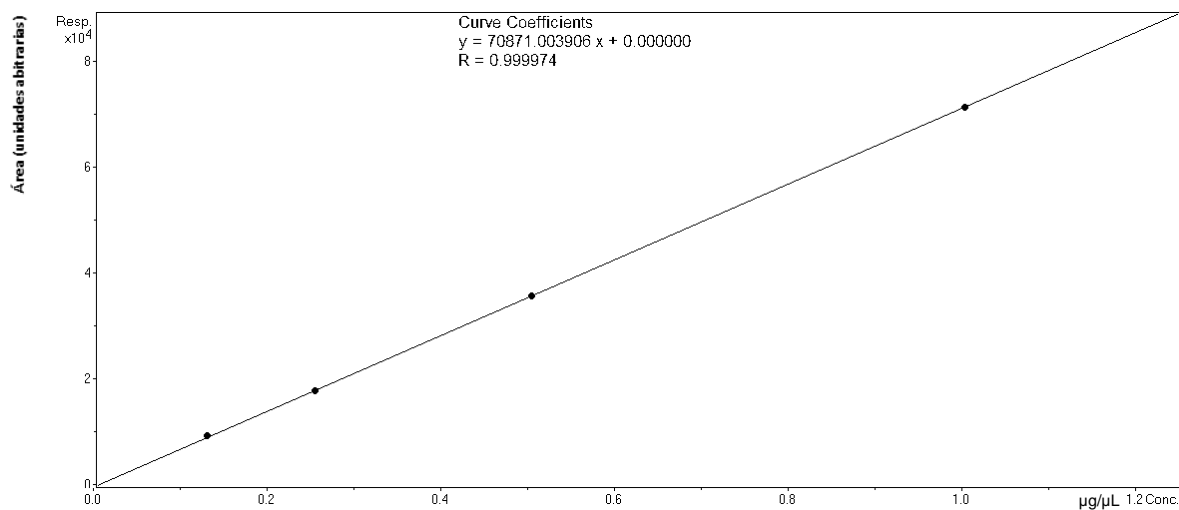


Figura S53. Curva de calibração obtida para o composto sacarose.

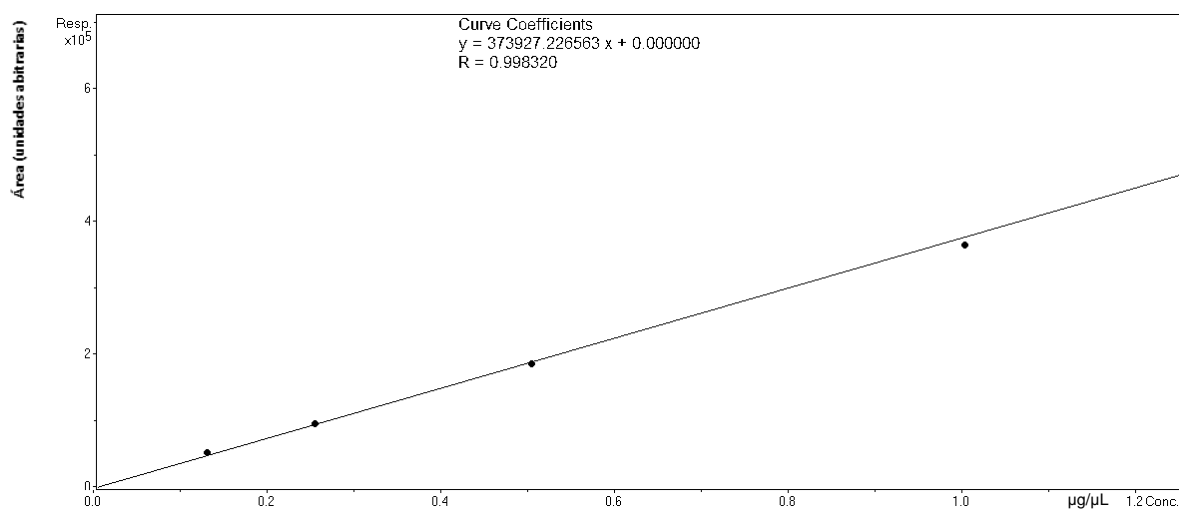


Figura S54. Curva de calibração obtida para o composto serina.

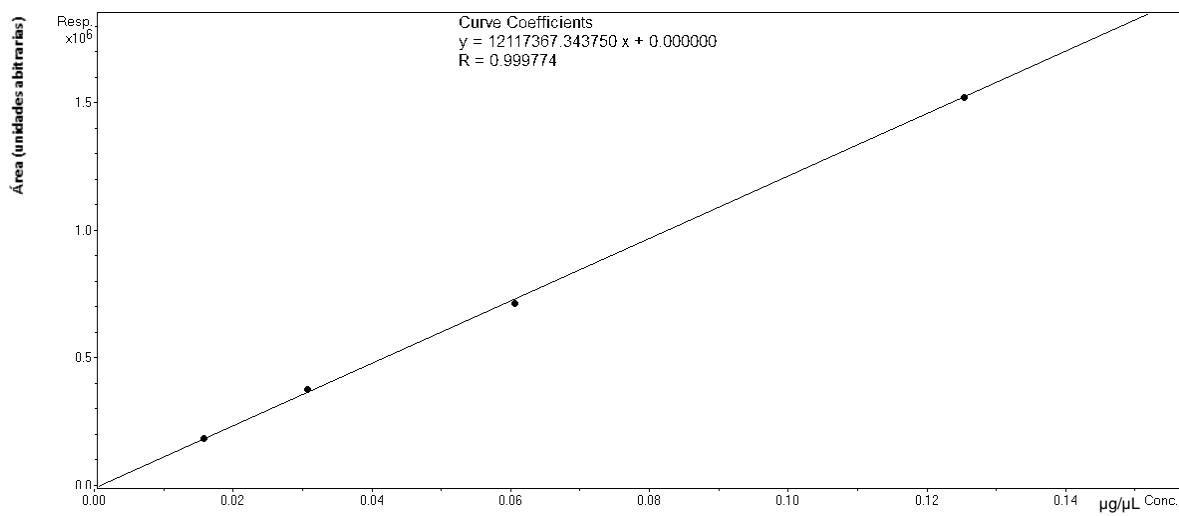


Figura S55. Curva de calibração obtida para o composto serotonina.

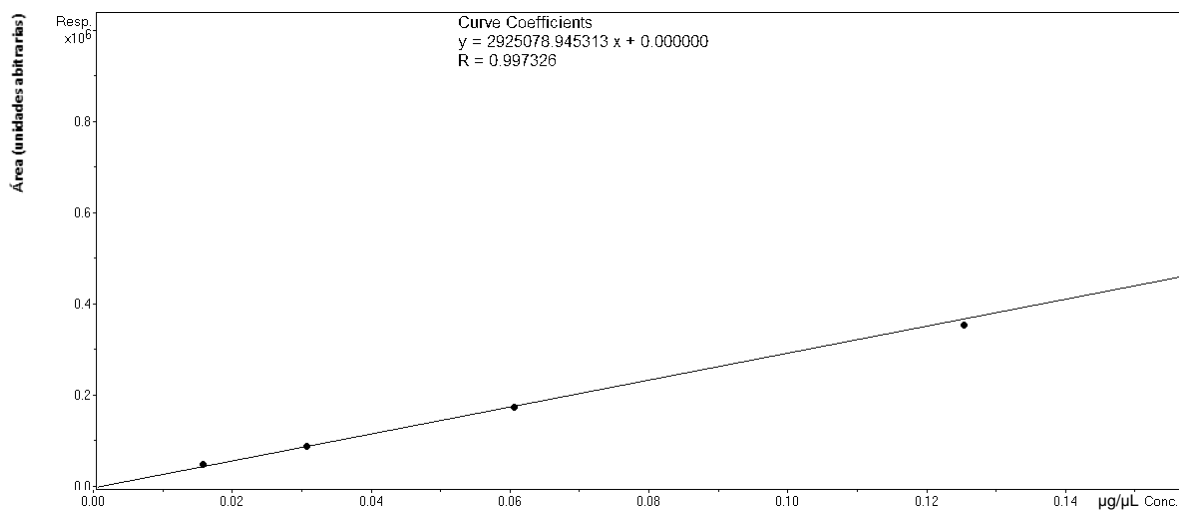


Figura S56. Curva de calibração obtida para o composto taurina.

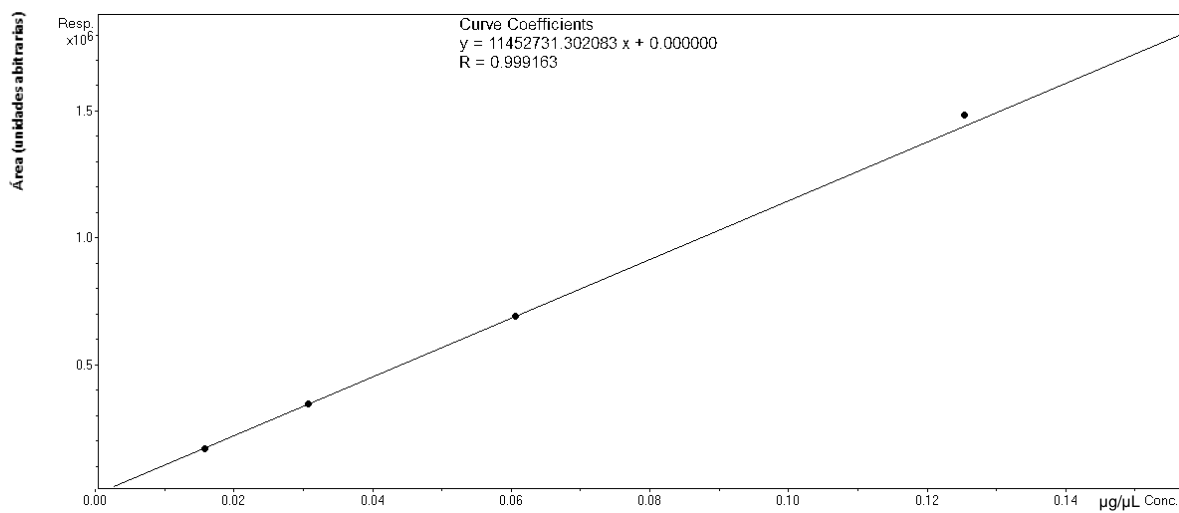


Figura S57. Curva de calibração obtida para o composto timina.

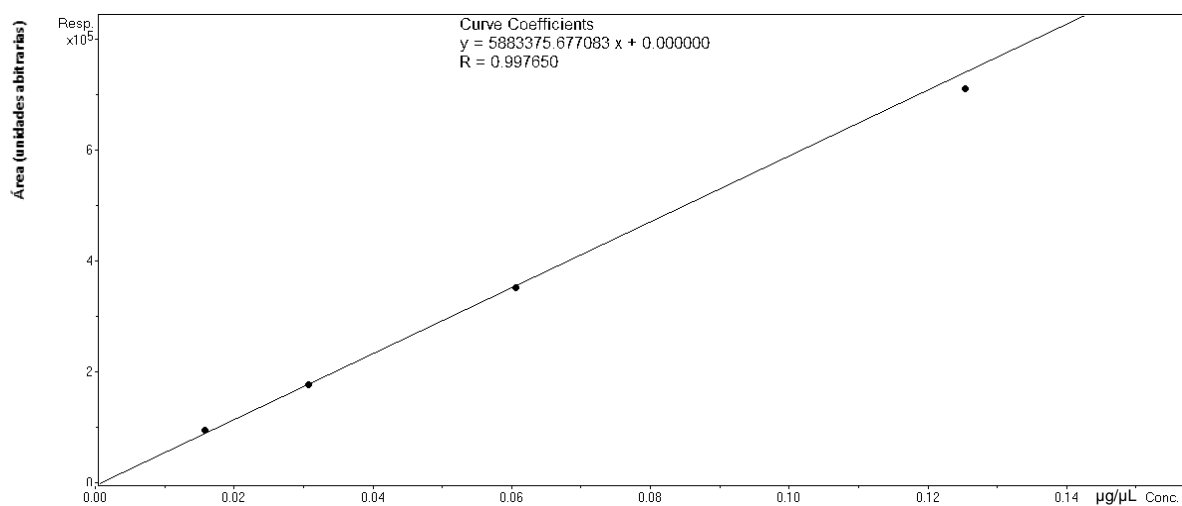


Figura S58. Curva de calibração obtida para o composto tiramina.

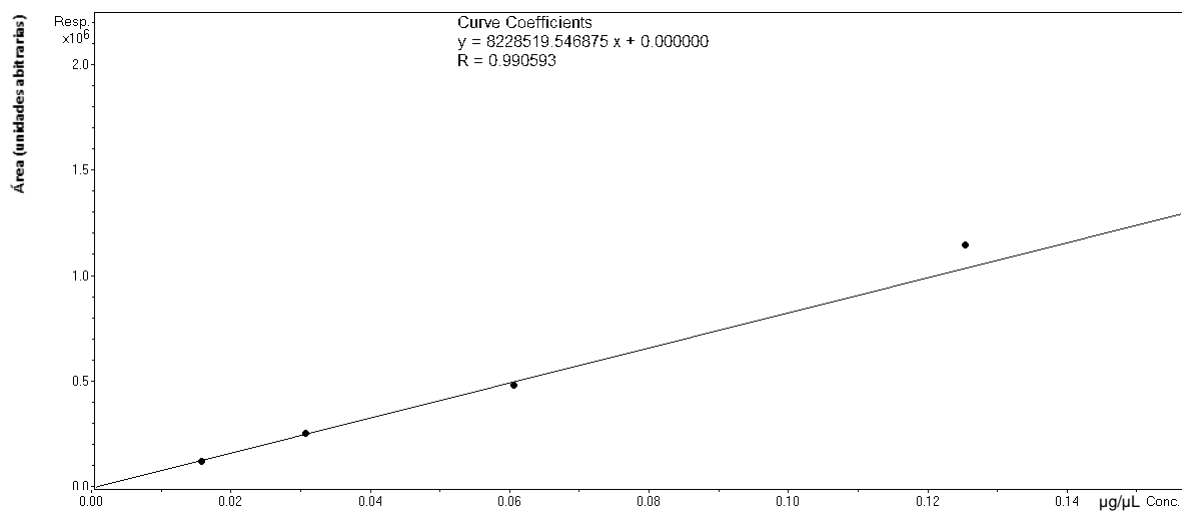


Figura S59. Curva de calibração obtida para o composto tirosina.

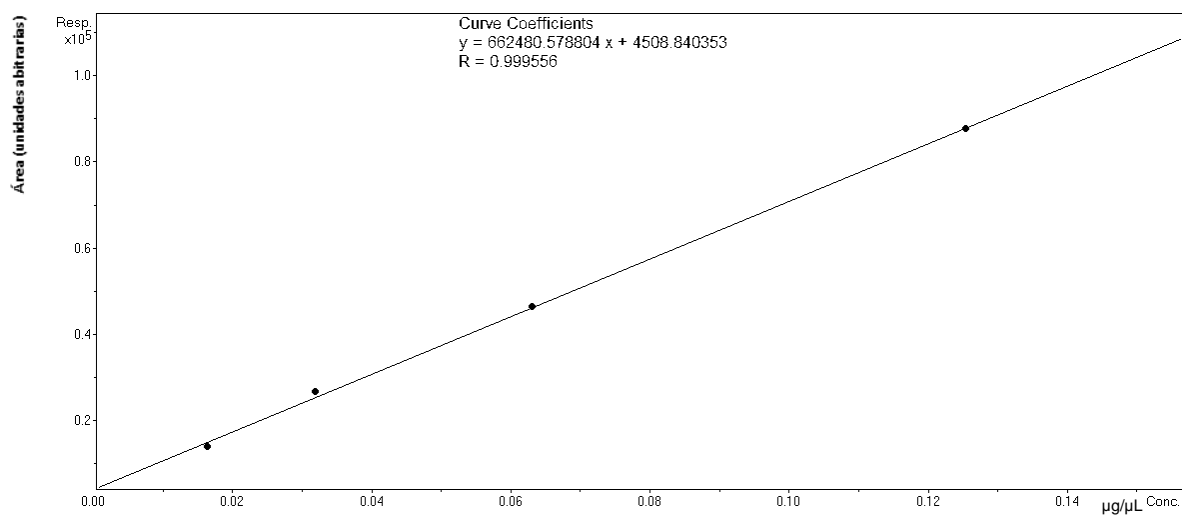


Figura S60. Curva de calibração obtida para o composto treonina.

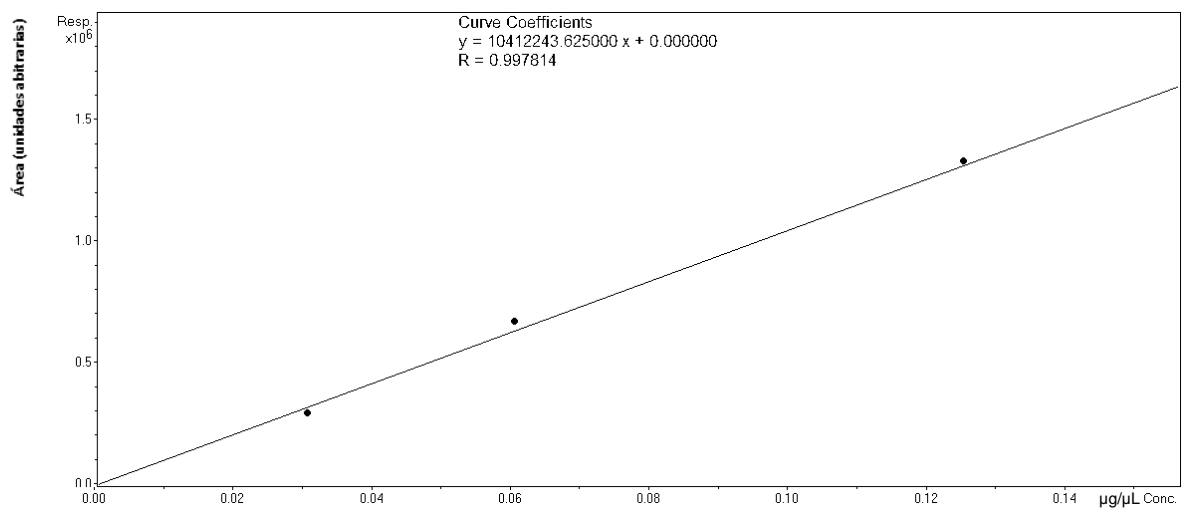


Figura S61. Curva de calibração obtida para o composto tripargina.

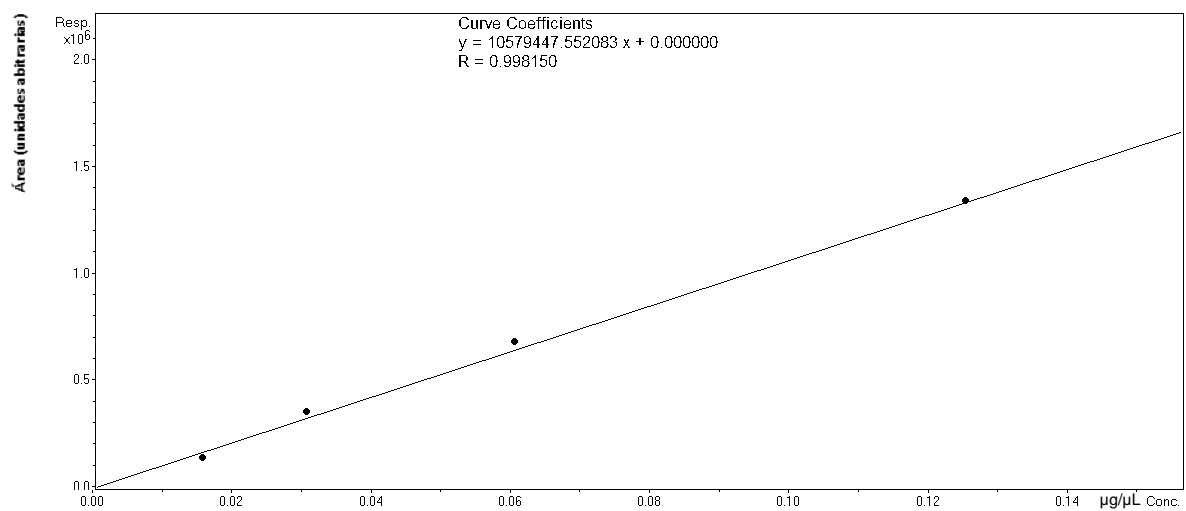


Figura S62. Curva de calibração obtida para o composto triptofano.

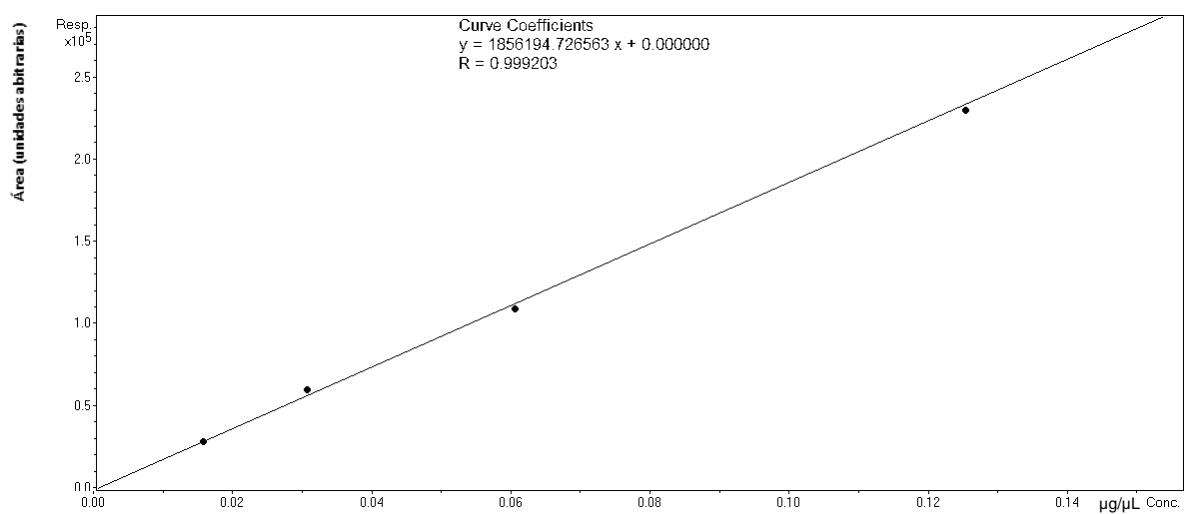


Figura S63. Curva de calibração obtida para o composto uracila.

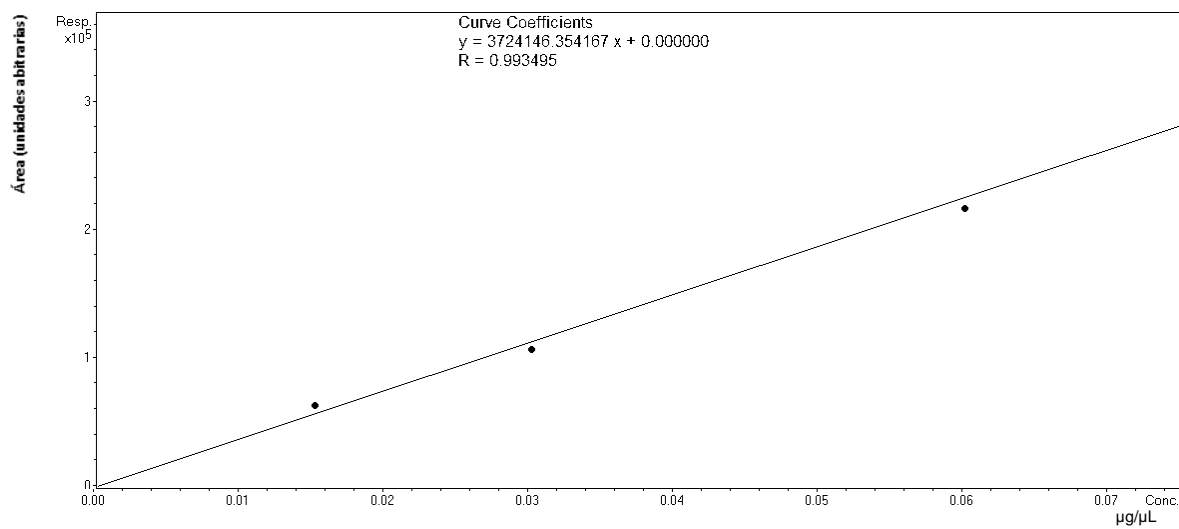


Figura S64. Curva de calibração obtida para o composto uridina.

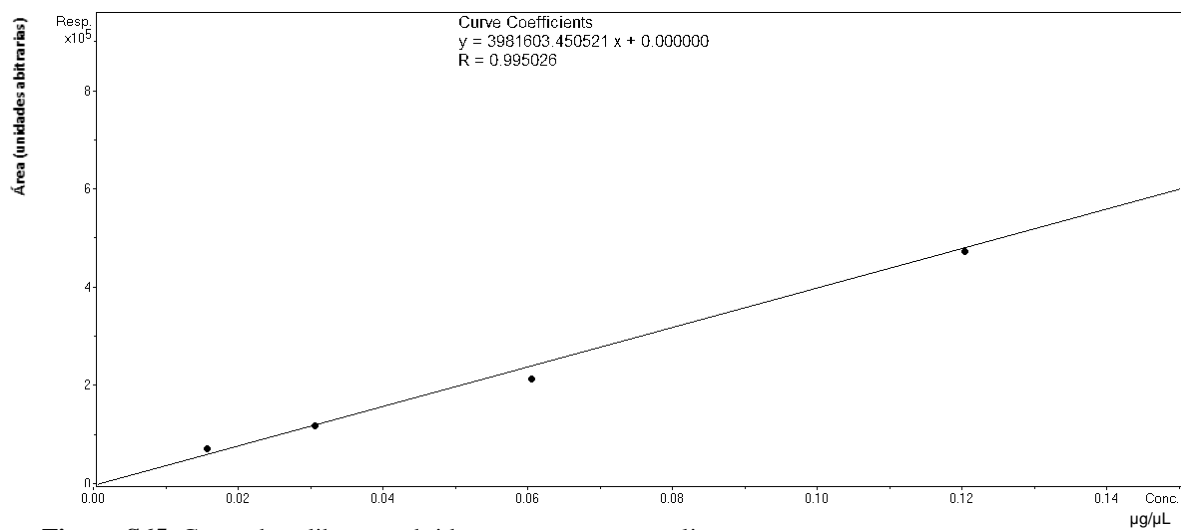
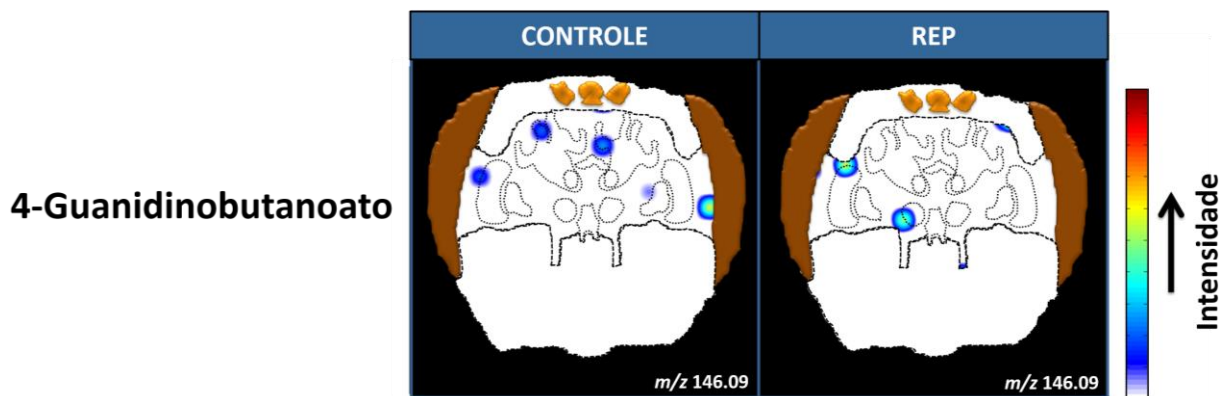


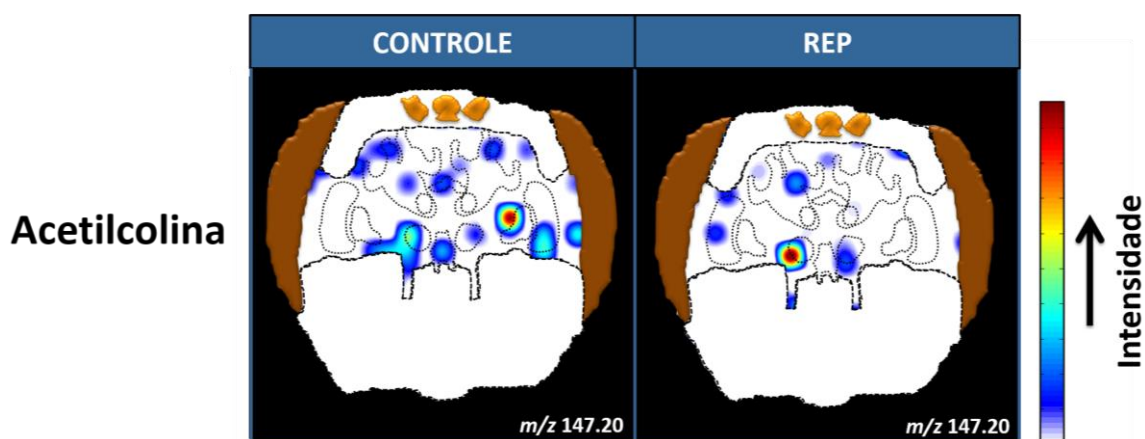
Figura S65. Curva de calibração obtida para o composto valina.

## **ANEXO II**

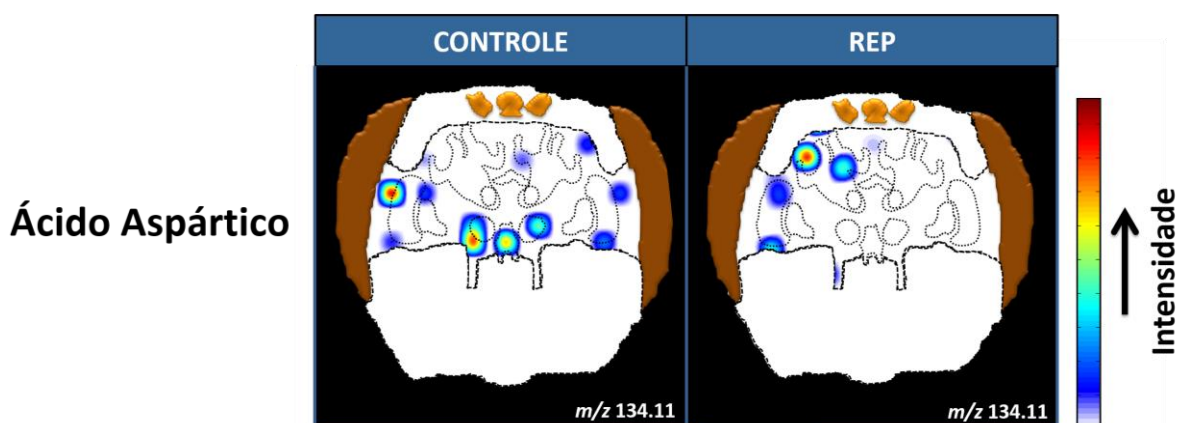
### **Imagens Geradas por Espectrometria de Massas dos Metabólitos**



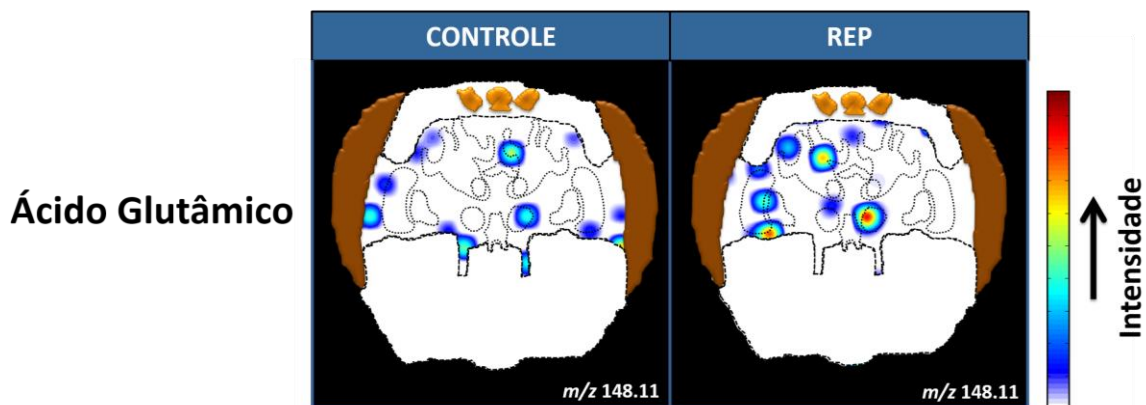
**Figura S66.** Imagens geradas por espectrometria de massas do 4-guanidinobutanoato identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  146.09, na forma  $([M+H]^+)$ .



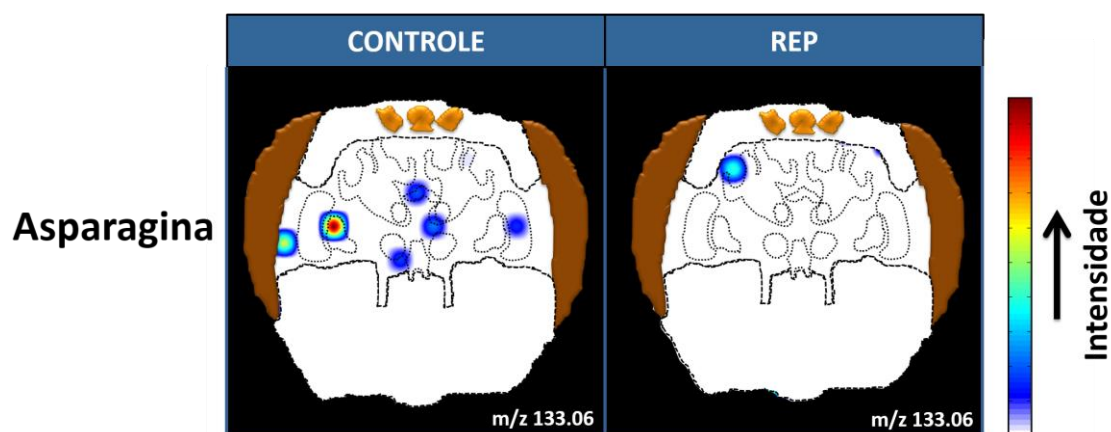
**Figura S67.** Imagens geradas por espectrometria de massas da acetilcolina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  147.20, na forma  $([M+H]^+)$ .



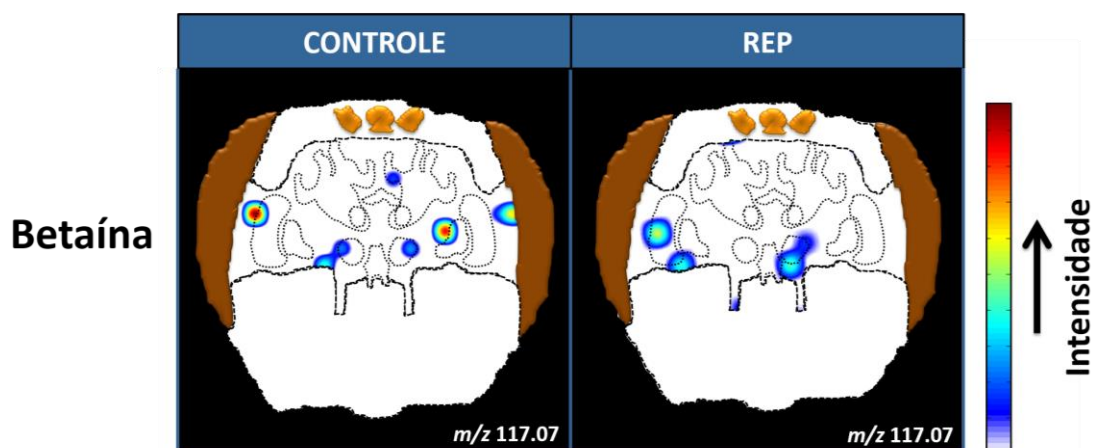
**Figura S68.** Imagens geradas por espectrometria de massas do ácido aspártico identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  134.11, na forma  $([M+H]^+)$ .



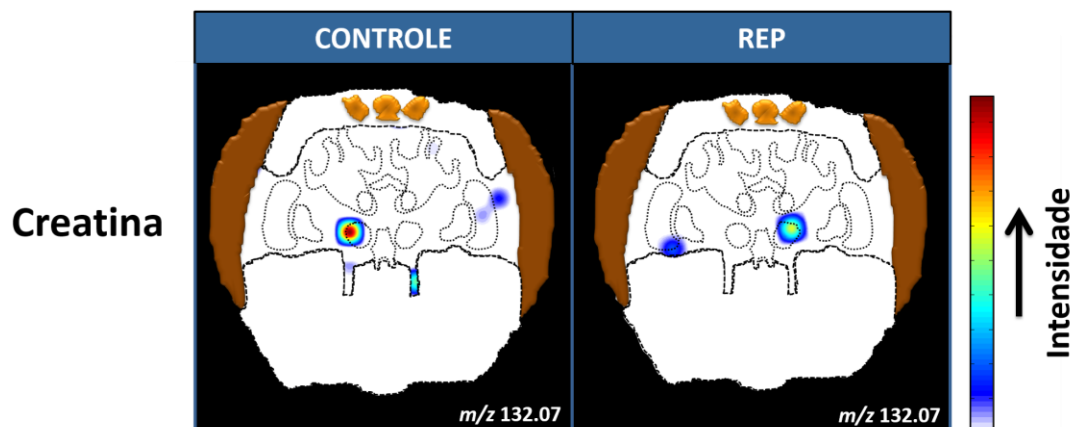
**Figura S69.** Imagens geradas por espectrometria de massas do ácido glutâmico identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  148.11, na forma  $([M+H]^+)$ .



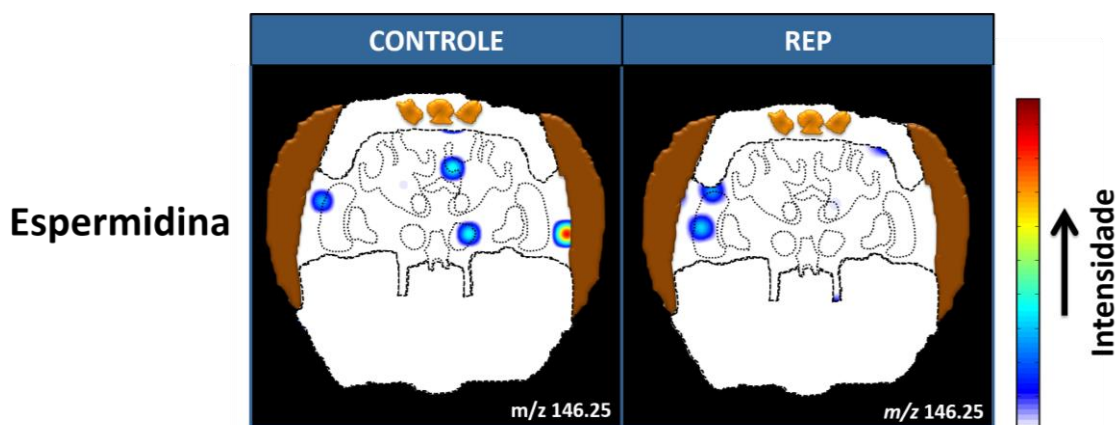
**Figura S70.** Imagens geradas por espectrometria de massas da asparagina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  133.06, na forma  $([M+H]^+)$ .



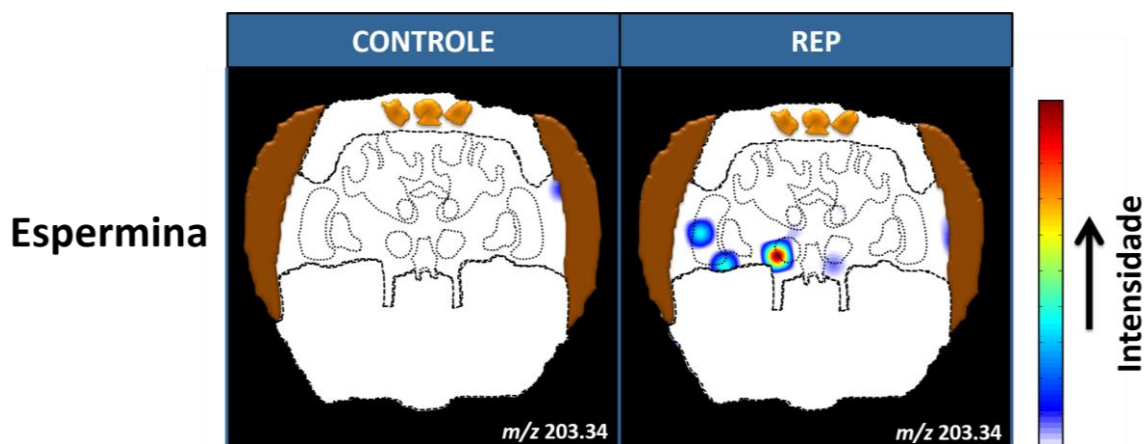
**Figura S71.** Imagens geradas por espectrometria de massas da betaína identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  117.07, na forma  $([M+H]^+)$ .



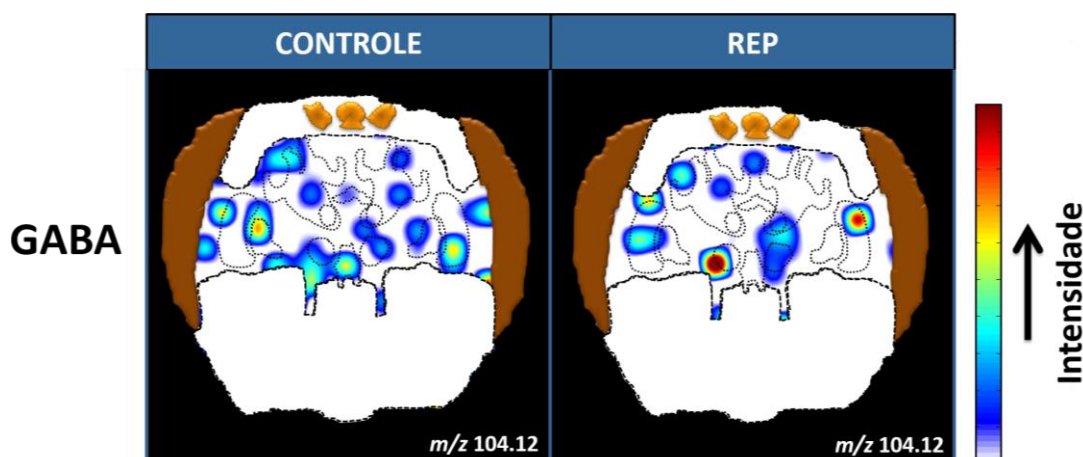
**Figura S72.** Imagens geradas por espectrometria de massas da creatina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  132.07, na forma  $([M+H]^+)$ .



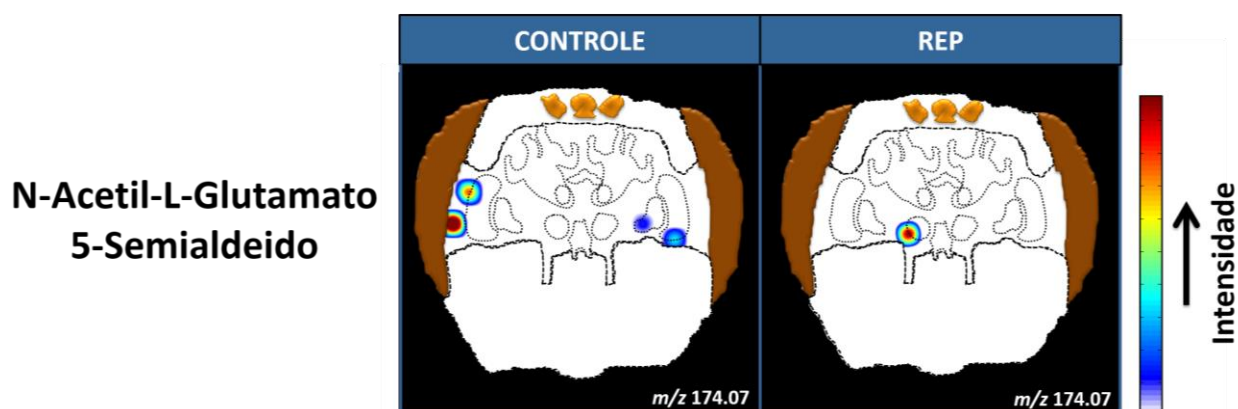
**Figura S73.** Imagens geradas por espectrometria de massas da espermidina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  146.25, na forma  $([M+H]^+)$ .



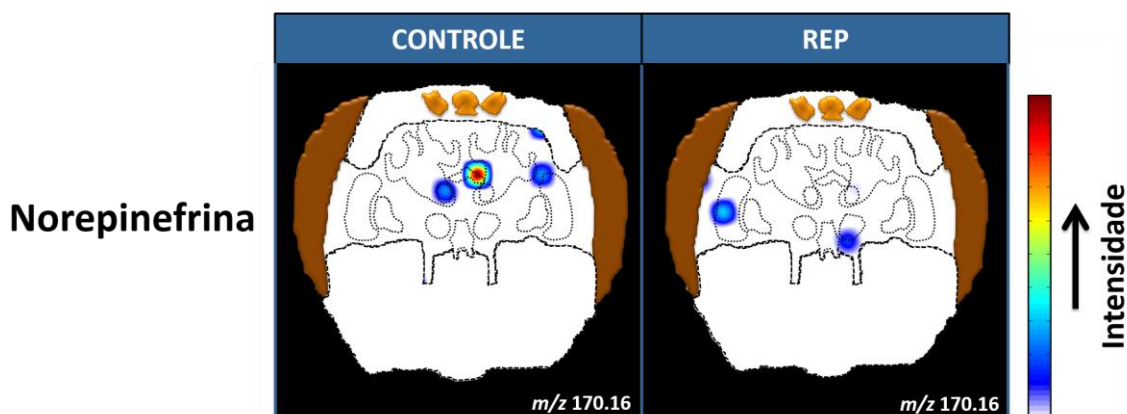
**Figura S74.** Imagens geradas por espectrometria de massas da espermina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  203.34, na forma  $([M+H]^+)$ .



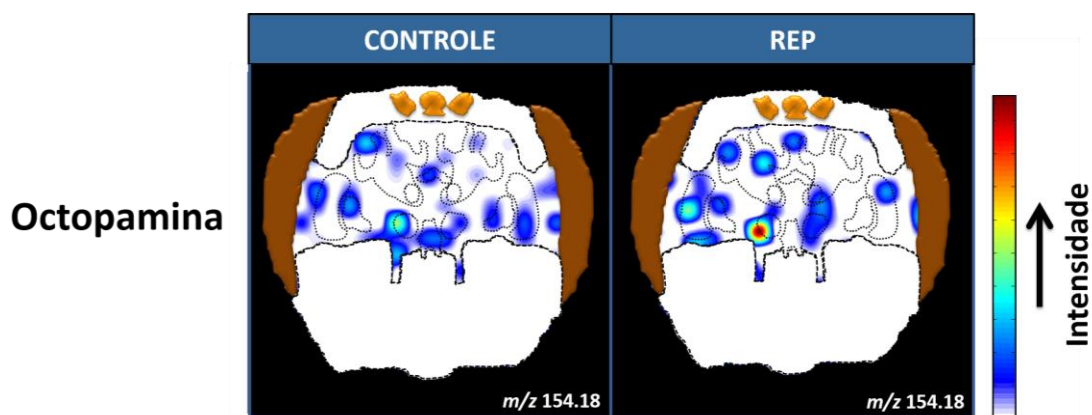
**Figura S75.** Imagens geradas por espectrometria de massas do GABA identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  104.12, na forma  $([M+H]^+)$ .



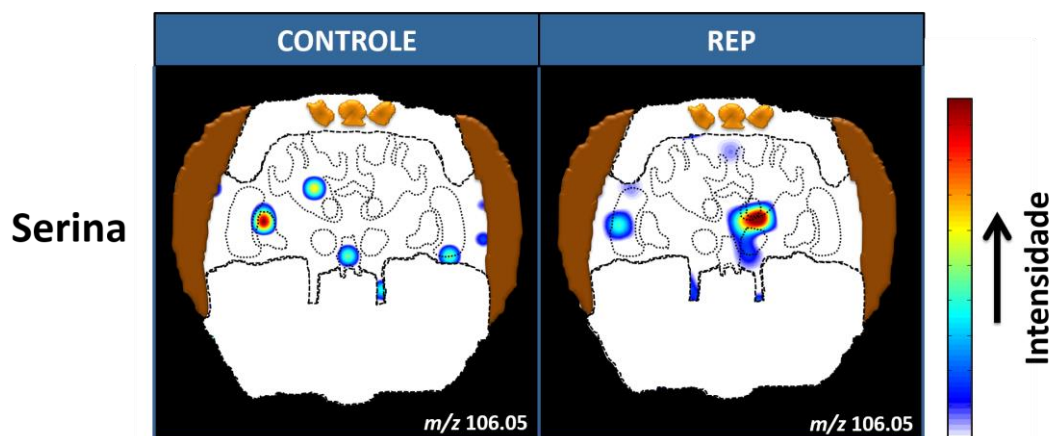
**Figura S76.** Imagens geradas por espectrometria de massas do N-acetil-L-glutamato 5-semialdeido identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  174.07, na forma  $([M+H]^+)$ .



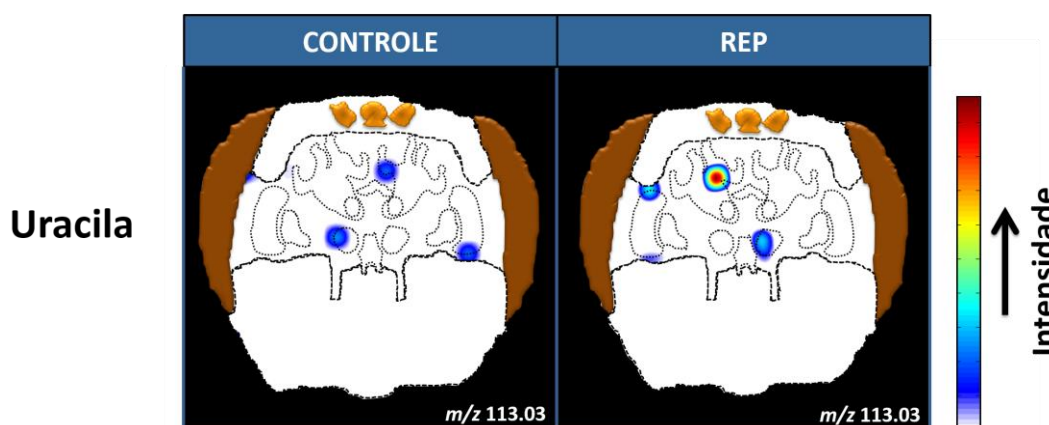
**Figura S77.** Imagens geradas por espectrometria de massas da norepinefrina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  170.16, na forma  $([M+H]^+)$ .



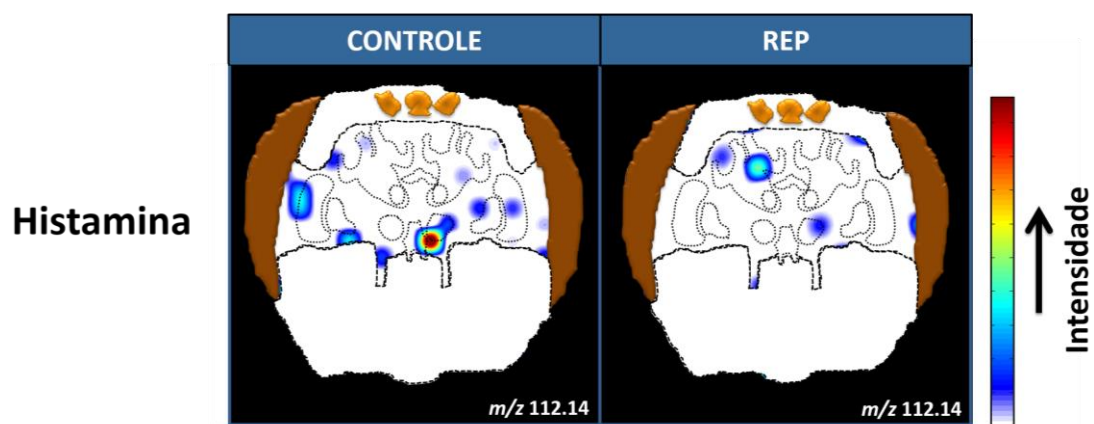
**Figura S78.** Imagens geradas por espectrometria de massas da octopamina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  154.18, na forma  $([M+H]^+)$ .



**Figura S79.** Imagens geradas por espectrometria de massas da serina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  106.05, na forma  $([M+H]^+)$ .



**Figura S80.** Imagens geradas por espectrometria de massas da uracila identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada  $m/z$  113.03, na forma  $([M+H]^+)$ .



**Figura S81.** Imagens geradas por espectrometria de massas da histamina identificadas em cérebros de abelhas *A. mellifera* através da técnica MALDI MSI, utilizando-se o algoritmo MSiReader v0.05. Essas imagens foram geradas a partir da molécula protonada de  $m/z$  112.14, na forma  $([M+H]^+)$ .

---

BSc. Marcel Pratavieira

---

Prof. Dr. Mario Sergio Palma (Orientador)