
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Uma abordagem neuroproteômica do cérebro de operárias de *Apis mellifera* africanizadas submetidas ao ensaio de reflexo de extensão de probóscide

ANALLY RIBEIRO DA SILVA MENEGASSO

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

**Rio Claro/SP
Junho- 2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

Instituto de Biociências Campus Rio Claro

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Anally Ribeiro da Silva Menegasso

Uma abordagem neuroproteômica do cérebro de operárias de *Apis mellifera* africanizadas submetidas ao ensaio de reflexo de extensão de probóscide

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

RIO CLARO

Junho/2017

595.799 Menegasso, Anally Ribeiro da Silva
M541a Uma abordagem neuroproteômica do cérebro de operárias
de *Apis mellifera* africanizadas submetidas ao ensaio de
reflexo de extensão de probóscide / Anally Ribeiro da Silva
Menegasso. - Rio Claro, 2017
345 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Abelha. 2. Proteômica. 3. Espectrometria de massas. 4.
Memória e aprendizagem. I. Título.

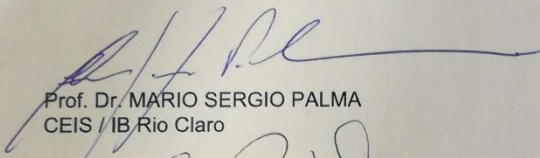
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

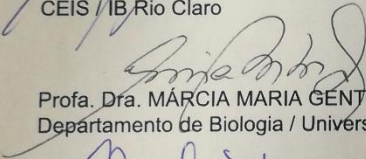
TÍTULO DA TESE: Uma abordagem neuroproteômica do cérebro de operárias de *Apis mellifera* africanizadas submetidas ao ensaio de reflexo de extensão de probóscide

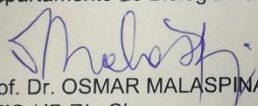
AUTORA: ANALY RIBEIRO DA SILVA MENEGASSO

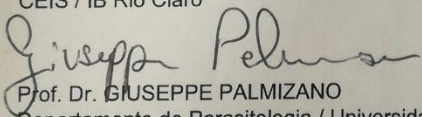
ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA

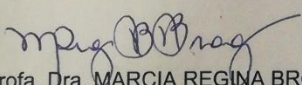
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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


Profa. Dra. MÁRCIA MARIA GENTILE BITONDI
Departamento de Biologia / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CEIS / IB Rio Claro


Prof. Dr. GIUSEPPE PALMIZANO
Departamento de Parasitologia / Universidade de São Paulo


Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 30 de junho de 2017

À minha família.... Que sempre me
deu coragem para questionar
realidades e propor um novo mundo
de possibilidades.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, por todas as oportunidades dadas a mim ao longo destes 8 anos. Oportunidade de aprender, de crescer e de me reinventar a cada projeto. Oportunidade de partilhar comigo toda a sua força e dedicação em prol da ciência e da construção de conhecimento sólido e de qualidade. Sou grata por encontrar em você, por muitas vezes, um amigo. Sou grata por você entender que muitas vezes eu não sigo os caminhos convencionais, que tenho minhas peculiaridades, mas que acima de tudo, amo o que faço e dou o melhor de mim em qualquer situação. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre saber o que dizer e fazer.

Ao Prof. Dr. Gert Lubec da Universidade de Viena, pela oportunidade a mim concedida, por toda a colaboração e empenho na realização deste estudo. Obrigada também pela amizade, pelas reuniões, festas, jogos e viagens em grupo que nos propiciaram construir um ambiente de trabalho saudável e divertido. Conviver com sua pessoa, com sua experiência de vida e conhecimento científico foi sem dúvida uma incrível e desafiadora experiência profissional e pessoal. Muito obrigada. Obrigada também as suas filhas, Sophie e Marie, que me receberam super bem e me apoiaram em um momento de transição tão difícil. Obrigada Jana, pela paciência e por me receber tantas vezes na casa de vocês. Obrigada Philip pelas risadas, brincadeiras e por ser essa criança doce e contagiante. Um obrigada especial ao Michl e à sua esposa por nos ceder uma colmeia de abelhas, pela confiança e os ensinamentos em apicultura. Obrigada ao Dr. Martin Streinzer por me ensinar a dissecar cérebros de abelhas e por nos fornecer todo o equipamento necessário para isto, você foi demais.

A todos do Laboratório de Proteômica Gert Lubec da Universidade de Viena, por terem me recebido tão bem, por toda a troca de experiência profissional e pessoal. Obrigada por todas as longas horas, noites e finais de semana no laboratório. Nós sabemos o quão difícil é se manter de pé, respirar e respirar novamente. Obrigada pelas inúmeras vezes em que contamos até dez (seja no idioma que fosse) e apoiamos uns aos outros. Pelas trocas culturais, de alimentação, idioma e enfim, cultural. Eu nunca aprendi tanto na minha vida! Vocês foram demais. Obrigada Fernando, Roman, Tanja, Bosko, Dragana, Sascha, Ahmed, Tamara, Martina, Michaela, Jana, Andras, Pedrag, Vladimir, Jovana, Barnhi, Daniel, Babak, Marija, Edit, Judith, Mikite, Yasemin e Nilima. Obrigada a todos vocês, por tudo de bom e de ruim (risos) que passamos juntos. Obrigada em especial à Tamara, Jovana e Bosko, a amizade de vocês ficará para sempre guardadinha em um lugar especial em meu coração. Aos amigos que fiz em Viena, Martin,

Max, Yannick, Claus, Annalisa e Ulrich, vocês foram de fundamental importância na minha rotina, me mostraram que o Mundo é grande por demais! E que sou sortuda por ter amigos mundo a fora. Tenho certeza que nos veremos novamente! Obrigada por me darem tantos momentos bons! We may meet again!

À Fiocruz do Paraná, especialmente Prof. Dr. Paulo Costa Carvalho e a Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer, pela colaboração e dedicação dispensadas na parte de análise do proteoma solúvel. Aprendi muito com vocês.

Ao LECA (Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas), especialmente ao Prof. Dr. Osmar Malapsina e à Dra. Thaisa Roat, por tudo que me ensinaram, pela colaboração e apoio ao nosso estudo. Agradeço também ao Sergio por todas as coletadas e ajuda com as abelhas.

Ao Prof. Dr. Brian Smith e à Dra. Cristina Burden (Universidade do Arizona – EUA) que me ensinaram como realizar os ensaios de REP-condicionado. A dedicação de vocês ao estudo de abelhas é, certamente, inspiradora.

À Profa. Dra. Zilá L. P. Simões (USP-Ribeirão Preto) que com sua graciosidade e gentileza, por inúmeras vezes, aconselhou-me e me ajudou ao longo do desenvolvimento desta tese. Meu carinho e respeito pela Senhora são enormes. A ciência precisa de mais pessoas como a senhora, sempre disposta a ajudar!

Ao Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, Fran, Beto, Caroline, Marcel, Kenny, Bibiana, Nathália, Helen e Ana Maria. Muito obrigada Marcel, pelo companheirismo, pela ajuda com as abelhas, com as leituras e com os experimentos de forma geral, mas principalmente, obrigada pelo apoio constante e por sempre acreditar no meu potencial. Obrigada Fran por toda sua amizade, paciência e apoio.

À minha mãe Lilian, por ser o meu exemplo de caráter, força e fé... por tudo o que já passamos e superamos, sem nunca desistir, sem jamais nos afastarmos. Obrigada mãe, por me apoiar e me compreender, por respeitar minhas escolhas e me amar incondicionalmente. Não importa o momento, a dificuldade ou a distância, você sempre esteve lá... me deu a mão, me apoiou e me ajudou a levantar; a construir momentos que serão para sempre meu porto seguro. Ao meu irmão Arthur, meu anjinho em forma de criança. Você foi uma benção em nossas vidas, sua doçura, seu carinho e sua graça me mantiveram de pé, firme e forte. Ao meu pai adotado, Sandro, obrigada por todo o seu apoio e amizade... por cuidar dos meus tesouros enquanto estive ausente e por ao longo destes anos todos, se tornar um tesouro para mim. Por todas as piadas, conversas e apoio, muito obrigada.

À minha família (Lilian, Sandro, Arthur, Dirce, Raimundo, Ligia, Marcos, Júnior, Pabola, Laércio, Letícia, Isabela, Laís, Ivair, Luciana, Leonardo e Carmen) por me educar, me amar e me apoiar. Vocês são meu bem mais precioso, meu orgulho. Não importa aonde eu vá ou quanto tempo eu demore para voltar, vocês sempre estarão comigo. Meu muito obrigada a vocês!

Aos meus amigos, próximos e distantes... pela amizade, por acreditarem no meu potencial, torcerem por mim e vibrarem comigo em cada vitória; mas, também por tornarem os momentos difíceis mais amenos com a atenção e o amor que sempre me deram. Obrigada Mayara, Sidney, Lucilene, Cláudia, Gustavo, Franciele, Jovana, Tamara, Bosko, Meire, Rosely, Felipe, Martin e Uli.

A todos os professores, pelo conhecimento e atenção... aos técnicos e funcionários pela simpatia, atenção, e dedicação e à Unesp pela oportunidade.

Às abelhas por serem tão fofas e inteligentes e contribuírem para a realização deste estudo, em prol do desenvolvimento neurocientífico.

Ao Programa BIOprospecTA/FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (Proc. 2015/13542-6 e Proc. 2016-26025-5) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e intelectual, que confiaram em mim e torceram por mim... muito obrigada!

Obrigada

Thank you

Danke

Ďakujem

Hvala

Salamat

Köszönöm

Grazie

Хвала

Děkuji

धन्यवाद

شكرا

**A gratidão é a memória do coração...
...é a porta aberta para um mundo melhor!**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos. ”

(Isaac Newton)

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos. ”

(Friedrich Nietzsche)

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende. ”

(Albert Schweitzer)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez. ”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Atualmente, as abelhas têm sido utilizadas como modelos de aprendizagem e memória, destacando a sua utilidade para a neurociência, em particular para o melhor entendimento das bases da cognição. Para isso, o reflexo de extensão de probóscide (REP) é um estímulo incondicionado (US) amplamente utilizado para acessar a habilidade das abelhas para correlacioná-la com um estímulo condicionado (CS) durante a aprendizagem e aquisição de memória. No presente estudo REP foi utilizado para estudos proteômicos do cérebro de abelhas por meio de diversas estratégias inovadoras. Proteômica *shotgun* foi aplicada ao estudo de proteínas solúvel em sistema μ LC-ESI-micrOToF-QIII e quantificação *label-free* em sistema nano-LC-LTQ-Orbitrap XL ETD, sendo o primeiro estudo de análise proteômica que chama atenção para o fato de que o comportamento reflexo (não-condicionado - US) por si só ativa diversas cascatas metabólicas, incluindo processos biológicos relacionados à memória. A análise comparativa dos perfis proteômicos para os cérebros de operárias do grupo controle e do grupo REP demonstraram uma ativação do metabolismo de compostos cíclicos/heterocíclicos/aromáticos em paralelo com o metabolismo de compostos nitrogenados. Este processo seguiu-se pela regulação negativa de proteínas envolvidas no metabolismo de metabólitos fosforilados e a regulação positiva das proteínas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos. Isto provavelmente ocorreu para fornecer energia metabólica para os processos celulares necessários para adaptar o cérebro ao REP. Além disso, foi realizada a análise do transcriptoma de cérebro de abelhas forrageiras (*naive*), a qual foi utilizada na criação de um banco de dados que reuniu as sequências depositadas no Uniprot, NCBI e sequências obtidas pela análise de transcriptoma. O estudo do proteoma de membrana em cérebro de abelhas submetidas a REP e REP-condicionado, com quantificação TMT em sistema LTQ-Orbitrap XL ETD permitiu a identificação de um total de 6.882 proteínas, dentre as quais 1.582 são proteínas de membrana e 658 apresentaram diferença de expressão entre os grupos controle, REP e REP-condicionado. Diversos importantes processos do sistema nervoso foram detectados, tais como proteínas envolvidas na transdução olfativa, proteínas de sinapse GABAérgica, colinérgica, dopaminérgica, serotoninérgica, glutamatérgica, dentre outros importantes receptores neuronais. Fica claro que se trata de um processo multicomplexo que exige a expressão/síntese de proteínas e a transdução de diferentes sinais. Sugere-se que as rotas mais correlacionadas com o processo de memória associativa (REP-condicionado vs REP) em comparação à REP vs controle sejam a transdução olfativa, sinapse dopaminérgica, sinapse glutamatérgica e sinapse GABAérgica. No caso de recuperação de memória previamente adquirida, a sinapse colinérgica (acetilcolina) parece ser de fundamental importância para o grupo REP. Estudos de validação estão sendo empregados para a melhor compreensão destes processos. Por fim, a análise proteômica *in situ* de neuropeptídeos por MALDI Imaging. Para os neuropeptídeos apidaecina, NPLP-1, SIFamide os resultados obtidos sugerem à baixa detecção de peptídeos nos indivíduos de REP com a rápida liberação e utilização dessas biomoléculas na modulação dos processos biológicos estudados, corroborando com a hipótese de que a memória e aprendizagem olfativa estão mais intimamente relacionadas com os cálices. Já para os neuropeptídeos Allostatinas e Taquicininas, a intensa marcação desses neuropeptídeos no grupo REP, sugere a síntese de neuropeptídeos através da degradação enzimática de novos precursores protéicos presentes nessas regiões do cérebro. A partir das diferentes estratégias metodológicas aplicadas espera-se ter contribuído para a compreensão da neurociência em nível de proteínas e peptídeos, e seu papel na formação de memória em abelhas.

Palavras-chave: Proteômica, espectrometria de massas, abelhas, memória e aprendizagem

ABSTRACT

Nowadays, bees have been used as models in studies of learning and memory, highlighting their utility for neuroscience, in particular for a better understanding of the bases of cognition. For this, proboscis extension reflex (PER) is an unconditioned stimulus (US) widely used to access bees' ability to correlate it with a conditioned stimulus (CS) during learning and memory acquisition. In the present study, PER was used for proteomic studies of bees brain through several innovative strategies. Proteomic shotgun was applied to the study of soluble proteins in μ LC-ESI-micrOTof-QIII system and label-free quantification in nano-LC-LTQ-Orbitrap XL ETD system, being the first proteomic analysis study that draws attention to the fact that reflex behavior (US) alone activates various metabolic cascades, including biological processes related to memory. The comparative analysis of the proteomic profiles for the workers' brains from control group and REP group demonstrated metabolism of cyclic / heterocyclic / aromatic compounds in parallel with the metabolism of nitrogen compounds. This process was followed by the negative regulation of proteins involved in metabolism of phosphorylated metabolites and the positive regulation of proteins related to the metabolism of carbohydrates. This has probably occurred to provide metabolic energy for the cellular processes needed to adapt the brain to PER. In addition, the transcriptome analysis of foraging bees brain was performed, which was used in the creation of a database that gathered the deposited sequences in the Uniprot, NCBI and sequences obtained by the transcriptome analysis. The study of membrane proteome in the brain of PER and PER-conditioned bees with TMT quantification in the LTQ-Orbitrap XL ETD system allowed the identification of 6,882 proteins, of which 1,582 were membrane proteins and among them 658 presented differential expression between control, REP and REP-conditioned groups. Several important processes of the nervous system have been detected, such as proteins involved in olfactory transduction, synapses GABAergic, cholinergic, dopaminergic, serotonergic e glutamatergic, among other important neuronal receptors. It is clear that this is a multicomplex process that requires the expression / synthesis of proteins and different transduction signals. It is suggested that the routes most correlated with the associative memory process (PER-conditioned vs PER) compared to PER vs control are olfactory transduction, dopaminergic synapse, glutamatergic synapse and GABAergic synapse. In the case of previously acquired memory recovery, the cholinergic synapse (acetylcholine) seems to be of fundamental importance for the PER group. Validation studies are being used to better understand these processes. Finally, it was applied the in situ proteomic analysis of neuropeptides by MALDI Imaging. For the neuropeptides apidaecin, NPLP-1, SIFamide the results obtained suggest the low detection of peptides in REP individuals with the rapid release and use of these biomolecules in the modulation of biological processes studied, corroborating with the hypothesis that, probably, memory and olfactory learning are more closely related to the chaperones. For the neuropeptides Allostatin and Tachykinins, the intense labeling of these neuropeptides in PER group suggests the synthesis of neuropeptides through the enzymatic degradation of new protein precursors present in these regions of the brain. From different methodological strategies applied it is expected to have contributed to the understanding of neuroscience at the level of proteins and peptides, and their role in memory formation in bees.

Key words: Proteomics, mass spectrometry, bees, memory and learning

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mosaico fluído da membrana celular.....	34
Figura 2. Esquema representativo de preparo de amostra utilizando-se FASP.....	38
Figura 3. Esquema representativo de cromatografia de fase reversa.....	39
Figura 4. Esquema representativo de peptídeo com estado de carga ionizado e neutro.....	40
Figura 5. Relação existente entre o número de proteínas presentes na amostra, número de proteínas identificadas e o número de proteínas quantificadas.....	41
Figura 6. Estrutura química genérica do reagente TMT.....	43
Figura 7. Variabilidades do reagente TMT. (A) TMT ⁰ ; (B) TMT ² ; (C) TMT ⁶ e (D) TMT ¹⁰	44
Figura 8. Esquema representativo de um exemplo fluxo de trabalho empregado quando se utiliza o reagente TMT.....	45
Figura 9. Forrageira de <i>A. mellifera</i> 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.....	57
Figura 10. Diagrama de Venn para as proteínas identificadas nos cérebros de abelhas do grupo controle (C), e do grupo REP (E), com o uso do sistema QToF.....	66
Figura 11. Processo Biológico – Proteínas comuns aos grupos controle e REP.....	67
Figura 12. Processo Biológico – Proteínas identificadas somente no grupo controle.	74
Figura 13. Processo Biológico – Proteínas identificadas somente no grupo REP.....	84

Figura 14. Representação em formato de teia da distribuição funcional das proteínas identificadas em ambos os grupos (verde). O número entre parênteses corresponde ao número de proteínas identificadas em cada grupo funcional..... 87

Figura 15. Representação em formato de teia da distribuição funcional das proteínas identificadas no grupo controle (azul) e no grupo REP (vermelho). O número entre parenteses corresponde ao número de proteínas identificadas em cada grupo funcional..... 88

Figura 16. Rede de interação de proteínas identificadas somente no grupo controle. Rac1; RPL8 – Ribosomal protein L8; Cdc42; asf1 - anti-silencing factor 1; Rpl40 - Ribosomal protein L40; Sir2; foxo - forkhead box%2C sub-group O; Akt1; ird5 - immune response deficient 5; WASp; RpS3A - Ribosomal protein S3A; FOR – foraging; Pak; tlk - Tousled-like kinase; CaMKII - alcium/calmodulin-dependent protein kinase II..... 89

Figura 17. Rede de interações de proteínas identificadas soemente no grupo REP. Sgg – shaggy; Rala - Ras-related protein; Smg1; Egfr - Epidermal growth factor receptor; rho – rhomboid; Argos; Shc - SHC-adaptor protein; Cbl; sec5; Pgk - Phosphoglycerate kinase; Eno – Enolase; spi – spitz; Ras85D - Ras oncogene at 85D; Pyk - Pyruvate kinase; Axn – Axin; dco - discs overgrown; Ephrin; arm – armadillo; Pld - Phospholipase D..... 90

Figura 18. Rede de interação de algumas proteínas identificadas somente no grupo REP e classificadas de acordo com a base GO. A: desenvolvimento do sistema nervoso central; B: desenvolvimento de olhos e antena e C: desenvolvimento de estruturas anatômicas..... 91

Figura 19. Rede de interação de algumas proteínas identificadas somente no grupo REP e classificadas de acordo com a base GO. A: diferenciação de neurônios/neurogênese; B: morfogênese de estruturas anatômicas..... 91

Figura 20. Rede de interação de algumas proteínas identificadas somente no grupo REP e classificadas de acordo com a base GO. A: aprendizagem e memória; aprendizado olfativo e cognição; B: transmissão sináptica..... 92

Figura 21. Diagrama de Venn para as proteínas identificadas nos grupos controle e experimental, identificadas com o uso do sistema LTQ-Orbitrap XL ETD..... 94

Figura 22. Categorização de todas as proteínas identificadas no cérebro da abelha (considerando os grupos controle e REP) em processo biológico de nível 4 de acordo com a análise pelo Blast2GO..... 95

Figura 23. Categorização de acordo com o processo biológico em nível 4 usando o algoritmo Blast2GO para as proteínas únicas de cada grupo: **(A)** proteínas identificadas apenas no controle grupo; **(B)** proteínas identificadas apenas no grupo REP..... 103

Figura 24. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para (A) proteínas identificadas apenas no grupo controle; (B) Morte celular, (C) Desenvolvimento do sistema nervoso, neurogênese e diferenciação neuronal e (D) Proteólise envolvida no processo de catabolismo de proteína. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas..... 105

Figura 25. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para **(A)** proteínas identificadas apenas no grupo REP; **(B)** Processo biossintético, **(C)** Processo metabólico derivado de carboidrato, **(D)** Desenvolvimento do sistema nervoso, neurogênese e diferenciação neuronal, **(E)** Processo metabólico primário e **(F)**. Resposta ao estímulo. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas. 106

Figura 26. Quantificação *label-free* baseada nas contagens espectrais para as proteínas identificadas nos grupos controle e REP, usando o teste-T. As proteínas são plotadas como pontos de acordo com o Log₂ do valor de p (eixo x) e Log₂ do valor de TFold (eixo y). Os pontos vermelhos são proteínas que não atingiram valores satisfatórios tanto para valores “p”, como para valores de TFold (FDR com $\alpha = 0,05$); os pontos verdes são aqueles que satisfazem o valores de TFold, mas não os valores de p; os pontos alaranjados são aqueles que satisfazem valores de p, mas não de TFold. Os pontos azul representam as proteínas que satisfazem todos os filtros estatísticos. 109

Figura 27. Categorização de acordo com o processo biológico em nível 4 usando o algoritmo Blast2GO para as proteínas diferencialmente expressas: **(A)** proteínas *down-regulated* no grupo REP; **(B)** proteínas *up-regulated* no grupo REP..... 115

Figura 28. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para **(A)** proteínas *down-regulated* no grupo REP; **(B)** Sistema de desenvolvimento, estruturas anatômicas desenvolvimento e diferenciação celular, **(C)** Processo biossintético e **(D)** Regulação biológica. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas..... 117

Figura 29. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para **(A)** proteínas *down-regulated* no grupo REP; **(B)** Sistema de desenvolvimento, estruturas anatômicas desenvolvimento e diferenciação celular, **(C)** Processo biossintético e **(D)** Regulação biológica. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas..... 118

Figura 30. Fluxo de trabalho para preparo da biblioteca de RNA.....	125
Figura 31. Visão geral global do projeto sobre a análise transcriptômica que abrange o estabelecimento de uma montagem de novo e inclusão de dados de transcriptoma publicados abelha obtidos de repositórios públicos (estirpe DH4: NC_001566.1, Uniprot).	126
Figura 32. Proporção de RNA-seq mapeado nas sequências de referência de DH4...	127
Figura 33. Quantidade de proteínas onde o cluster contém um modelo de gene a partir da anotação de referência ("Match") e aqueles sem correspondência com a anotação de referência ("No match").....	127
Figure 34. Comparação <i>de novo assembled contigs</i> com as proteínas de referência...	128
Figure 35. Expressão de proteínas quinase, proteínas de membrana e receptores comparados com a expressão geral.....	129
Figura 36. Teste de reflexo de extensão de probóscide condicionado (REP-condicionado) aplicado a indivíduos forrageiros para compor o grupo REP-condicionado para estudos de aprendizagem e memória.....	133
Figura 37. Exemplo de resultado obtido através do procedimento de ultracentrifugação com gradiente de sucrose aplicado para enriquecimento de proteínas de membrana.....	134
Figura 38. Número de proteínas identificadas em cada análise. A. Cabeça inteira submetida à fração total de membrana e ao enriquecimento de membrana, seguida pela estratégia <i>shotgun</i> ; B. Cérebro dissecado submetido à fração total de membrana, fracionamento <i>off-line</i> e LC-MS/MS e C. Cérebro dissecado submetido à fração total de membrana, quantificação por TMT, fracionamento <i>off-line</i> e LC-MS/MS.....	142
Figura 39. Proteínas de membrana identificadas em: A. cabeça inteira (815); B. Cérebro dissecado (1547); C. TMT (658) e D. Total (1582).....	143
Figura 40. Anotação de GO para a análise quantitativa. A. Processo Biológico e B. Função Molecular.....	144
Figura 41. Anotação de GO para o processo de neurobiologia.....	145

Figura 42. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP..... 146

Figura 43. Agrupamento de anotações funcionais para o Cluster 73 que foram consideradas *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo de REP. Várias importantes anotações neurobiológicas são representadas no cluster... 147

Figura 44. Uma visão 2D das evidências dos treze termos / categoria dos membros presentes no Cluster 73. Verde - associação correspondente do gene-termo relatada positivamente; Preto - associação correspondente do gene-termo não relatada ainda... 147

Figura 45. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *down-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP..... 148

Figura 46. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP..... 149

Figura 47. Agrupamento de anotações funcionais para o Cluster 74 que foram consideradas *up-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle. Várias importantes anotações neurobiológicas são representadas no cluster..... 150

Figura 48. Uma visão 2D das evidências dos dezenove termos / categoria dos membros presentes no Cluster 74. Verde - associação correspondente do gene-termo relatada positivamente; Preto - associação correspondente do gene-termo não relatada ainda..... 151

Figura 49. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *down-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle..... 152

Figura 50. Agrupamento de anotação funcional para o Cluster 69 para as proteínas que foram consideradas *down-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle..... 152

Figura 51. Uma visão 2D das evidências dos sete termos / categoria dos membros presentes no Cluster 69. Verde - associação correspondente do gene-termo relatada positivamente; Preto - associação correspondente do gene-termo não relatada ainda... 153

Figura 52. Análise pelo software Blast2GO do banco de dados utilizado nas análises do proteoma de membrana.	154
Figura 53. Os 20 termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência). Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> no grupo REP quando comparado ao grupo controle.....	155
Figura 54. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas <i>down-regulated</i> no grupo REP quando comparado ao grupo controle. Vermelho - termos de GO <i>over-representated</i> ; Verde – termos de GO <i>under-representated</i> . A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.....	156
Figura 55. Os 20 termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) para as proteínas <i>up-regulated</i> . Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas <i>up-regulated</i> no grupo REP quando comparado ao grupo controle.....	157
Figura 56. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas <i>up-regulated</i> no grupo REP quando comparado ao grupo controle. Vermelho - termos de GO <i>over-representated</i> ; Verde – termos de GO <i>under-representated</i> . A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.....	158
Figura 57. Os 20 termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) para as proteínas <i>down-regulated</i> . Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.....	159
Figura 58. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas <i>down-regulated</i> no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP. Vermelho - termos de GO <i>over-representated</i> ; Verde – termos de GO <i>under-representated</i> . A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.....	160
Figura 59. Os 20 termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) para as proteínas <i>down-regulated</i> . Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas <i>up-regulated</i> no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.....	161
Figura 60. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas <i>up-regulated</i> no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP. Vermelho - termos de GO <i>over-representated</i> ; Verde – termos de GO <i>under-representated</i> . A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.....	162

Figura 61. Lista dos códigos de acessos (12) para GABA _B encontrados na literatura e que representam apenas um número KO em KEGG.....	164
Figura 62. Transdução olfativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	167
Figura 63. Transdução olfativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP e em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	168
Figura 64. Transdução gustativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> ; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	174
Figura 65. Transdução gustativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	175
Figura 66. Vesícula sináptica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> ; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	179
Figura 67. Vesícula sináptica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> ; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	180
Figura 68. Sinapse serotoninérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> ; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	184
Figura 69. Sinapse serotoninérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas	185

down-regulated; em Verde – proteínas *up-regulated*; e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....

Figura 70. Sinapse dopaminérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo..... 190

Figura 71. Sinapse dopaminérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo..... 191

Figura 72. Sinapse glutamatérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo..... 195

Figura 73. Sinapse glutamatérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated* e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo. 196

Figura 74. Sinapse GABAérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo..... 200

Figura 75. Sinapse GABAérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo..... 201

Figura 76. Sinapse colinérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo. 206

Figura 77. Sinapse colinérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas <i>down-regulated</i> ; em Verde – proteínas <i>up-regulated</i> e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.....	207
Figura 78. Estratégia geral adotada para imageamento químico dos neuropeptídeos em cérebro de <i>A. mellifera</i>	216
Figura 79. Máscara adotada para os estudos de MSI. As estruturas foram nomeadas de acordo com Rybak e colaboradores (2010).....	217
Figura 80. Imagens moleculares de moleculares de alguns neuropeptídeos, comparando os cérebros de abelhas do grupo controle (coluna da esquerda) e experimental (coluna da direita). A e B – apidaecina (GNNRPVYIPQPRPPHP-NH ₂); C e D – NPLP-1 (NVGSVAREHGLPY-NH ₂); E e F – SIFamida (RKPPFNGSIF-NH ₂)	221
Figura 81. Imagens moleculares de moleculares de alguns neuropeptídeos pertencentes às classes das taquicininas e alatostatinas, comparando os cérebros de abelhas do grupo controle (coluna da esquerda) e experimental (coluna da direita). A e B – alatostatina AmAST-1 (LPVYNFGI-NH ₂); C e D – alatostatina AmAST-3 (RQYSFGL- NH ₂); E e F – taquicinina AmTRP-5 (ARMGFHGMN-NH ₂); G e H – taquicinina AmTRP-2 (ALMGFQGVR-NH ₂)	226

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas identificadas em ambos os grupos (controle e REP).....	
Tabela 2. Proteínas identificadas somente no grupo controle.....	69
Tabela 3. Proteínas identificadas somente no grupo REP.....	76
Tabela 4. Proteínas identificadas em ambos o grupos, controle e REP.....	
Tabela 5. Proteínas identificadas somente no grupo controle.....	97
Tabela 6. Proteínas identificadas somente no grupo REP.....	99
Tabela 7. Proteínas <i>down-regulated</i> no grupo REP, quando comparadas ao grupo controle.....	110
Tabela 8. Proteínas <i>up-regulated</i> no grupo REP, quando comparadas ao grupo controle.....	112
Tabela 9. Visão geral dos genes que pertencem às proteínas da membrana, receptores ou proteínas quinase.....	129
Tabela 10. Sequências UniProt mais expressas no conjunto de dados.....	130
Tabela 11. Comparação entre as diferentes análises aplicadas ao estudo do cérebro das abelhas; número de proteínas identificadas; número de proteínas de membrana identificadas; número de proteínas com atividade de receptor; número de proteínas com função de neurobiologia (sinapse, transporte de neurotransmissores e neurogênese). A contagem foi feita com base nos termos GO.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius	HCD – dissociação por colisão de alta energia
µg – micrograma	HPLC – cromatografia líquida de alta pressão
µL – microlitro	IAA – iodoacetoamida
Ach - acetilcolina	IEF – focalização isoeletrica
ACN – acetonitrila	IR – receptores ionotrópicos
BN-PAGE – eletroforese nativa	kDa – quilo Daltons
CE – eletroforese capilar	kHz – quilo hertz
CID – dissociação induzida por colisão	kPa – quilo pascal
cm – centímetro	kV – quilo volts
CS – estímulo condicionado	LA – lóbulo antenal
DA – dopamina	LC – cromatografia líquida
Da- Daltón	M – molar
DDM - n-Dodecil-β-D-Maltoside	m/v concentração massa por volume
DTT - ditiotretol	m/z - relação massa por carga
ESI – ionização por electrospray	MALDI – ionização por dissociação à laser assistia por matriz
ETD – dissociação por transferência de elétrons	MB – corpos pedunculados
FA – ácido fórmico	MeOH – metanol
FASP - <i>Filter assisted sample preparation</i>	mM – milimolar
FDR – false rate discovery	ms – milisegundos
g – força de aceleração gravítica	MS/MS – espectrometria de massas em tandem
GABA ácido gama-aminobutírico	MSI – Mass spectrometry imaging
Glu - glutamato	
GR – receptores odoríferos	
H – hora	

MudPIT – tecnologia multidimensional de identificação de proteínas

NaCl – cloreto de sódio

Ng – nanograma

nL – nanolitro

NMDA – N-metil-aspartato

ORN – neurônios receptores olfativos

pH – potencial de hidrogênio

pI – ponto isoelétrico

QToF – quadrupolo / tempo de voo

rcf – força centrífuga relativa

REP – reflexo de extensão de probóscide

RPLC - cromatografia líquida em fase reversa

SCX – troca catiônica

SDS – lauril sulfato de sódio

SNC – sistema nervoso central

TEAB – brometo de tetraetilo de amônio

TFA – ácido trifluoracético

TMT – marcadores de massa em tandem

UA – uréia

UPLC – cromatografia líquida de ultra pressão

US – estímulo não-condicionado

UV – ultravioleta

V – volts

v - volume

v/v – volume por volume

vs – versus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Aprendizado e Memória em abelhas.....	28
1.1 Neuroproteômica.....	30
1.2.1 Proteínas de membrana.....	33
1.2.1.1 Preparo de amostra.....	34
1.2.1.2 Enriquecimento de proteínas de membrana.....	35
1.2.1.3 Espectrometria de massas vs proteínas de membrana.....	36
1.2.1.4 <i>Filter assisted sample preparation</i> (FASP).....	37
1.2.1.5 SPE e stage tip.....	38
1.2.1.6 HPLC e pré-fracionamento.....	38
1.3 Proteômica quantitativa.....	41
1.3.1 Quantificação <i>Label</i>	42
1.3.2 Quantificação <i>Label-free</i>	45
1.4 Transcriptômica.....	49
1.5 Neuropeptidômica.....	51
1.6 Imageamento molecular por MALDI.....	52
2. OBJETIVOS.....	54
PARTE I: Proteoma Citosólico.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.1 Material Biológico.....	56

3.2 Reflexo de Extensão da Probóscide (REP).....	56
3.3 Obtenção do cérebro e preparação do extrato de proteínas solúveis.....	57
3.4 Preparação do extrato de proteínas associadas aos debrís para análise <i>shotgun</i> em equipamento do tipo QToF.....	58
3.5 Análise de proteínas citosólicas e dos debrís por abordagem <i>shotgun</i> em instrumento do tipo QToF.....	58
3.6 Análise de proteínas citosólicas e daquelas presentes nos debrís por abordagem <i>shotgun</i> em instrumento do tipo Orbitrap.....	59
3.7 Identificação de proteínas	60
3.8 Quantificação de proteínas <i>label-free</i>	61
3.9 Análise funcional.....	61
3.9 Análise de rede de interações proteína-proteína.....	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Resultados obtidos por estratégia <i>shotgun</i> e análise de espectrometria de massas com instrumento micrOToF-QIII.....	62
4.1.1 Proteínas identificadas tanto no grupo controle quanto no grupo REP.....	67
4.1.2 Proteínas identificadas: exclusivamente no grupo controle.....	68
4.1.3 Proteínas identificadas: exclusivamente no grupo REP.....	75
4.1.4 Análise de rede de interação de proteínas (exclusivas ao grupo controle, ou exclusivas ao grupo REP).....	88
4.2 Resultados obtidos por estratégia <i>shotgun</i> em espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL ETD.....	93
4.2.1 Proteínas identificadas tanto no grupo controle quanto no grupo REP.....	94

4.2.2 Proteínas identificadas exclusivamente no grupo controle e exclusivamente no grupo REP com o uso do sistema LTQ-Orbitrap XL ETD.....	96
4.2.3 Proteínas comuns a ambos os grupos, mas que são diferencialmente expressas	109
5. Conclusões gerais.....	119
PARTE II: Transcriptoma.....	121
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	122
6.1 Isolamento de mRNA, fragmentação e priming	122
6.2 Cadeia primária e segunda síntese de cDNA.....	123
6.3 Purificação de cDNA de cadeia dupla.....	123
6.4 <i>End repair/dA-tail</i> da biblioteca de cDNA	123
6.5 USER excisão, enriquecimento e purificação da biblioteca PCR.....	124
6.6 Seleção de <i>Adaptor-ligated</i> DNA e sequenciamento.....	124
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
7.1. <i>Reference-guided and de novo assembly approach</i>	126
7.2 Anotação funcional.....	128
7.3 Sequências com maior grau de expressão	130
PARTE III: Proteoma de membrana.....	131
8. MATERIAL e MÉTODOS.....	132
8.1 Ensaio de REP e REP-condicionado	132
8.2 Preparo de amostra	133
8.2.1 Fração total da membrana.....	133

8.2.2 Enriquecimento de proteínas de membrana.....	134
8.3 Digestão sequencial de tripsina-quimotripsina (FASP).....	135
8.4 Fracionamento <i>off-line</i>	136
8.5 LC-MS / MS.....	136
8.6 Análise de Dados.....	137
8.7 Anotações funcionais.....	138
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	140
9.1 Criação de perfil de proteoma e estabelecimento de estratégias.....	140
9.2 Análise de quantificação.....	143
9.2.1 Análises funcionais das proteínas diferencialmente expressas.....	146
9.2.1.1 David - Functional Annotation Tool.....	146
9.2.1.2 Blast2GO.....	153
9.2.1.3 BlastKOALA.....	163
10. Conclusões gerais.....	208
PARTE IV: MALDI Imaging.....	212
11. MATERIAIS E MÉTODOS.....	213
11.1 Obtenção de cortes de cérebro de <i>Apis mellifera</i>	213
11.2 MALDI Imaging dos neuropeptídeos.....	214
11.3 Processamento dos dados de imageamento químico e Análise das Imagens.....	214
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	217
13. CONCLUSÕES.....	227

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	232
ANEXO I.....	257
ANEXO II.....	301
	CD-
ANEXOS III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XII, XII e XIII.....	ROM

1. INTRODUÇÃO

Décadas de estudos com invertebrados têm estabelecido alguns animais como modelos robustos, confiáveis e influentes para o estudo da neurobiologia. Podemos 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 ao nível comportamental, neural e molecular, o que tem proporcionado a 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 1985; SATTELLE e BUCKINGHAM, 2006).

As abelhas *Apis mellifera* são caracterizadas por apresentarem um sistema nervoso estruturado de forma simples, com relativamente poucos neurônios em relação aos cérebros de mamíferos, apresentam, no entanto, uma riqueza comportamental e uma impressionante capacidade cognitiva (MENZEL e GIURFA, 2001).

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 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 Aprendizado e Memória em abelhas

As abelhas têm um grande número de habilidades sofisticadas de aprendizagem para rastrear rapidamente a distribuição de recursos de néctar e pólen, necessários para a sobrevivência da colônia (GIURFA, 2007). 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. 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.

As habilidades olfativas das abelhas foram reconhecidas experimentalmente por Karl von Frisch (1919), que desenvolveu ensaios nos quais esses insetos visitaram um alimentador artificial que continha vários óleos essenciais (misturas de odores). No condicionamento pavloviano da extensão da probóscide por reflexo (REP), um odor (estímulo condicionado) é associado a uma solução de sacarose (estímulo não condicionado) (BITTERMAN et al., 1983). Mais recentemente, um protocolo de aprendizagem olfativa aversiva foi desenvolvido, em que 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).

O sistema nervoso opera esta transformação/associação de estímulos, detectando moléculas químicas, por meio do processamento das representações neurais e formando a percepção; esses aspectos têm sido objetos de intensa investigação, tanto em vertebrados como em insetos (GIURFA, 2007).

Sabe-se que no caso de estímulo olfativo, o primeiro processamento é o mapeamento do espaço físico de moléculas de odor para um receptor olfativo. Este passo envolve a detecção de características particulares de proteínas receptoras de moléculas, conduzidas através da transdução de sinal, e da ativação de um subgrupo de células receptoras. Este conjunto de sinais funciona com um código, que será então transportado para uma série de estruturas cerebrais, e ficarão sujeitos a tratamento e representação de odor. Em seguida, estas representações são 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 resultados fisiológicos e comportamentais (PAGE, 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).

Em abelhas, como em outras espécies, a indução de fases distintas de memória depende de parâmetros como o número e a sucessão de tentativas de treino. Segundo Müller (2012): “Empregando técnicas desenvolvidas para monitorar e manipular a atividade de cascatas de sinalização em abelhas, parâmetros de treinamento podem estar ligados a modulações temporais de cascatas de sinalização que contribuem para as diferentes fases de memória. Análises revelaram que existe uma rede dinâmica de eventos de sinalização nos lobos antenais e nos corpos cogumelares necessários para a indução e a manutenção da memória em fases distintas”.

Dentro deste contexto, pelo menos três fases de memória podem ser identificadas ao nível comportamental: uma memória de curto prazo, em nível de minutos, memória de médio prazo em nível de horas e memória de longo prazo em nível de dias e semanas (NGUYEN et al., 1994). Conforme citado por Müller e colaboradores (2012), no estudo da memória olfativa sabe-se que nos lóbulos antenais (LAs), após treinamento, ativam a protease calpaina (dependente de cálcio) e a proteína quinase-C. A calpaina atua clivando a proteína quinase-C, conduzindo à formação de proteína quinase-M (determinante na formação de memória em médio prazo). Num processo paralelo, independente, também localizado nos LAs, o treinamento induz a ativação prolongada de proteína quinase-A que é essencial para a indução de memória de longo prazo.

Além destes processos situados nos LAs, o neurotransmissor glutamato medeia eventos de sinalização nos corpos pedunculados (MBs), que contribui para a formação de memória de longo prazo. No entanto, os alvos moleculares desencadeados por estes eventos iniciais da formação de memória de longo prazo nos LAs e nos MBs ainda precisam ser identificados. Em paralelo, a memória induzida por condicionamentos que gerem memória de curto prazo é ainda desconhecida (MÜLLER, 2012).

1.2 Neuroproteômica

O sistema nervoso é responsável pelo controle de diversas atividades biológicas, tais como controle da percepção, do comportamento, da cognição, da memória, dentre outras atividades. Apesar dos grandes avanços científicos, os conhecimentos atuais sobre essa complexa estrutura biológica estão longe de explicarem suas funções. Nesse contexto, existe uma abordagem emergente nos últimos anos, que visa a compreensão ao nível molecular, dos

mecanismos envolvidos na função cerebral, sob o ponto de vista da regulação da expressão de proteínas – a neuroproteômica (BECKER et al., 2007). O termo neuroproteômica começou a ser utilizado em 2004 por Kim e colaboradores (2004) e continuou ganhando enorme aceitação como uma subárea da proteômica (BUTCHER, 2007).

A abordagem proteômica pode ser utilizada para diversas finalidades, tais como: para a identificação e caracterização de proteínas expressas pelo cérebro e/ou sistema nervoso periférico, num determinado tempo; para a identificação e compreensão das modificações pós-traducionais das neuroproteínas; para determinar mudanças no perfil proteômico em função do tempo, de mudanças ambientais, de fatores genéticos e até variações oriundas de ensaios experimentais; e para a determinação de como todas essas mudanças afetam o organismo como um todo (ALZATE, 2010).

Conforme citado por Lübec e colaboradores (2003) diversas classes de proteínas já foram identificadas no cérebro de camundongos, dentre elas cita-se: i) as proteínas de citoesqueleto, que além de serem estruturais atuam diretamente sobre o transporte e a sinalização de proteínas de outras naturezas; ii) enzimas de metabolismo intermediário, as quais são úteis na determinação de alterações metabólicas no cérebro e na avaliação do estado metabólico das células e tecidos; iii) proteínas da cadeia respiratória e do ciclo do ácido cítrico; iv) proteínas antioxidantes, que possuem grande importância na determinação de mecanismos patológicos em doenças neurológicas, além de serem úteis em diversas condições experimentais tais como as de neurotoxicidade; v) proteínas relacionadas com o proteossoma (ubiquitinação); vi) proteínas ligadas a moléculas de RNA e proteínas de transcrição e *splicing*, que possuem grande importância para a biologia molecular, pois são determinantes nas vias de divisão celular, nuclear e funções do nucléolo; vii) proteínas de choque térmico e chaperonas, que possuem múltiplas funções incluindo a proteção de proteínas recém-sintetizadas do ribossomo até seu destino final, e seu papel em inúmeros processos fisiológicos e patológicos relacionados com o enovelamento incorreto de suas estruturas e viii) proteínas neuronais, que são extremamente importantes no estudo de tumores.

Em relação aos receptores nervosos/ proteínas de membranas e as estratégias de estudo para estas proteínas, Lubec e colaboradores (2011) estudaram o receptor GABA_A, um elemento chave na sinalização e na transmissão neural, por meio da extração de proteínas de membrana do hipocampo e submissão do extrato a eletroforese nativa. As bandas do gel foram digeridas e então analisadas por nano-LC-ESI-MS/MS. Por meio da estratégia utilizada os pesquisadores descreveram 5 subunidades para o receptor GABA_A, além de 6 novos sítios de fosforilação. Lubec e colaboradores (2012) utilizaram-se desta mesma abordagem para o

estudo da subunidade alfa-3 de Na, K-ATPase em níveis de complexidade de desempenho da memória em roedores. Esta proteína é encontrada na membrana plasmática de praticamente todas as células animais, que utiliza a energia derivada da hidrólise do ATP para transportar 3 íons Na^+ e 2 íons K^+ . Desta forma, proteínas de membrana do hipocampo foram submetidas à separação por BN-PAGE e em seguida, a AT1A3 foi caracterizada utilizando-se espectrometria de massa (nano-LC-ESI-MS/MS). A partir disso, observou-se alto nível de AT1A3 e alta atividade de ATPase em ratos treinados e uma série de novos sítios de fosforilação em AT1A3. Os dados mostraram-se relevantes para a compreensão do papel da hidrólise catalítica de ATP juntamente com a troca de íons sódio e potássio através da membrana plasmática que gera o gradiente electroquímico desses íons. Os dados encontrados nos dois estudos citados anteriormente (Lubec et al., 2011 e Lubec et al., 2012) comprovam a alta eficiência da estratégia BN-PAGE/LC-MSMS para o estudo de receptores nervosos e proteínas de membrana.

Em abelhas, estudos demonstraram diferentes padrões de expressão gênica entre forrageiras e nutridoras, como por exemplo, os genes que codificam as proteínas mais abundantes de geléia real (*MRJPs*) e enzimas metabólicas (ALBERT et al., 2004 e KUCHARSKI et al., 2002), e os genes envolvidos na transdução de sinal, canal de íons, neurotransmissores, transcrição e adesão celular (SHAPIRA et al., 2001), sugerindo assim plasticidade e remodelação de propriedades neurocelulares durante o envelhecimento e desenvolvimento comportamental em abelhas (TSUCHIMOTO et al., 2004).

Embora os dados genômicos e transcriptômicos sejam extremamente relevantes, é principalmente ao nível de proteínas que se pode compreender a diversidade bioquímica e a funcionalidade da expressão gênica (GYGI et al., 1999). Assim, a análise proteômica torna-se fundamental para o alcance de uma visão real da expressão diferencial de proteínas em cérebro de abelhas sob ponto de vista ontogenético e comportamental (GARCIA et al., 2009).

Com o sequenciamento do genoma da abelha *A. mellifera* (CONSORTIUM, 2006) estes insetos tornaram-se um poderoso modelo para estudos de proteômica comparativa. Estudos recentes sobre proteômica de *A. mellifera* focaram na análise da secreção da glândula hipofaríngea de nutridoras (SANTOS et al., 2005) na composição proteômica da geléia real (FURUSAWA et al., 2008), nos neuropeptídeos no cérebro (HUMMON et al., 2006), nos corpos de cogumelo do cérebro (UNO et al., 2007) e, mais recentemente, diferenças nos perfis protéicos de corpo inteiro das abelhas nutridoras e forrageiras (GARCIA et al., 2009 e HERNÁNDEZ et al., 2012).

Garcia e colaboradores (2009) encontraram grandes diferenças em expressão de proteínas, comparando-se cérebros de *A. mellifera* de forrageiras e nutridoras por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas MALDI-ToF. As abelhas que desempenham papéis de nutridoras apresentaram maior expressão das proteínas *MRJPs*, as quais estão diretamente relacionadas com a determinação de castas durante a diferenciação das larvas. Já as abelhas forrageiras apresentaram maior expressão de proteínas relacionadas com a produção de energia, com a sinalização metabólica e com o metabolismo de neurotransmissores.

Em trabalho subsequente, Hernández e colaboradores (2012) realizaram um mapeamento do proteoma do cérebro de abelhas por MudPIT e identificaram 2.742 proteínas, sendo que 17% delas apresentou expressão proteica diferencial, ao se comparar forrageiras e nutridoras por espectrometria de massas quantitativa, utilizando-se a estratégia *label-free*. Dentre as proteínas identificadas como superexpressas nas abelhas forrageiras, estão proteínas relacionadas com produção de energia, associadas ao aumento da atividade cerebral durante o processo de aprendizagem e memorização, que são acionados durante a atividade de forrageamento. Um exemplo foi a detecção da proteína quinase- A - AMPc dependente, que contribui para a formação de memória de longo prazo (FIALA et al., 1999).

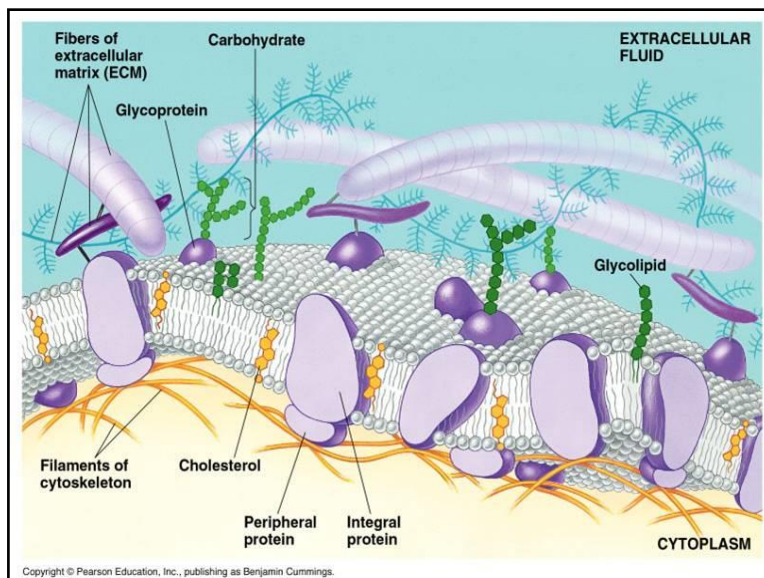
1.2.1 Proteínas de membrana

Proteínas de membrana desempenham diversas importante funções nos sistemas biológicos, dentre elas transporte transmembranar, comunicação celular, transdução de sinal, adesão celular e muitos outros processos. Entretanto, elas representam um desafio em análise proteômica em decorrência de sua baixa expressão gênica, grau de hidrofobicidade e baixo número de sítios de clivagem para tripsina (PETRAK et al., 2016).

A membrana plasmática é uma estrutura que separa a célula do ambiente celular, sendo uma estrutura dinâmica responsável pelo controle do tráfego de substâncias químicas para dentro e/ou para fora da célula (BUDIN and DERAJVA, 2012). Sua estrutura básica é composta por lípidios e proteínas de membrana que possuem funções específicas, dependendo do sub-tipo celular e do tipo celular (adesão celular, condutividade iônica, sinalização, etc). Os dois tipos básicos de grupos de proteínas de membrana são: (i) integral (constantemente ligadas à membrana) e (ii) periférica (temporariamente ligadas à membrana) (Figura 1) (KROGH et al., 2001). Mostrou-se que de 20-30% do genoma é responsável pela codificação de proteínas de membrana e que elas representam mais de 50% de todas as drogas na medicina moderna. Proteínas de membrana representam uma importante parte da medicina

moderna e das pesquisas biológicas, porque as mudanças em sua estrutura e função são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas doenças e transtornos (ALMEN et al., 2009; VON HEIJNE, 2006 and LAI, 2013).

Figura 1. Mosaico fluído da membrana celular.



Fonte: Adaptado de Campbell, Neil A.; Reece, Jane B. Biology, 7th Edition.

1.2.1.1 Preparo de amostra

Diferentes tipos de amostras biológicas são utilizados em proteômica: células, tecidos e fluídos corporais. O preparo de amostra é um passo crucial na análise de proteômica e deve ser especificamente determinada de acordo com o tipo de amostra. O procedimento ideal consiste da solubilização, desnaturação e redução, em ordem para a quebra completa de interações entre proteínas, e remoção de todos os componentes químicos que podem ter efeito negativo no preparo de amostra (RABILLOUD, 2001).

Cultura de células são menos desafiadoras para o preparo de amostras do que tecidos, em decorrência de sua estrutura simples. No caso de tecidos, a composição das amostras deve ser considerada, baseando-se em sua origem (lípidios no cérebro, conectividades de tecido na pele, etc). Em caso de amostra proveniente de pele, a melhor forma é a maceração da amostra em nitrogênio líquido, seguido pela homogenização em tampão de lise com detergente, redutores e inibidores de proteases/fosfatases (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007). Homogenização mecânica pode ser combinada com homogenização ultrasônica. A vantagem do ultrassom é que além de homogeneização, também provê emulsificação, dispersão e suspensão de misturas (PACHECO, 2003; WATKINS et al, 1999; JOO et al., 2003).

Em caso de lipídeos, especialmente em frações de membrana provenientes de cérebro, eles podem influenciar a solubilidade protéica, bem como o pI e a massa molecular. Dependendo do método aplicado para análise proteômica, os lipídeos podem ser removidos por TCA ou precipitação com acetona, ou pela centrifugação de amostras com tampão de amostra que inclua CHAPS ou SDS (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007). O método mais comum para a remoção de lipídios de amostras biológicas é a combinação de Uréia/Tioureia/CHAPS com a centrifugação utilizando filtro *cut-off* (de 3 a 100 kDa). Estudos mostram que o método não só remove os lipídeos como também, sais. Estima-se que, desta forma, mais de 90% das proteínas são solubilizadas (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007 and JOO et al., 2003).

O método de preparo de amostra e de separação depende dos objetivos do projeto de pesquisa e do tipo de análise a ser desenvolvida.

1.2.1.2 Enriquecimento de proteínas de membrana

Após a extração e o isolamento de proteínas, pela nativa estrutura, estarão insolúveis. Para viabilizar a solubilização de proteínas e expor os sítios de clivagem da enzima, as interações em proteínas devem ser quebradas (pontes dissulfeto, interações iônicas e hidrofóbicas) (RABILLOUD, 1996). Dependendo do método de separação, diferentes reagentes podem ser utilizados, dentre eles SDS, uréia/tioureia, DTT, iodoacetamida e etc.

Análises de extratos de proteínas oriundas de células inteiras permanecem um grande desafio em função do elevado grau de complexidade e da ampla faixa dinâmica em abundância das proteínas. Já a separação de proteínas em regiões subcelulares é uma estratégia amplamente aplicada na investigação de proteínas de interesse presentes em uma fração, como proteínas de membrana as quais estão presentes em concentrações relativas baixas nas células (ZHANG et al., 2011). De acordo com a literatura disponível, o gradiente de centrifugação por densidade (utilizando sucrose, sorbitol, Ficoll ou Percoll), é uma das técnicas mais comumente utilizadas para a separação de proteínas de membrana (ZHANG et al., 2005 e ZHANG et al., 2006), mitocondriais (HUNGIZER et al., 2006 e REIFSCHNEIDER et al., 2006), Golgi e vesículas sinápticas (BURRE et al., 2006 e COUGHENOUR et al., 2004).

Existem dois principais tipos de centrifugação por gradiente de densidade: separação por índice regional (tamanho) e separação isopícnica (densidade). No caso da separação por índice regional, a sacarose com maior concentração molar fica no fundo do tubo, e então a densidade é gradualmente reduzida para o topo do tubo. Já no caso da separação isopícnica,

duas ou mais camadas de sucrose em diferentes densidades são depositadas no tubo, levando-se em conta que a densidade máxima de sucrose é maior do que as das partículas de interesse (amostra).

Além da ultracentrifugação, utiliza-se também uma combinação de clorofórmio e metanol para o enriquecimento da fração da membrana. Este método baseia-se na hidrofobicidade de proteínas transmembranares associadas à membrana (FERRO et al., 2000). Além disso, Sivars e Tjereld (2000) e Everberger e colaboradores (2004) descreveram o papel de detergentes tais como n-Dodecil- β -D-Maltoside (DDM), TritonX-114 e polietilenoglicol (COLLABORATION et al., 2013) neste tipo de aplicação. As vantagens dos sistemas aquosos de duas fases são numerosas: separação rápida, estabilidade das biomoléculas, uso em larga escala e a suplementação do sistema com protease / fosfatase.

1.2.1.3 Espectrometria de massas aplicada ao estudo de proteínas de membrana

A análise por espectrometria de massas de uma mistura complexa é muito difícil de analisar completamente devido ao número esmagador de componentes. Este problema é exacerbado pela digestão enzimática de uma amostra em um grande número de produtos peptídicos. O sucesso da cromatografia líquida MS (LC-MS) e do MS em tandem (LC-MS / MS) depende de amostras limpas com a limitação da complexidade da amostra para minimizar a supressão de íons por espécies de alta abundância e prevenir a subamostragem de peptídeos. Embora as proteínas intactas sejam tipicamente estudadas por eletroforese em gel, os fluxos de trabalho de espectrometria de massa mais comuns para amostras de proteína complexa analisam peptídeos, que são mais fáceis de serem fracionados por LC do que as proteínas e ionizam e fragmentam mais eficientemente do que proteína. Além disso, os espectros resultantes são mais fáceis de serem interpretados. A preparação de peptídeos envolve a redução e alquilação de cisteínas, a digestão da amostra em peptídeos, a dessalinização e a concentração dos peptídeos, seguida pela análise dos mesmos por estratégias de MS baseadas em MALDI-MS ou ESI (LC-MS e LC-MS / MS).

A complexidade da amostra afeta negativamente a capacidade de detectar, identificar e quantificar proteínas de baixa abundância por MS, porque os peptídeos de proteínas de alta abundância podem mascarar a detecção de proteínas de baixa abundância. Por conseguinte, quanto mais uma amostra puder ser simplificada e maior a gama dinâmica das concentrações de proteína possa ser reduzida, maior será a capacidade de detectar proteínas a concentrações muito baixas.

As estratégias de depleção e enriquecimento foram desenvolvidas para remover proteínas altamente abundantes ou isolar proteínas alvo na amostra, respectivamente. A depleção é mais frequentemente utilizada para reduzir a complexidade de amostras biológicas, tais como sangue ou soro, que contêm altas concentrações de albumina e imunoglobulinas. Uma desvantagem significativa para esta abordagem, porém, é que proteínas abundantes muitas vezes se ligam a outras proteínas, o que poderia resultar no esgotamento de complexos com proteínas de baixa abundância.

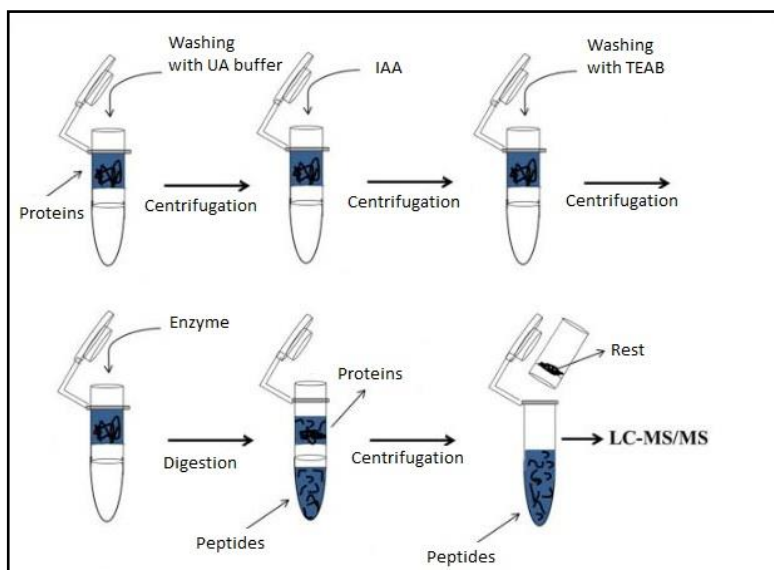
1.2.1.4 Filter assisted sample preparation (FASP)

Quer sejam simples ou complexas, as amostras necessitam frequentemente serem processadas de várias formas para assegurar que são compatíveis e estão otimizadas para a digestão e análise por espectrometria de massa. Por exemplo, uma vez que a MS mede íons carregados, os sais, especialmente os sais de sódio e fosfato, devem ser removidos antes da MS para minimizar a sua detecção.

Nos últimos anos, principalmente como resultado da introdução da preparação de amostras assistida por filtro (FASP) e do estabelecimento da captura de superfície celular (CSC), este cenário está mudando. O FASP apresenta várias vantagens: (i) digestão protéica livre de ácidos nucleicos e outros componentes celulares, (ii) ser aplicada a amostras contendo altas concentrações de detergentes, (iii) não há precipitação e a concentração da amostra é mantida elevada e (iv) num dispositivo de filtro único podem ser processadas entre 0,2 - 200 µg de proteína total. Em suma, o método combina as vantagens da digestão *in-gel* e em solução comumente usada em espectrometria de massa.

O método permite também a digestão da amostra se utilizando diferentes enzimas (por exemplo, tripsina e quimotripsina). Está bem documentado que a eluição dos peptídeos após a primeira digestão (com tripsina) altera o equilíbrio da reação de clivagem, o que por sua vez facilita a digestão de proteínas menos abundantes, bem como a digestão de sítios de clivagem com menor afinidade para a enzima (FONSLOW et al., 2014, FONSLOW et al., 2014). Neste caso, é possível aplicar quimotripsina ao mesmo filtro (mesma amostra) após a eluição de digestões com tripsina. Os digestos originados de ambos os procedimentos são submetidos à espectrometria de massa (separadamente) e os resultados são analisados por bioinformática resultando em uma lista maior de proteínas identificadas com alta porcentagem de cobertura protéica. O procedimento geral para FASP é mostrado na Figura 2.

Figura 2. Esquema representativo de preparo de amostra utilizando-se FASP.



Fonte: Criado pelo autor, 2017.

De acordo com Wiśniewski (2016), o método FASP pode resultar em 1,5 a 2 vezes mais peptídeos do que o método em solução usualmente utilizado na análise proteômica e a reprodutibilidade de acordo com a correlação de Pearson é $r \geq 0,98$ entre medidas FASP únicas. Além de permitir a análise de proteínas de membrana, os peptídeos eluídos do filtro apresentam alta grau de pureza e elevada cobertura protéica (WIŚNIEWSKI et al., 2009).

1.2.1.5 SPE e stage tip

O enriquecimento de peptídeos alvo específicos e a limpeza da amostra são necessários para a análise bem-sucedida de proteínas de baixa abundância ou a identificação de peptídeos pós-translacionalmente modificados. Após o enriquecimento de peptídeos, os sais e os tampões podem ser removidos utilizando-se ponteiras ou colunas C_{18} e os detergentes podem ser removidos utilizando colunas de afinidade ou reagentes que precipitam o detergente. As amostras diluídas podem também ser concentradas utilizando concentradores de diferentes intervalos de corte de peso molecular (PMCO).

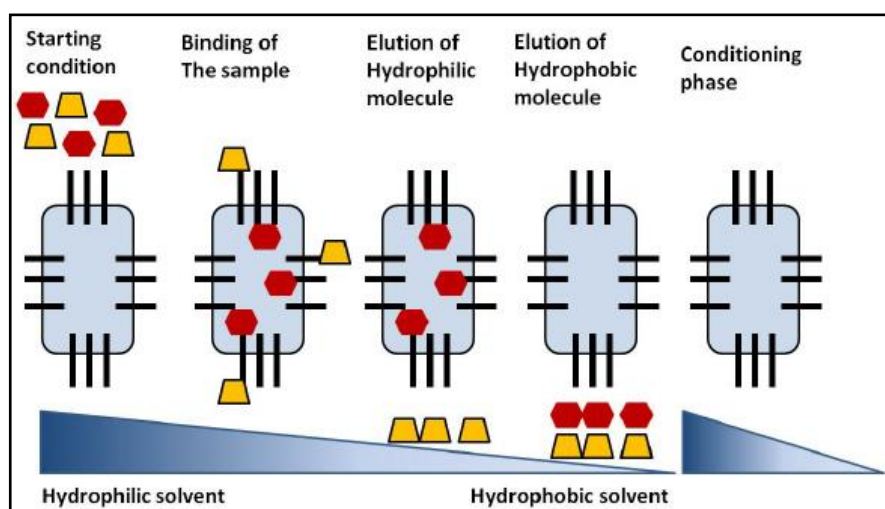
1.2.1.6 HPLC e pré-fracionamento

A cromatografia é uma técnica analítica para separar uma mistura de substâncias químicas em componentes individuais com base em diferentes propriedades de cada componente. Em princípio, a separação dos componentes depende da afinidade dos constituintes para a fase estacionária e da sua solubilidade com a fase móvel.

A cromatografia líquida de alta eficiência ou a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) utiliza uma fase estacionária sólida com uma fase móvel líquida. A pressão operacional durante a separação é entre 50 e 350 bar, o que é significativamente maior do que na cromatografia regular. O volume da amostra é menor (poucos microlitros), o diâmetro da coluna analítica é de 2,1-4,6 mm e é embalada com partículas sorventes do tamanho de 2-50 μm . Todas essas características físicas dão ao HPLC uma alta resolução na separação da mistura de compostos.

Aplicado à análise proteômica, o sistema de HPLC mais comumente utilizado para a separação de peptídeos é a cromatografia líquida em fase reversa (RPLC). Isto envolve a separação de peptídeos com base na sua hidrofobicidade. O RPLC é realizado numa fase estacionária hidrofóbica (C_{18}) com uma fase móvel polar de gradiente ácido. A fase estacionária é constituída por C_{18} polimérico (hidrocarboneto de octadecilo) integrado através de uma sililação tri-funcional de 2 ou 3 átomos de sílica no esqueleto de gel de sílica. Isto aumenta os resultados de sililação com uma maior estabilidade da coluna, particularmente em condições de fase móvel ácida. Os peptídeos hidrofílicos passam através da coluna e são eluídos em primeiro lugar; isto resulta na eluição sucessiva de peptídeos hidrofóbicos pela alteração da composição da fase móvel (aumentando a percentagem do solvente orgânico) (Figura 3) (MOLNAR, 1996).

Figura 3. Esquema representativo de cromatografia de fase reversa.



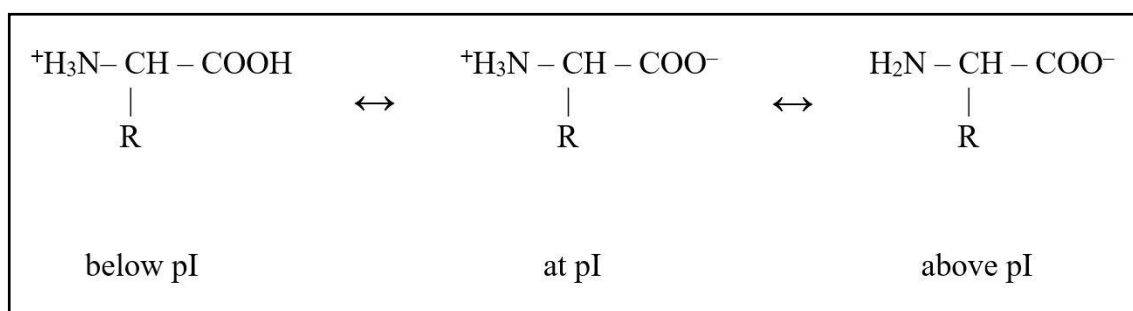
Fonte: Modificado de Cuatrecasas, 1976.

Dada a vasta gama de proteínas de amostras biológicas, a separação bidimensional a nível de peptídeos pode ser realizada para reduzir a complexidade da amostra. Isto é

conseguido empregando-se dois ou mais métodos com diferentes seletividades de separação (ZHANG et al., 2010). A cromatografia líquida bidimensional, 2D-LC, consiste-se em uma cromatografia líquida para os peptídeos de pré-fracionamento seguida das análises LC MS / MS individuais das frações separadas. As estratégias / modos de separação atuais incluem: troca de catiônica (SCX), focalização isoelétrica (IEF), eletroforese capilar (CE), focalização isoelétrica capilar (CIEF) e fase inversa de pH em modo misto (RP-RP). (SLEBOS et al., 2008). Tradicionalmente, a SCX era a abordagem clássica de pré-fracionamento de peptídeos. Outros métodos além do SCX foram desenvolvidos em decorrência da necessidade de dessalinização de amostra antes da análise LCMS levando a perda de amostra de até 50%. Além disso, a resolução de peptídeos em tampões iônicos é uma preocupação devido à supressão iônica de espécies durante análises de EM.

O advento de RPLC / RPLC 2D que utilizam tampões que possuem baixa concentração salina ou até mesmo que não utilizam tampões salinos acabou por substituir SCX. MudPIT (2D RPLC / RPLC) é uma técnica proteômica baseada em cromatografia, na qual uma amostra peptídica complexa é separada primeiro em frações e depois cada fração é analisada separadamente no sistema RPLC-MS / MS. Gilar e colaboradores (2005) demonstraram que o valor de pH diferente da fase móvel tem um impacto crucial na qualidade da RPLC na análise de MudPIT. Os peptídeos contêm grupos funcionais carboxílicos (RCOOH) ou básicos (RNH₂). Quando o pH do tampão é igual ao ponto isoelétrico de um peptídeo, o peptídeo estará em ambos os estados: ionizado e neutro (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo de peptídeo com estado de carga ionizado e neutro.



Fonte: Criado pelo autor, 2017.

O estado zwitteriônico tem retenção fraca nas colunas de fase reversa. A retenção do peptídeo pode ser melhorada modulando o pH da fase móvel aquosa. Em pH baixo, as espécies positivamente carregadas dominam e em pH elevado, dominam espécies carregadas negativamente. Em cada uma destas duas condições (abaixo ou acima do seu isoelétrico pI), o

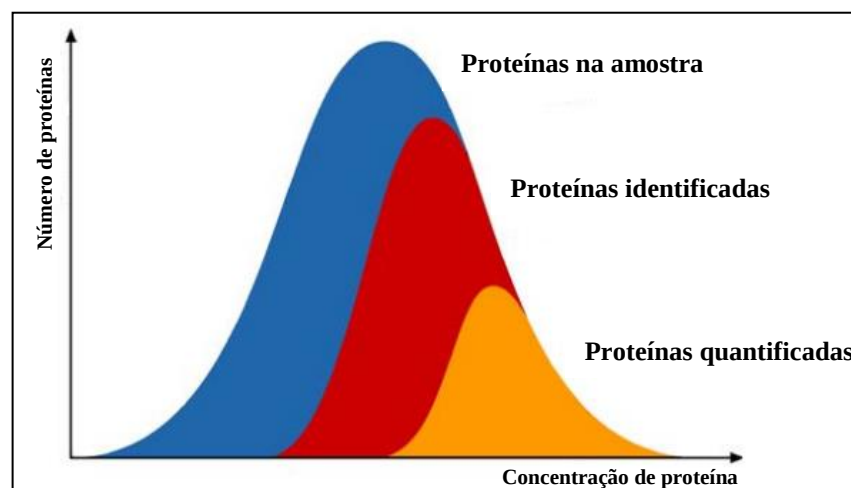
analito adquire um "estado suprimido de íons". A eluição dos peptídeos retidos é então realizada aumentando-se o gradiente de solventes orgânicos (ACN, MeOH, iPrOH). Por pré-fracionamento dos peptídeos a pH 10 seguido de LC MS/MS a pH 2,6, a maior ortogonalidade é obtida com C₁₈ (GILAR et al., 2005).

1.3 Proteômica quantitativa

A identificação qualitativa de milhares de proteínas em amostras biológicas é bem estabelecida em análise proteômica. Pesquisas da última década estão colocando esforços no desenvolvimento de métodos para quantificar essas proteínas. Devido à natureza dinâmica e interativa das proteínas, a proteômica quantitativa é consideravelmente mais complexa do que a simples identificação de proteínas em uma amostra.

Em 2007, Bantscheff e colaboradores fizeram um esquema da relação entre o número de proteínas existentes em uma amostra biológica, o número de proteínas identificadas, e também a quantidade individual de cada proteína (Figura 5).

Figura 5. Relação existente entre o número de proteínas presentes na amostra, número de proteínas identificadas e o número de proteínas quantificadas.



Fonte: modificado de Bantscheff et al., 2007.

A maioria dos métodos proteômicos quantitativos desenvolvidos até o momento implicam na marcação isotópica de proteínas ou peptídeos nos grupos experimentais analisados por espectrometria de massas. Métodos de quantificação relativa (SILAC, ICAT, ICPL e marcadores isobáricos) são usados para comparar a abundância de proteínas ou peptídeos entre amostras, enquanto que as amostras não marcadas com concentrações conhecidas de peptídeos sintéticos marcados isotopicamente podem produzir quantificação

absoluta de peptídeos alvo (via SRM). As estratégias livres de marcação (*label-free*) também estão disponíveis para a quantificação relativa e absoluta. Embora essas estratégias sejam mais complexas do que a simples identificação de proteínas, a proteômica quantitativa é crítica para a compreensão da expressão global de proteínas e modificações subjacentes aos mecanismos moleculares de processos biológicos e estados de doença.

1.3.1 Quantificação *label*

Nas abordagens que se realiza uma marcação nas amostras (quantificação *label*), as amostras são diluídas em isótopos estáveis, partindo-se do princípio de que um peptídeo marcado com isótopos estáveis é idêntico a seu peptídeo nativo e, por consequência, ambos se comportarão da mesma forma durante a cromatografia líquida e a análise por espectrometria de massas. A partir disso será possível identificar a diferença a partir dos dados obtidos na espectrometria de massas entre a forma marcada e não marcada de um peptídeo apenas pela comparação da intensidade de sinal no espectro (BANTSCHIEFF et al., 2007).

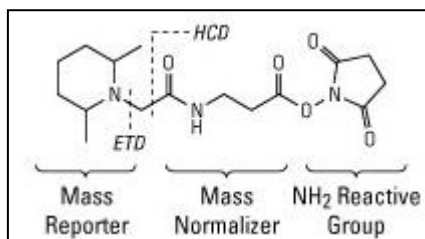
Diversas marcações químicas têm surgido recentemente, dentre elas as principais são a marcação com O-18 (WU et al., 2007), aminoácidos marcados com isótopos estáveis em cultura aminoácidos marcados em cultura (SILAC) (MANN, 2006), iTRAQ (WIESE et al., 2007) e ICAT (SHIIO e AEBERSOLD, 2006).

Tandem mass tags (TMT)

Os marcadores de massa em tandem (TMT ou TMTs) são marcadores químicos utilizados para quantificação de macromoléculas biológicas baseadas em MS, tais como proteínas e peptídeos. TMT pertence a uma família de reagentes referidos como marcadores de massa isobárica (THOMPSON et al., 2003). Proporcionam um método alternativo para a quantificação baseada em gel ou anticorpo e é possível combiná-lo com estes e outros métodos para fornecer informação quantitativa.

As marcas contêm quatro regiões, denominadas região de repórter de massa (M), uma região de ligação clivável (F), uma região de normalização de massa (N) e um grupo reativo (R) (Figura 6).

Figura 6. Estrutura química genérica do reagente TMT.

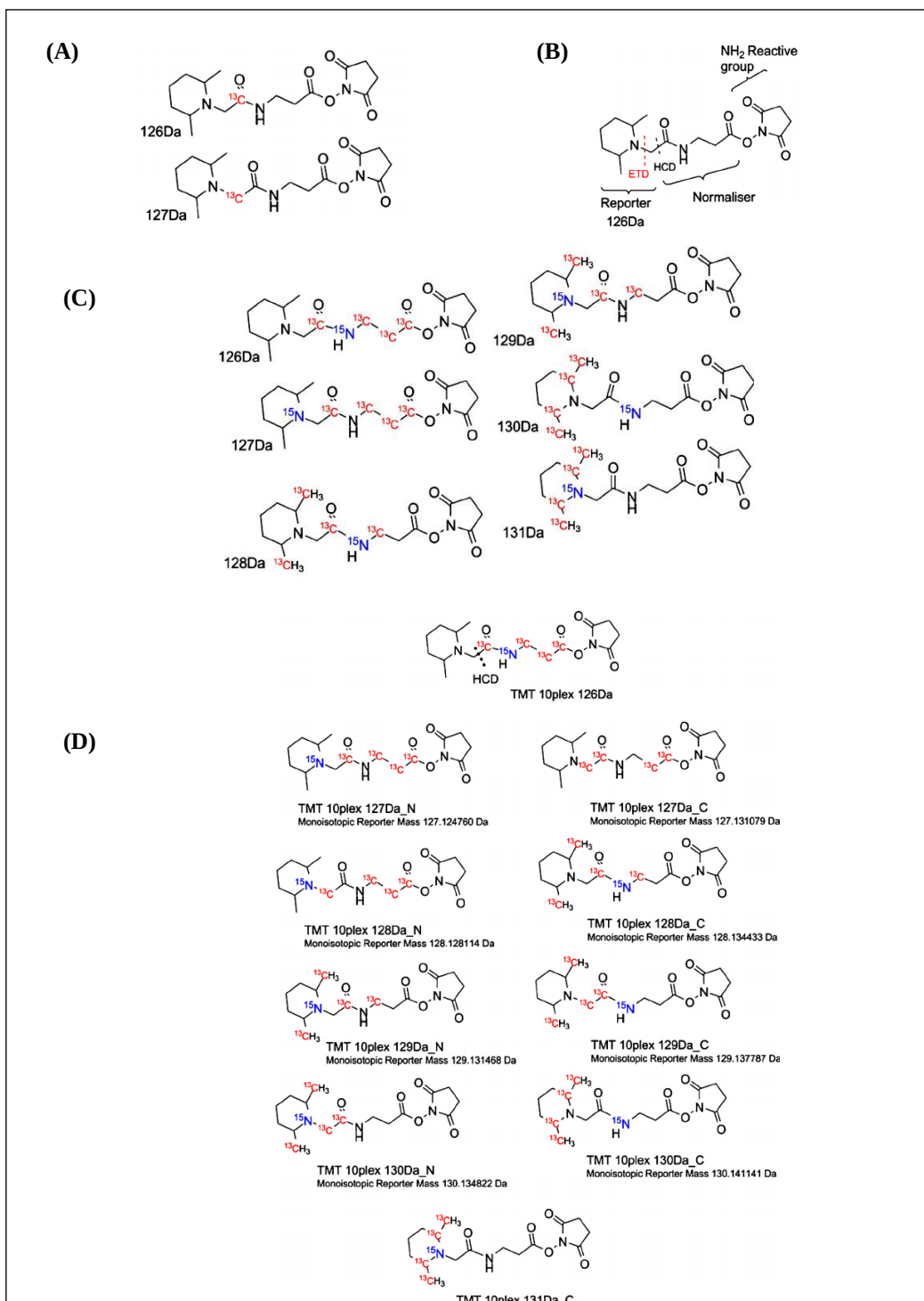


Fonte: Retirado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90111> - acessado em 15/01/2017.

As estruturas químicas de todas os marcadores são idênticas, mas cada uma contém isótopos substituídos em várias posições, de modo que as regiões de repórter de massa e de normalização de massa têm massas moleculares diferentes em cada marcador. As regiões M-F-N-R combinadas dos marcadores têm as mesmas massas moleculares totais e estrutura de modo que durante a separação cromatográfica ou eletroforética e no modo MS simples, as moléculas marcadas com etiquetas diferentes são indistinguíveis. Após a fragmentação no modo MS / MS, a informação da sequência é obtida a partir da fragmentação do do peptídeo e os dados de quantificação são obtidos simultaneamente a partir da fragmentação dos marcadores, dando origem a íons repórter de massa.

O TMT está atualmente disponível em quatro variedades: TMT0, uma estrutura nuclear não-isotopicamente substituída; TMT2, um par isobátrico de marcadores de massa com uma única substituição isotópica; TMT6, um conjunto isobárico de seis marcadores de massa com cinco substituições isotópicas e TMT10 - um conjunto de 10 marcadores de massa isotópica que utilizam a região repórter TMT6, mas utilizam diferentes isótopos elementares (contêm números e combinações diferentes de isótopos ¹³C e ¹⁵N na massa repórter) para criar uma diferença de massa de 0,0063 Da (WERNER et al., 2014 (Figura 7)).

Figura 7. Variabilidades do reagente TMT. (A) TMT⁰; (B) TMT²; (C) TMT⁶ e (D) TMT¹⁰.

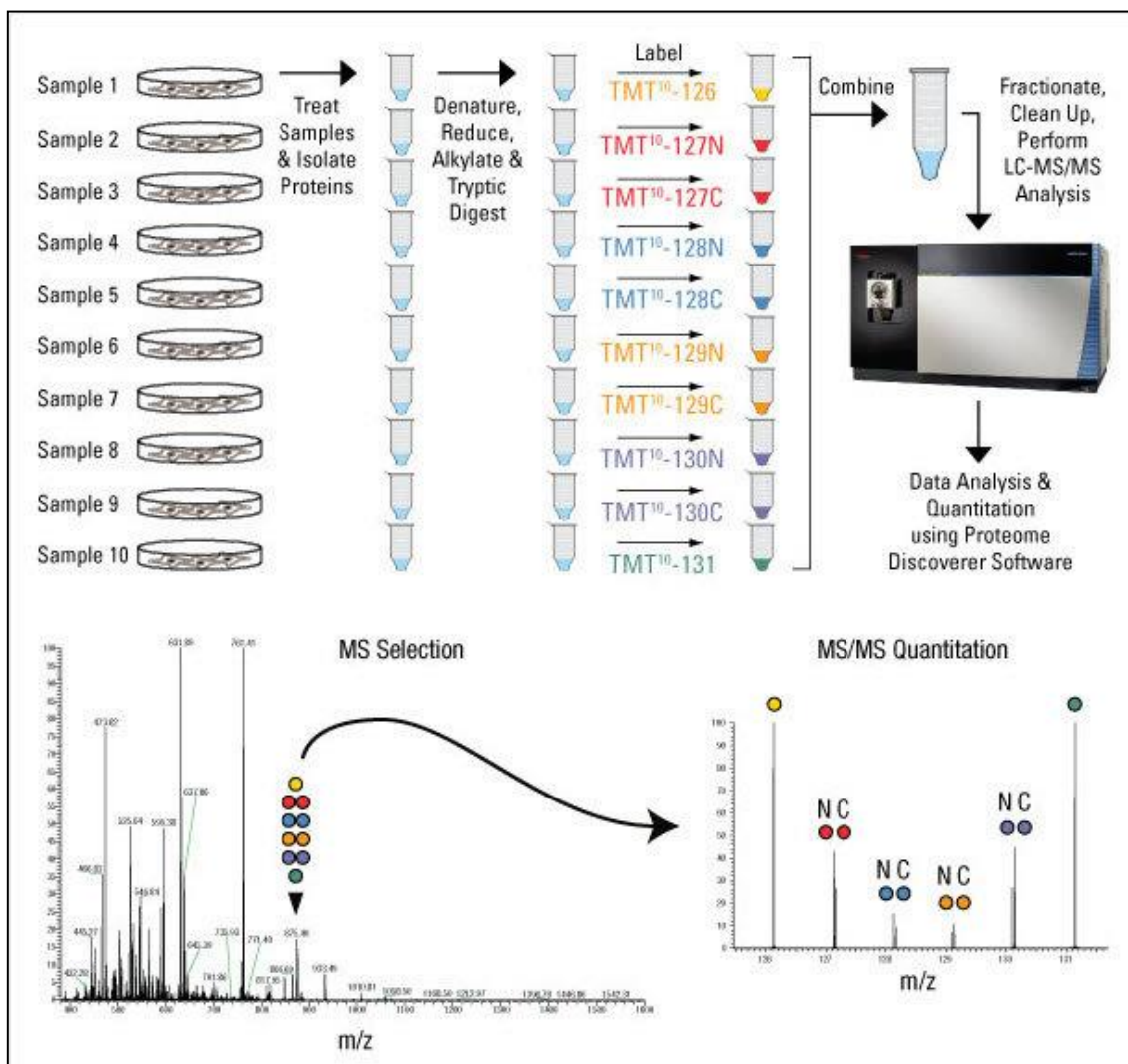


Fonte: modificado de LICIER et al., 2016.

A quantificação por marcadores isobáricos é realizada medindo-se as intensidades dos íons-repórteres de fragmento liberados a partir dos marcadores durante a fragmentação do peptídeo no modo MS em tandem (MS²). O passo de seleção de íons (no modo de exploração

completo - MS¹) é vantajoso, uma vez que reduz a complexidade dos espectros de massa (Figura 8).

Figura 8. Esquema representativo de um exemplo fluxo de trabalho empregado quando se utiliza o reagente TMT.



um limite inferior de aproximadamente 1 fmol, tanto para os fluxos isobáricos como para análises *label-free*.

Em função do elevado custo financeiro e do longo tempo necessários para a aplicação do método de quantificação por marcação com isótopos estáveis existe uma forte tendência de aplicação do método *label-free*. Além disso, a quantificação por *label-free* mantém a promessa de quantificação "*shotgun*" (ELLIOTT et al., 2009).

Para que a promessa seja alcançada, existe a enorme necessidade de uso de cromatografia ortogonal para reduzir os efeitos da supressão de moléculas pouco abundantes permitindo a detecção e a identificação até mesmo de proteínas presentes em quantidades ínfimas. Por outro lado, há o desafio de normalizar os dados de modo que a quantificação exata pode ser feita através de múltiplas amostras e de análises múltiplas.

Dado o fato de que, teoricamente, a intensidade de pico de qualquer íon deve ser proporcional à sua abundância, a espectrometria de massas tem sido utilizada há décadas como uma técnica para a quantificação de moléculas pequenas em química analítica (ABDALLAH et al., 2012).

No entanto, a variação da técnica, tanto em nível de LC quanto em nível de ionização, pode tornar as comparações de intensidades de pico entre diferentes amostras não confiáveis. Os recentes avanços nas abordagens LC / MS permitiram que estas diferenças entre amostras fossem minimizadas (ABDALLAH et al., 2012). Atualmente, a observação da correlação entre a abundância de uma proteína e a área do pico (BONDARENKO et al., 2002; CHELIUS e BONDARENKO, 2002) ou o número de espectros MS / MS (LIU et al., 2004) ampliou a escolha deste procedimento analítico para a quantificação de proteínas.

A tarefa não é fácil e softwares especiais têm sido desenvolvidos a fim de alinhar a corrida cromatográfica de peptídeos correspondentes em amostras diferentes (BYLUND et al., 2002; WANG et al., 2007; JAITLEY et al., 2006 e STRITTMATTER et al., 2003)

Para a abordagem de contagem de espectros, a quantificação de proteínas entre duas ou mais amostras é simplesmente realizada comparando os respectivos números do peptídeo em cada amostra. Se 10 espectros são observados para uma proteína na amostra 1 e 15 espectros na amostra 2, a mudança entre as duas condições é cerca de 1,5 vezes.

Rappsilber e colaboradores (2002) desenvolveram um sistema computadorizado para medir o índice de abundância de uma proteína (PAI). O valor é obtido dividindo-se o número de vezes em que um peptídeo é observado pelo número de todos os digestos trípticos que seriam possíveis de encontrar em determinada proteína. Em um refinamento posterior, o mesmo grupo transformou o PAI em uma forma modificada exponencial (emPAI)

(ISHIHAMA et al., 2005), que demonstraram ser uma melhor correlação de quantidades de proteínas conhecidas presentes na amostra.

Outros avanços têm sido feitos por meio de modelos computacionais que predizem quais os peptídeos de uma dada proteína são susceptíveis de serem detectados pelo espectrômetro de massa, e assim, se formaria uma base melhor para iniciar os procedimentos para quantificação (LU et al., 2007; TANG et al., 2006; CRAIG et al., 2005). Um exemplo deste avanço são os resultados obtidos pelo método de perfis de expressão absoluta de proteínas (APEX) (LU et al., 2007).

O método *label-free* certamente não é tão preciso quando comparado ao *label* quando se considera todo o procedimento experimental, já que todas as variações sistemáticas entre os experimentos de amostras diferentes são refletidas nos dados de espectrometria de massas obtidos no final. No entanto, o método *label-free* deve ser considerado por um grande número de razões (LU et al., 2007).

Em termos de praticidade, o método com marcação consome tempo para introdução das marcações, os quais são obtidos por meio de kits com elevado custo. Em contrapartida o método *label-free* não exige kit de preparação de amostra e nem preparação prévia da amostra, sendo o experimento de quantificação realizado no mesmo experimento em que realizado para identificação e sequenciamento das proteínas.

Segundo Lu e colaboradores (2007), em termos de estratégia de análise, alguns pontos devem ser levados em conta:

- (I) Não há em princípio um número limite de amostras que podem ser comparadas. Isto certamente é uma vantagem sobre as outras técnicas de quantificação que utilizam isótopos estáveis e limitam o número de amostras que podem ser comparadas.
- (II) Ao contrário da maioria das técnicas *label-free*, a complexidade do espectro de massas de amostras marcadas (em termos de espécies de peptídeos detectados dentro de uma determinada janela de tempo cromatográfico) não é maior, proporcionando maior profundidade analítica (isto é, número de peptídeos detectados/proteínas em um experimento), porque o espectrômetro de massas tem inúmeras formas de fragmentação do peptídeo marcado para detectar.
- (III) Este método proporciona maior gama dinâmica de quantificação que o método com marcação e, portanto, pode ser vantajoso quando as alterações de proteínas grandes entre amostras são observadas (OLD et al., 2005).

A quantificação de proteínas via espectrometria de massas pode ser resumida da seguinte forma: para duas amostras serem comparadas quantitativamente, ambas são

submetidas a LC / MS separadamente, e os valores de m/z dos íons precursores e o tempo de retenção são gerados para todos os espectros MS / MS de cada proteína identificada. A partir disto é criado um mapa 2D (m/z , rt) permitindo a comparação de cada peptídeo em diferentes amostras (ABDALLAH et al., 2012).

Duas estratégias são amplamente utilizadas na quantificação *label-free*: (I) avaliar e comparar a intensidade do sinal de íons precursores para os fragmentos peptídicos que pertencem a uma determinada proteína e (II) contagem e comparação do número de espectros de um fragmento peptídico que gerou a identificação de uma determinada proteína (BANTSCHEFF et al., 2007).

Intensidade dos picos do espectro

Baseia-se no princípio de que a abundância relativa do mesmo peptídeo em diferentes amostras pode ser calculada pela intensidade de sinal dos íons precursores através de experimentos de LC / MS consecutivos com medições em condições idênticas. O sinal do íon é então integrado e as medições do pico cromatográfico são utilizadas como uma medida quantitativa para a concentração do peptídeo original (ABDALLAH et al., 2012).

Contagem de espectros

Tem por base o raciocínio de que os fragmentos peptídicos oriundos das proteínas mais abundantes serão mais selecionados para a fragmentação e, assim, produziram um maior número de espectros MS / MS (ABDALLAH et al., 2012). Assim, o número de varreduras de MS / MS é tabulado e a abundância da proteína é inferida a partir do número total de espectros MS / MS que correspondem aos fragmentos peptídicos da proteína (LIU et al., 2004). A diferença relativa em abundância da proteína é estimada pelo cálculo do índice de abundância da proteína (PAI), que corresponde ao número de peptídeos observados, dividido pelo número de peptídeos trípticos teóricos para cada proteína (RAPPSILBER et al., 2002).

Um dos métodos mais utilizados na estratégia de contagem de espectros é de NSAF (normalized spectral abundance fator). NSAF é calculado como o número de contagens espectrais (SPC) detectadas para digestos trípticos que permitiram a identificação de uma proteína, dividido pelo comprimento da proteína (G), dividido pela soma de SPC / L para todas as proteínas no experimento. O índice NSAF permite a comparação da abundância de proteínas em várias amostras independentes e geralmente é aplicado

para quantificar as alterações na expressão de proteínas (FLORENS et al., 2006; PAOLETTI et al., 2006).

$$(N\text{SpC})_k = \frac{(\text{SpC}/L)_k}{\sum_{i=1}^N (\text{SpC}/L)_i}$$

Este tipo de quantificação tem sido amplamente aplicado em diferentes sistemas biológicos, incluindo a análise da amostra de urina de doadores saudáveis e pacientes com inflamação aguda (PANG et al., 2002), busca por biomarcadores na saliva humana (RAO et al., 2009), e identificar proteínas da membrana plasmáticas diferencialmente expressas em linhagem de células terminais de rato (SEYFRIED et al., 2008).

1.4 Transcriptômica

Transcriptômica evoluiu rapidamente nos últimos anos devido ao desenvolvimento tecnológico. O primeiro conceito de transcriptoma foi implementado em 1958 com o estabelecimento do dogma central da biologia por Francis Crick. Sugeriu-se que as informações de codificação do DNA sejam transcritas para o RNA. Eventualmente, mostrou-se que o RNA é utilizado para a síntese de proteínas de sequência específica (KOHLLER, 1997). Posteriormente, com a descoberta de RNA ribossômico e de transferência, e codificação (exons) e sequências não codificadoras (introns), o significado de RNA foi elevado para um nível diferente. Hoje sabe-se que o RNA pode ser dividido em dois grupos: codificador de proteínas (mRNA) e RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) (EDDY, 2001). Os RNAs não-codificadores de proteínas são RNAs de manutenção de domicílios (RNA_t de tradução, RNA_r ribossômico, RNA_{Ng} pequeno nuclear, RNAs pequeno nucleolar, guia-gRNA) (GESTELAND et al., 2006) e RNAs reguladores (RNA antisense; CRISPR-crRNA, longo não-codificante-lncRNA, micro-miRNA, piwi-interagindo-piRNA, pequena interferência-siRNA, curto hairpin-shRNA) (BROUNDS et al., 2006 e GHILDIYAL et al. Al., 2009). Juntas, todas essas moléculas moldam o futuro da célula e do organismo.

Devido à complexidade dos organismos biológicos, uma das primeiras questões foi - podemos ver uma correlação entre a expressão de mRNA e proteínas? Alguns experimentos mostraram que o dogma central da biologia molecular dá uma correlação positiva (ANDERSON et al., 1997, CHEN et al., 2002 e MOOTHA et al., 2003), enquanto em alguns casos, não há correlação significativa entre mRNA e níveis de proteína (LICHTINGHAGEN

et al., 2003). Nie e colaboradores (2007) especulam que a ausência de correlação pode ser causada por razões biológicas e / ou experimentais, tais como a regulação da tradução, as diferenças de meia-vida de mRNA / proteínas e limitações metodológicas (por exemplo, preparação de amostras, normalização de dados). Os polissomos eucarióticos podem ligar o RNAm ativo e iniciar um processo de síntese de proteínas, enquanto a molécula de RNAm, que é inativa, será fortemente ligada aos monossomos. Há um fluxo constante desses dois tipos de mRNA - ativo e inativo. Além disso, a falta de correlação pode ser uma consequência da rápida degradação do mRNA como resposta a diferentes estímulos (WU, 2012). Uma combinação de proteômica e transcriptômica dá uma visão significativa em todos os campos de pesquisa aplicadas, como a biologia do câncer (YEAT et al., 2015), neurociências (PAPASSOTIROPOULOS et al., 2005), ecologia, zoologia etc. mRNA, outros processos também têm uma função reguladora.

Os mais importantes são em proteínas, como modificações pós-tradução (PTMs), que são capazes de regular o nível de mRNA, síntese protéica e ativação de proteínas (CHENG et al., 2011). Um estudo de proteômica em grande escala (Mud PIT, MS / MS *tandem*) em combinação com transcriptômica pode elucidar mecanismos regulatórios e redes complexas de sinalização em organismos vivos.

O conhecimento básico acumulado sobre os processos biológicos foi ampliado graças aos extensos estudos sobre organismos-modelo animais e vegetais. Os mais utilizados são *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio* e *Xenopus laevis* (FIELDS, 2005). Comum em todos estes casos é que eles estão bem estudados e que os seus genomas foram sequenciados, juntamente com material genético de mitocôndrias / cloroplasto. A análise transcriptômica de organismos modelo é uma ferramenta poderosa usada para investigar mudanças de mRNA sob um tratamento ou condição especial e como é diferente do status de mRNA já conhecido (SEOK et al., 2013). Por outro lado, a transcriptômica em tecidos humanos modificados patologicamente têm um tremendo impacto no conhecimento recolhido sobre o perfil de expressão e / ou resposta à terapia (YEOH et al., 2003). Alternativa aos organismos-modelo é um amplo espectro de estudos *in vitro* em diferentes tipos de culturas celulares. Além disso, é possível ter um modelo animal de uma doença.

1.5 Neuropeptidômica

A neuropeptidômica é a abordagem tecnológica voltada para a análise detalhada de peptídeos endógenos do sistema nervoso (VERHAERT, et. al. 2001; BROCKMANN et al., 2009; BOERJAN et al., 2010). Os neuropeptídeos são moléculas mensageiras, presentes em todos os animais que apresentam um sistema nervoso, desde os invertebrados até os vertebrados mais derivados, tais como os mamíferos (HOKFELT, et al., 2000; HOLMGREN e JENSEN, 2001). Essas moléculas desempenham papéis de sinalização tanto nervosos quanto endócrinos, estando envolvidas na regulação de quase todos os processos fisiológicos no reino animal, tais como o desenvolvimento, reprodução, crescimento, metamorfose, alimentação, homeostase, memória e o comportamento. De maneira geral, essas moléculas estão envolvidas em diversas funções do sistema nervoso, podendo atuar na modulação de respostas somáticas diversas. Desse modo, os neuropeptídeos representam, dentre as moléculas mensageiras do cérebro, um dos grupos com maior diversidade estrutural e de grande importância na modulação de processos fisiológicos e comportamentais, uma vez que podem funcionar como neuro-hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores (BROCKMANN et al., 2009).

Como todos os insetos, as abelhas têm um grande número de diferentes neuropeptídeos putativos e receptores de peptídeos, a maioria dos quais não se conhece a função (GALIZIA e KREISSL, 2012). Cada peptídeo tem (pelo menos) um receptor cognato, que é sensível a este peptídeo. A maioria destes receptores estão associados à proteínas-G (GPCR), que funcionam ativando uma cascata de mensageiros secundários, após a ligação do peptídeo ao seu receptor específico (MERCIER et al., 2007).

Devido a enorme importância dos neuropeptídeos na regulação de quase todos os processos fisiológicos e comportamentais, bastantes esforços têm sido realizados nas últimas décadas com a finalidade de identificar essas biomoléculas em uma grande variedade de espécies, muitas delas pertencentes à classe dos insetos (BOERJAN et al., 2010). Dentre esse grupo, as abelhas (*A. mellifera*) oferecem enormes possibilidades para o estudo da atividade dos neuropeptídeos por serem organismos considerados modelos na neurobiologia, como discutido anteriormente. Alguns estudos do tecido cerebral por espectrometria de massas revelaram a presença de vários peptídeos tais como *Allatostatin*, *Apidaecin*, *Corazonin*, *MVPV*, *Myosuppressin*, *NPLP-1*, *Orcokinin*, *PBAN*, *Perivisc*, *Tachykinin*. Alguns destes estudos incluem também a localização destes peptídeos em áreas específicas do cérebro (AUDSLEY e WEAVER, 2006). A partir destes estudos são conhecidos cerca de 70 peptídeos, distribuídos em 20 diferentes famílias de precursores (BOERJAN et al., 2010).

No presente estudo os peptídeos já descritos em literatura (BROCKMANN et al., 2009 e BOERJAN et al., 2010) terão seu mapa de distribuição no cérebro elaborados através da abordagem de MALDI Imaging para possível correlação com o ensaio de memória de curto prazo.

1.6 Imageamento molecular por MALDI

Uma das aplicações recentes da espectrometria de massas do tipo MALDI é a sua utilização para a obtenção de perfis proteômicos e de imagens moleculares de proteínas diretamente de cortes de tecidos (TODD et al., 2001; CHAURAND & CAPRIOLI, 2002; CHAURAND et al., 2004).

O imageamento molecular através da 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 (como drogas farmacêuticas), 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).

A tecnologia MALDI Imaging apresenta algumas vantagens científicas, pois possibilita adquirir as massas moleculares de macromoléculas específicas, não requer reagentes específicos, permite a realização de análises de grandes proteínas acima de 100 kDa, é favorável a protocolos de alto rendimento, adquirindo mais de 1.000 espectros por segundo, com centenas de proteínas monitoradas em um único experimento, e apresenta facilidade na preparação da amostra por ser 21 relativamente simples (HARDESTY et al.,

2008). Além disso, MALDI MSI é complementar com outras estratégias proteômicas como eletroforese bidimensional e análise LCMS / MS, uma vez que estas não nos fornecem informações a cerca da distribuição espacial das macromoléculas presentes em regiões de células no tecido. O processo consiste em cinco etapas analíticas: (1) a deposição de matriz em pontos específicos do tecido para estabelecer a distribuição de uma ou mais proteínas, segundo suas respectivas massas moleculares na imagem de MALDI-MS; (2) hidrólise ou digestão enzimática de pontos distintos do tecido, onde as proteínas de interesse estão localizadas; (3) aquisição de espectros de massas destes digestos utilizando-se MALDI-MS; (4) análise da sequência MS / MS e pesquisa em banco de dados, para conseqüente identificação da proteína, e (5) correlação das imagens dos peptídeos gerados (GROSECLOSE et al., 2007).

2. OBJETIVOS

Muitos dos relatos feitos acima estão relacionados com as alterações de comportamento e ontogenia em *Apis mellifera*, comprovando que a análise do perfil proteico de proteínas do cérebro contribui enormemente para a compreensão da neurociência em abelhas. Para a elucidação de problemas biológicos utilizando-se a abordagem neuroproteômica é necessário a utilização de várias ferramentas modernas de biotecnologia (ALZATE, 2010). Desse modo tivemos como objetivos gerais utilizar algumas técnicas, tais como a espectrometria de massas, a quantificação de proteínas e o imageamento molecular na tentativa de melhor compreender o sistema nervoso de abelhas.

Considerando-se que pouco se conhece sobre a neuroproteômica e neuropeptidômica associadas ao aprendizado e desenvolvimento das habilidades cognitivas em *A. mellifera*, relacionadas ao comportamento REP, o presente estudo teve como objetivos específicos:

- a) Desenvolvimento de um protocolo adequado ao estudo do proteoma citosólico do cérebro de abelhas *A. mellifera* submetidas ao ensaio comportamental REP;
- b) Quantificação por espectrometria de massas *label-free* das proteínas solúveis identificadas;
- c) Transcriptoma do cérebro de abelhas forrageiras (*naive*) *A. mellifera* para criar um banco de dados de proteínas baseado em RNAm;
- d) Desenvolvimento de um protocolo adequado ao estudo do proteoma de membrana em cérebro de *A. mellifera*;
- e) Análise do proteoma de receptores nervosos do cérebro de abelhas *A. mellifera* submetidas ao ensaio REP e REP-condicionado, bem como a análise diferencial com a utilização de quantificação por TMT dos grupos biológicos ensaiados;
- f) Mapeamento da distribuição espacial de neuropeptídeos do cérebro de abelhas *A. mellifera*, já descritos em literatura, por meio de imageamento molecular por MALDI Imaging para possível correlação com o comportamento ensaiado.

PARTE I
PROTEOMA CITOSÓLICO

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

A metodologia empregada para o desenvolvimento do trabalho utilizou cérebro de abelhas da espécie *A. mellifera* que foram mantidas em um apiário no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), UNESP – Rio Claro. A colônia que foi utilizada apresenta-se livre de doenças, bem alimentada e com uma rainha em franca postura.

Inicialmente, um favo contendo larvas (livre de abelhas) foi coletado da colônia e mantido em uma câmara incubadora (B.O.D) a 32°C e umidade relativa de 70%. 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 e devolvidas à colônia para coleta posterior quando atingirem 20 dias. Após serem coletadas, as abelhas foram submetidas ao ensaio de comportamento de memória e aprendizagem de curto prazo.

3.2 Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)

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

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. 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). Estabeleceu-se que a concentração de sacarose a ser utilizada é a de 80% (m/v). Entre cada solução 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) permaneceram em caixa de madeira em temperatura de 28°C por três horas em jejum. Em seguida, foram anestesiadas por resfriamento por aproximadamente cinco minutos e colocadas em ponteiras de pipeta automática de 1000 µL cortadas 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 2). Já contidas, as abelhas permaneceram sem alimento por mais uma hora. 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 responderam ao cotonete com água, apresentando extensão da probóscide foram desconsideradas do experimento, bem como aquelas que não o fizeram para a solução da 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 o cérebro dissecado em solução contendo *cocktail* inibidor de protease e 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, e não estendem suas probóscide (Figura 9).

Figura 9. 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.



Fonte: criado pelo autor, 2017.

3.3 Obtenção do cérebro e preparação do extrato de proteínas solúveis

Para análise do proteoma citosólico do cérebro das abelhas ensaiadas para o comportamento citado anteriormente, a cabeça de cada indivíduo foi removida, o cérebro foi dissecado com o auxílio de um bisturi. Foram utilizadas 50 cérebros para cada grupo biológico.

Extração de amostra para análise *shotgun* em instrumento do tipo QToF- Os cérebros foram macerados em presença de tampão de lise Urea 7M, Thiourea 2M, 1% DTT, 2% Triton X-100) (adaptado de Garcia e colaboradores, 2009) com adição de *cocktail* inibidores de protease. Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação de 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore de 10 kDa, quantificado pelo método de Bradford e 200µg de amostra foram separados para a digestão trípica.

Extração de amostra para análise *shotgun* em instrumento do tipo Orbitrap - utilizou-se o kit RapiGest (Waters) a 0,2% (v/v) em trietilamônio 50mM. Os cérebros foram macerados em 150 µL da solução de RapiGest por cinco minutos. As amostras foram centrifugadas a 18000 rcf por quinze minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo

tubo para que a amostra fosse quantificada. Para quantificação utilizou-se o equipamento Qubit (Invitrogen). A partir do valor de quantificação obtido, 150 µg de amostra foram separados para a digestão triptica.

Para realização da digestão triptica as amostras foram solubilizadas em tampão bicarbonato de amônio 100mM, ureia 3M, pH 7,8 e ficaram em estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, foi adicionado 10 µL de DTT (10 mM) e as amostras foram armazenadas em estufa a 37°C pelo período de uma hora. Solução de IAA (25 mM) foi adicionada e a solução foi mantida no escuro à temperatura ambiente por mais uma hora. As amostras foram então diluídas em tampão bicarbonato de amônio 100 mM na proporção 1:4. Por fim, foi adicionada enzima tripsina (Promega) (20 ng/µL) e as amostras ficaram em estufa a 37°C *overnight*. Após paralisação da reação com ácido fórmico 96% (v/v) as amostras foram submetidas a coluna Sep-Pack C18 (Waters) para concentração das amostras e então foram analisadas em: análise 1 - sistema µLC-ESI-microTOF-QIII (Bruker Daltonics) e análise 2 – sistema Easy-nLC 1000- LTQ-Orbitrap XL ETD.

3.4 Preparação do extrato de proteínas associadas aos debris para análise *shotgun* em equipamento do tipo QToF

Uma estratégia diferente e inovadora foi aplicada com o intuito de se identificar proteínas de membrana e/ou moléculas que estejam interagindo com as proteínas de membrana (receptores). Para isto, o *pellet* (debris) que normalmente é descartado em metodologias convencionais foi submetido à digestão com tripsina. Foi adicionado ao *pellet* 100 µL de tampão de lise e o extrato foi sonificado por dez segundos para então ser submetido ao protocolo de digestão realizado para o extrato solúvel; porém, para este extrato adicionou-se 80 µL (16µg - quantidade bem superior à aplicada no extrato de proteínas solúveis) de tripsina e o extrato ficou a 37°C sob agitação por 16 horas.

3.5 Análise de proteínas citosólicas e dos debris por abordagem *shotgun* em instrumento do tipo QToF

Após o preparo da amostra, uma alíquota de 5 µg foi analisada por espectrometria de massas com a utilização de um sistema µLC-ESI-microTOF-QIII (Bruker Daltonics) acoplado (“on-line”) a um sistema UFLC (SHIMADZU) contendo duas bombas LC-20AD, amostrador automático SIL-20AHT. As análises cromatográficas serão realizadas sob gradiente de MeCN de 5 a 95% (v/v), contendo 0,05% (v/v) de TFA por 70 min., utilizando-se uma coluna Discovery® BIO Wide Pore C18, 5 µm (15 cm x 1.0 mm) (Supelco Analytical). A eluição

dos componentes será monitorada por absorbância ultravioleta a 214 nm, com fluxo de 0,2 mL/min. A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização “electrospray” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas quadrupolo e “*Time-of-Flight*” (Q-ToF) (Bruker Daltonics). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento o software HyStar v3.2 (Bruker Daltonics) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface será mantida a 200° C, a voltagem na agulha a 4 kV e a voltagem no cone a 8 V. O espectrômetro de massas foi calibrado através da solução *Electrospray Calibrant* (Sigma-Aldrich). A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15.000.

Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica em condições de decomposição induzida por colisão (CID) (MS^2) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS^1 . Foi utilizado hélio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa, utilizando-se energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz, para os íons moleculares de carga +2 ($[M+2H]^{+2}$), carga + 3 ($[M+3H]^{+3}$) e assim sucessivamente.

3.6 Análise de proteínas citosólicas e daquelas presentes nos debris por abordagem *shotgun* em instrumento do tipo Orbitrap

Após o preparo da amostra, uma alíquota de 3 µg foi analisada por espectrometria de massas com a utilização de um sistema LTQ-Orbitrap XL ETD (Thermo Fischer) acoplado (“on-line”) a um sistema Easy-nLC 1000 UPLC (Thermo Fischer). As análises foram realizadas na Facility RPT02H PDTIS/Instituto Carlos-Fiocruz, Paraná. Utilizou-se coluna empacotada no próprio laboratório (75 µm x 15 cm) com resina ReproSil-Pur C18-AQ de 3.2 µm em fluxo de 500 nL/min e com eluição subsequente com um fluxo de 250 nL/min com gradiente de 5% a 40% de acetonitrila em 0.5% de ácido fórmico e 0.5% de DMSO, em uma corrida cromatográfica de 120 minutos. O espectrômetro de massas foi setado no modo data-dependente para automaticamente alternar entre os modos de aquisição de MS e MS / MS. Os full scans do espectro de MS (m/z 300-2000) foram adquiridos em analisador Orbitrap com resolution de 60.000. Os dez picos mais intensos foram sequencialmente isolados e fragmentados no *ion trap* linear utilizando-se CID. As condições gerais de aquisição utilizadas foram: voltagem do spray de 2.4 kV; temperatura do tubo de transferência dos íons de 175°C; pressão do gás de colisão de 1.3 mTorr e energia de colisão de 35% para MS / MS.

Os thresholds de seleção de íons foram 250 contagens para MS / MS. Uma ativação $q=0.25$ e tempo de ativação de 30 ms foram aplicados às aquisições de MS / MS. Replicatas técnicas foram feitas com e sem ativação de multi-estágio.

3.7 Identificação de proteínas

Abordagem *shotgun* em instrumento QToF: para as proteínas solúveis foi utilizado os softwares HyStar e oToF (Bruker Daltonics) para aquisição de todos os dados de espectrometria de massas, e o DataAnalysis (Bruker Datonics) combinado com o Mascot Distiller foram utilizados para tratar e submeter os dados combinados de MS¹ e MS². As identificações de proteínas foram obtidas através da ferramenta de bioinformática Mascot v2.3, utilizando-se banco de proteínas restringido para o gênero *Apis* (NCBI). Os parâmetros de pesquisa utilizados foram: inexistência de restrições à massa molecular da proteína, uma perda de clivagem triptica, modificações fixas de oxidação da metionina e modificação variável de carbamidometilação. Os erros de tolerância utilizados nas buscas foram de 0,5 Da para MS¹ e 0,3 para MS².

Scaffold v3.4 foi utilizado para validar os dados de MS² para as proteínas identificadas utilizando-se análise clusterizada. Para as proteínas solúveis foi utilizado *threshold* de proteínas de 99% e *threshold* de peptídeos de 95%; e pelo menos duas sequências peptídicas identificadas. Para as proteínas do debris foi utilizado *threshold* de proteínas de 95% e *threshold* de peptídeos de 90% e uma sequência peptídica identificada.

Abordagem *shotgun* em instrumento Orbitrap: Para identificação de proteínas foi utilizado PatternLab versão 3.0.0.30.20. Os espectros de massas foram extraídos no formato MS² utilizando-se PatternLab Raw Reader (disponível em <http://proteomics.fiocruz.br/Softwares.aspx>). O banco de dados para o gênero *Apis* foi baixado do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) em junho de 2014. Um banco de dados de contaminantes foi utilizando a partir do PatternLab. A ferramenta de busca ProLuCID foi utilizada para comparar os dados experimentais de espectrometria de massas in tandem com os dados teóricos depositados no banco de dados, selecionando os melhores espectros de peptídeos que correspondem aos experimentais. Os parâmetros utilizados nas buscas foram: perda de uma clivagem triptica, oxidação da metionina, carbamidometilação da cisteína, 50 ppm de erro de tolerância para MS e 500ppm de erro de tolerância para MS². Os peptídeos encontrados por ProLuCID foram filtrados pelo SEPro (Search Engine Processor), uma ferramenta para filtrar e organizar os peptídeos e que está incluso no PatternLab versão

3.0.0.30.20. De modo geral, as identificações foram agrupadas por estado de carga (+2 e >+3), gerando dois subgrupos. Para cada resultado, o XCorr, DeltaCN, DeltaPPM e peptídeos encontrados foram utilizados para gerar um discriminador Bayesiano. Foi estabelecido FDR de 1%. Adicionalmente, foi estabelecida uma sequência mínima de seis resíduos de aminoácidos. Com os resultados já processados foram aceitos PSMs menores que 6ppm para a média de identificações globais. Para gerar a lista final de proteínas foi utilizado o modo de Máxima Parsimônia, eliminando-se as identificações redundantes. As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente de acordo com GO e Blast2GO.

3.8 Quantificação de proteínas *label-free*

A quantificação de proteínas *label-free* foi feita de acordo com os valores de contagem espectral e valor de NSAF (normalized spectral abundance fator) fornecido pelo SEPro (SEPro) (ferramenta do PatternLab versão 3.0.0.30.20 – CARVALHO et al., 2008).

3.9 Análise funcional

O algoritmo Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>) (GOTZ et al., 2011) foi utilizado para relatar a categorização do processo biológico das proteínas identificadas de acordo com Gene Ontology, que contém ontologias e um subconjunto dos termos encontrados em todo o GO (<http://www.geneontology.org>) (Gene ontology Consortium, 2015). As categorias para cada classificação não são exclusivas (i.e., verificou-se que um número de candidatos estava localizado em mais do que um compartimento celular). As proteínas foram classificadas em categorias funcionais usando Blast2GO, e a representação de ontologias de genes estatisticamente enriquecidas foi realizada com o algoritmo Gene Ontology Enrichment Analysis Software (GOEAST-<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/>) (ZENG e Wang, 2015). As proteínas anotadas com Blast2GO foram submetidas como uma lista de antecedentes ao GOEAST.

3.10 Análise de rede de interações proteína-proteína

Para as proteínas identificadas somente no grupo controle e somente no grupo REP foram criadas redes de interações de proteínas através do software String versão 10 (disponível em <http://string-db.org>) (SZKLARCZYK et al., 2014) a fim de se compreender como as proteínas do grupo controle interagem entre si e como as proteínas do grupo REP interagem entre si e como essas proteínas contribuem para o processo de memória e aprendizagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início do presente trabalho se concentrou no desenvolvimento de uma metodologia analítica adequada para a realização de análises proteômicas em cérebros de abelhas, considerando-se tanto as proteínas solúveis, como também aquelas associadas às membranas plasmáticas e organelares, por isso uma parte do texto abaixo, que poderia ser incluída em “material e métodos”, está colocada em “resultados”, porque seu desenvolvimento também era parte dos objetivos iniciais do projeto.

Como descrito no item 3.1 as abelhas previamente marcadas, com idade de 20 dias foram submetidas ao ensaio de reflexo de extensão de probóscide (REP). Em seguida, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

No projeto foi proposto que as abelhas tivessem a cabeça removida e armazenada em ultrafreezer para depois ser macerada, para obtenção do extrato de proteínas solúveis. Entretanto, as primeiras análises *shotgun* mostraram que o armazenamento do cérebro mesmo em ultrafreezer causava degradação das proteínas. Em detrimento disto, o protocolo foi alterado. Após o ensaio elas eram congeladas em nitrogênio líquido e tinham o cérebro dissecado em solução contendo *cocktail* inibidor de protease.

4.1 Resultados obtidos por estratégia *shotgun* e análise de espectrometria de massas com instrumento micrOToF-QIII

Os cérebros dissecados eram macerados, centrifugados, e o sobrenadante compunha o extrato de proteínas solúveis. Após análise deste extrato por abordagem *shotgun*, observou-se que o número de identificações de proteínas era baixo (em torno de 100). Visando melhorar a extração de proteínas, os cérebros dissecados passaram a ser macerados em tampão de lise (Urea 7M, Thiourea 2M, 1% DTT, 2% Triton X-100) (adaptado de Garcia e colaboradores, 2009) com adição de *cocktail* inibidores de protease.

Ficou estabelecido, portanto, que as abelhas seriam submetidas ao ensaio de REP, em seguida congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente removidas as cabeças dos insetos, que foram então dissecadas (em presença do *cocktail* inibidores de proteases) para remoção dos cérebros, que foram em seguida macerados em tampão de lise, centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, e os extratos foram submetido à digestão com tripsina conforme descrito no item 3.3.

Para as proteínas de *debris* os parâmetros de validação foram menos rígidos em função da metodologia de extração utilizada. Este processo de digestão é dificultado, pois, de forma geral, apenas os domínios hidrofílicos das proteínas de membrana ficam expostos e disponíveis ao acoplamento da enzima trípica, gerando poucos fragmentos peptídicos. Sendo assim, a identificação das proteínas dos *debris* é mais difícil quando comparada à identificação das proteínas solúveis. Entretanto, considerou-se a estratégia válida, já que a mesma permitiu a identificação de muitos receptores, proteínas de membrana e moléculas que atuam nas membranas celulares (Tabela 1).

A partir do procedimento adotado foram identificadas 313 proteínas, sendo 221 proteínas comuns aos grupos de estudo (controle e REP), 52 proteínas únicas do grupo controle e 77 proteínas únicas do grupo REP.

As proteínas foram agrupadas em 18 processos biológicos (componente celular, defesa contra stress químico, biosíntese de proteínas, metabolismo mitocondrial, metabolismo citoplasmático, organização do nucleossomo, ciclo celular, transporte, diferenciação celular, transdução de sinal, degradação de proteínas, nutrição, maturação de proteínas, neurotransmissão, modulação do cérebro, aquisição de memória e comunicação química) de acordo com a função (função molecular e processo biológico) obtida através da ferramenta Gene Ontology (www.geneontology.org) e Uniprot (www.uniprot.org).

Os Processos Biológicos utilizados para a categorização das proteínas foram:

Função Desconhecida: proteínas que ainda não tiveram sua função descrita/estudada.

Aquisição de memória: é o processo de armazenamento e recuperação de novas informações na memória. Processo no qual as sinapses específicas são modificadas por mecanismos de entrada de sinalizações específicas.

Modulação do Cérebro: proteínas envolvidas na regulação das funções cerebrais e das moléculas que atuam sob os processos neuronais. É o processo fisiológico pelo qual um determinado neurônio usa um ou mais neurotransmissores ou outras moléculas para regular as diversas populações de neurônios.

Neurotransmissão: é o processo pelo qual as moléculas de sinalização chamadas neurotransmissores são liberadas por um neurônio (o neurônio pré-sináptico), que se ligam e ativam os receptores de outro neurônio (o neurônio pós-sináptico).

Comunicação Química: o processo de comunicação química envolve síntese ou modificação das moléculas de sinalização, que podem envolver um mecanismo de elaboração ou liberação de proteínas e moléculas de sinalização intracelular que medeiam à transdução de sinal para produzir uma resposta comportamental apropriada.

Nutrição: trata-se um conjunto de proteínas descritas pela primeira vez na secreção de geléia real, na forma de reservas nutricionais, mas que também ocorrem no cérebro de abelhas, com funções que ainda estão sendo estudadas.

Transdução de Sinal: refere-se a qualquer processo através do qual uma célula converte um tipo de sinal ou estímulo em outro. A transdução do sinal ocorre quando uma sinalização extracelular (SILVERTHORN, 2007) ativa um receptor específico localizado na superfície da célula ou no interior da célula. Por sua vez, este receptor desencadeia uma cadeia bioquímica de eventos no interior da célula, criando uma resposta. Dependendo da célula, a resposta altera o metabolismo das células, a forma, a expressão do gene, ou a capacidade de se dividir (REECE e NEIL, 2002).

Diferenciação Celular: a diferenciação celular é um processo gradual pelo qual a célula muda a sua estrutura para que possa executar uma tarefa específica. No interior de uma célula, a nível molecular, encontramos um grande número de receptores cuja finalidade mais importante é a regulação do crescimento. Quando é necessário a um tecido substituir as células que chegaram ao fim do seu período de vida, são liberados fatores de crescimento que se ligam aos receptores dos fatores de crescimento existentes na superfície celular. Assim são desencadeadas uma série de reações bioquímicas intracelulares que estimulam as células para entrar em mitose ou para se diferenciarem.

Ciclo celular: conjunto de processos que passam numa célula viva entre duas divisões celulares. O ciclo celular consiste na intérfase e na fase mitótica.

Organização do Nucleossomo: A organização de nucleossomo influencia a atividade de transcrição controlando a acessibilidade de proteínas de ligação de DNA para o genoma (ZHANG ET AL., 2013).

Transporte: uma proteína de transporte da membrana celular é uma proteína de membrana envolvida no movimento de íons, pequenas moléculas, ou mesmo de macromoléculas, tais como outras proteínas, através de uma membrana biológica. Os princípios básicos de transporte intracelular são altamente conservados, e as proteínas motoras

constituem um mecanismo molecular comum para o transporte intracelular em neurônios, assim como em outros tipos de células (HIROKAWA, 2005).

Metabolismo citoplasmático: é no citoplasma que a maioria das atividades celulares ocorre, tais como muitas vias metabólicas, incluindo a glicólise, e processos tais como a divisão celular. Movimento de íons de cálcio para dentro e para fora do citoplasma é um exemplo da atividade de sinalização para processos metabólicos que ocorrem no citoplasma.

Metabolismo mitocondrial: mitocôndrias desempenham um papel central no metabolismo de células eucarióticas, contribuindo para a produção de energia, metabolismo intermediário e para os mecanismos de morte celular.

Degradação de Proteínas: existem diversas vias de degradação de proteínas, dentre elas estão: (i) proteólise intracelular (degradação de proteínas pelo lisossomo, degradação de proteínas dependente de ATP feita pelo proteassoma - via proteolítica da ubiquitina-proteassoma, degradação dependente de cálcio por calpaínas, cascata das caspases, degradação de oligopeptídeos por peptidases); (ii) proteólises limitadas e (iii) proteólise extracelular (degradação de proteínas secretadas na matriz extracelular por peptidases). A degradação de proteínas é importante em muitos processos celulares. A ubiquitina que é uma proteína marcadora de proteínas a serem degradadas por organelas chamadas proteossomos, por exemplo, desempenha também papéis na biogênese dos ribossomos, na modulação de receptores celulares, na expressão gênica, na reparação de DNA, na resposta ao stress, na morfogênese neuronal, na memória de longo prazo, entre outros processos (THELANDER et al., 2004).

Maturação de proteínas: Qualquer processo que leva à capacidade funcional completa de uma proteína. Geralmente envolve processos tais como processamento proteolítico da proteína, seguido de mudanças conformacionais dirigidas.

Componente do Citoesqueleto: O citoesqueleto é uma complexa rede de proteínas que determina a forma da célula. Ele é fundamental para que ocorra a movimentação celular; proporciona o suporte estrutural e mobilidade de organelas intracelulares e a estrutura para movimentação e separação de cromossomos durante a divisão celular (MONTEIRO et al., 2011). Além de participar do desenvolvimento do sistema nervoso, o citoesqueleto está envolvido em processos de plasticidade no cérebro adulto (BENITEX et al., 2004).

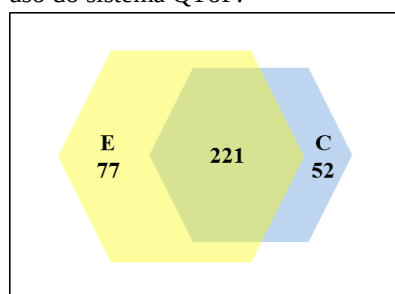
Defesa contra estresse químico: Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações

cruzadas, o que pode ter como consequência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al., 2006). Células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes através de uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas genericamente de proteínas de estresse (LOCKE et al., 1990). O termo “proteína de estresse” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (WELCH, 1993). Proteínas que atuam como defesa contra stress químico são essenciais para a sobrevivência da célula, atuando também como integrantes de um sistema secundário de defesa antioxidante.

Biosíntese de proteínas: A biossíntese de proteínas refere-se ao processo pelo qual as células biológicas geram novas proteínas; é equilibrada pela perda de proteínas celulares via degradação ou exportação. O processo de tradução é uma parte essencial da via biossintética, juntamente com a geração de RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), transporte co-translacional, e modificações pós-translacionais. Segundo Krüttner e colaboradores (2012) quando a memória de curto prazo é formada, certas proteínas nas células nervosas (neurônios) do cérebro são transitoriamente modificadas, entretanto, para a formação de memória de longo prazo, as células têm de sintetizar novas moléculas de proteína, sendo este um grupo importante para o presente estudo.

O diagrama de Venn (Figura 10) representa a distribuição numérica das proteínas identificadas somente no grupo controle (C), somente no grupo REP (E) e das proteínas comuns a ambos os grupos (intersecção de C e E) analisados por estratégia *shotgun* com o uso do sistema analítico QToF, considerando-se tanto proteínas solúveis, como aquelas identificadas nos debrís celulares.

Figura 10. Diagrama de Venn para as proteínas identificadas nos cérebros de abelhas do grupo controle (C), e do grupo REP (E), com o uso do sistema QToF.



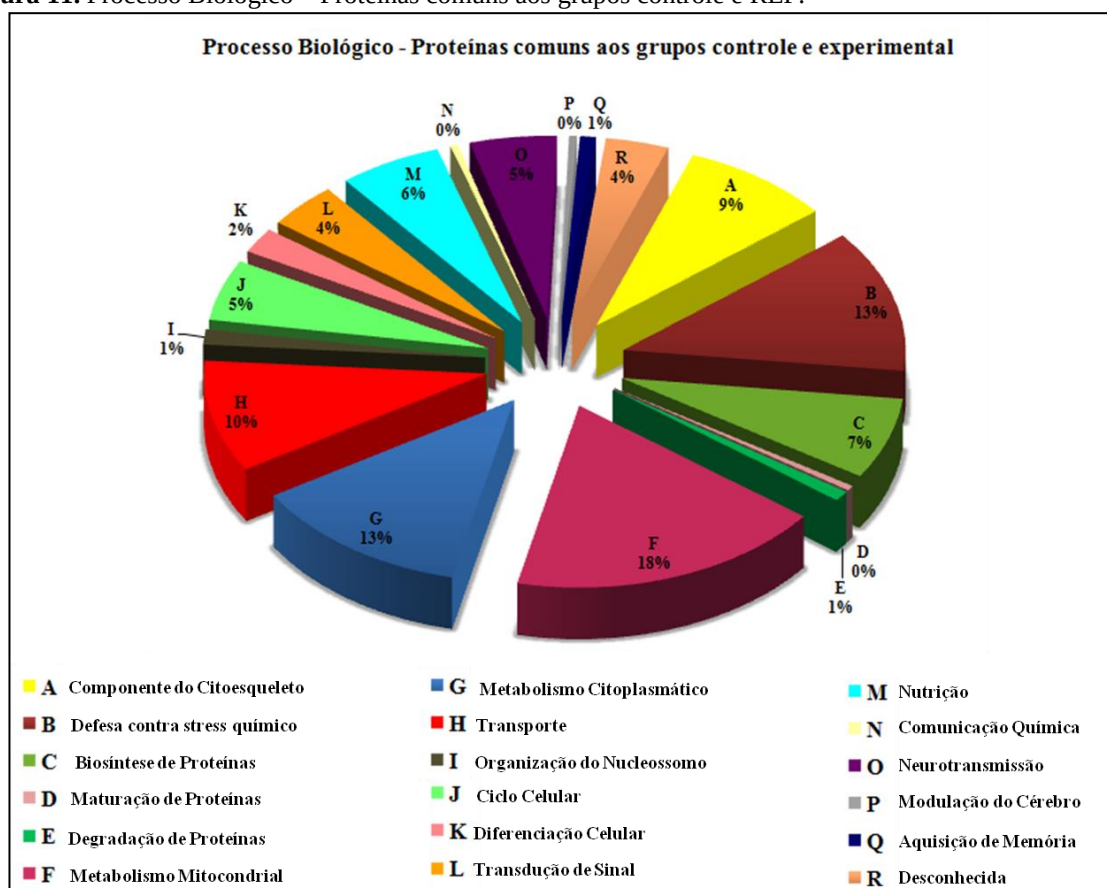
Fonte: criado pelo autor, 2016.

4.1.1 Proteínas identificadas tanto no grupo controle quanto no grupo REP

Segundo os parâmetros descritos anteriormente, 221 proteínas foram identificadas como sendo comuns a ambos os grupos (Tabela 1- Anexo I). Na tabela pode-se visualizar o nome da proteína (identificação), o código de acesso da proteína no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), o escore Mascot, as sequências peptídicas identificadas e o *ion score* correspondente a cada sequência, o peso molecular da proteína, ponto isoelétrico da proteína, processo biológico e função de cada proteína. Essas proteínas, de uma maneira geral, foram identificadas no extrato de proteínas citosólicas.

As proteínas identificadas comuns a ambos os grupos (Tabela 1) podem ser visualizadas na Figura 11, segundo o agrupamento funcional (Processo Biológico).

Figura 11. Processo Biológico – Proteínas comuns aos grupos controle e REP.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

4.1.2 Proteínas identificadas: exclusivamente no grupo controle

Foram identificadas 52 proteínas únicas no grupo controle, e 77 no grupo REP, sendo a maioria destas proteínas oriundas do extrato de debris celulares digeridos com tripsina. As proteínas identificadas apenas no grupo controle podem ser visualizadas na Tabela 2. A Figura 12 mostra a classificação funcional das proteínas (processo biológico).

Tabela 2. Proteínas identificadas somente no grupo controle.

Proteínas	Peptídeos (Ion Score)	Código de Acesso	Processo Biológico	Função
atrial natriuretic peptide receptor 1-like [Apis florea]	GMSYLHASEVSAHGKLR (38)	gi 380018798	Transdução de Sinal	Intracellular signal transduction; guanylate cyclase activity
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase SMG1-like [Apis florea]	LRFRDSISIQNASLGVYHSLLSLK (54)	gi 380018798	Defesa	Protein phosphorylation/ response to genotoxic stress
	RYLIMEGAAK (23)			
	QREIDKEK (19)			
	FPWLKAAMEEAANR (32)			
PREDICTED: ras-like protein family member 10B-like [Apis mellifera]	VSCGTPIIIGTKTASGRR (41)	gi 328783154	Transdução de Sinal	small GTPase mediated signal transduction
PREDICTED: protein phosphatase inhibitor 2-like [Apis florea]	LAESSKPK (19)	gi 380011431	Transdução de Sinal	regulation of signal transduction; regulation of phosphoprotein phosphatase activity
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein homolog [Apis florea]	NVEYETIDITEPGK (34)	gi 380030088	Ciclo Celular	cell redox homeostasis
PREDICTED: glutamate dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis florea]	CACVDVPFGGAKAGIK (36)	gi 380022072	Metabolismo Citoplasmático	cellular amino acid metabolic process
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase RIO1-like [Apis mellifera]	KINNIEEKDNLSEK (32)	gi 328786671	Neurotransmissão	neurogenesis; positive regulation of glial cell proliferation
rho guanine nucleotide exchange factor 3-like [Apis mellifera]	KRSSIGNIII (20)	gi 380011463	Transdução de sinal	regulation of synapse organization
PREDICTED: glutamate receptor, ionotropic kainate 1-like, partial [Apis florea]	QLMDKKADLAVGSMTINYAR (45)	gi 380015490	Neurotransmissão	positive regulation of synaptic transmission, GABAergic; voltage-gated cation channel activity
	EVGFYSYR (19)			
PREDICTED: circadian clock-controlled protein-like [Apis florea]	AIVKMQMEMIK (25)	gi 380012634	Ciclo Celular	circadian rhythm

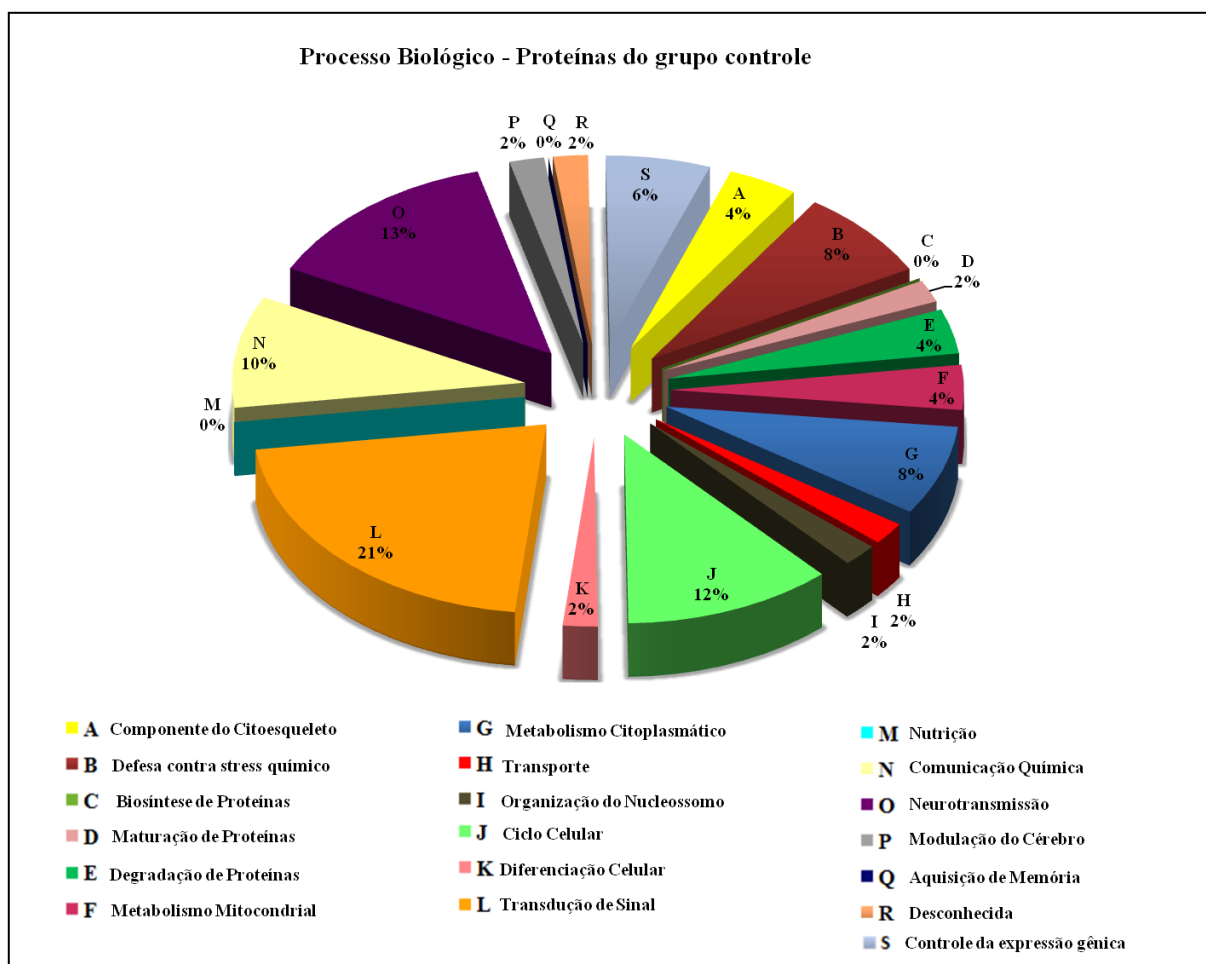
metabotropic glutamate receptor B precursor [Apis mellifera]	QGTVPDETHSACR (29)	gi 58585190	Neurotransmissão	regulation of synaptic transmission, glutamatergic
PREDICTED: probable G-protein coupled receptor Mth-like 1-like [Apis florea]	DLRPASLEKGQETLRLR (38)	gi 380030347	Defesa	G-protein coupled receptor signaling pathway; response to starvation
PREDICTED: ras-like protein 1-like [Apis mellifera]	KPEEEMLSLK (23)	gi 328789692	Defesa	cellular response to starvation;
odorant receptor 53 [Apis mellifera]	NLHMKVKAFGPAGFCLSSTIK (48)	gi 339715157	Comunicação química	Odor receptor; involved in the acceptande or avoidance behavior
PREDICTED: polyubiquitin-A-like, partial [Apis florea]	TLSDYNIQK (20)	gi 380030823	Degradação de Proteínas	target proteins for destruction
odorant receptor 9 [Apis mellifera]	MLMPLMSTIAQMTK (32)	gi 339715118	Comunicação química	Odor receptor; involved in the acceptande or avoidance behavior
UMP-CMP kinase-like	EGLVYK (19)	gi 380019880	Metabolismo Citoplasmático	adenylate kinase family
mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog 1-like	KCKDVFPANFEGAK (31)	gi 380017696	Transporte	ion transport; porin activity
TP53-regulating kinase-like	ERFGKK (19)	gi 380018131	Controle de expressão gênica	Protein tyrosine kinase activity
serine threonine-protein kinase 10-like	DSSILNK (20)	gi 380016388	Transdução de Sinal	signal transduction by phosphorylation
ankyrin repeat and protein kinase domain-containing protein 1-like	KEQAMLEESTEFATGIMKLATGG EEQEEVLVNK (75)	gi 380012412	Ciclo celular	Involved in mitotic nuclear envelope reassembly by promoting dephosphorylation of BAF/BANF1 during mitotic exit
Cgmp-Dependent protein kinase, isozyme 1-like	TKNLIKNAILNNEFLK (36)	gi 66513303	Maturação de Proteínas	protein phosphorylation
	EEELMILEK (21)			
serine threonine protein kinase PAK-1-like	QTMVGTPYWMAPEVVTRK (41)	gi 380019921	Componente do Citoesqueleto	actin cytoskeleton reorganization; protein phosphorylation; receptor clustering
microtubule-associated serine threonine protein kinase-like	RATGGTTGLTCELSIMDLVDVDDK TPK (59)	gi 48095908	Componente do Citoesqueleto	regulation of cytoskeleton organization

serine threonine kinase D3	ELEAKVGYR (20)	gi 380028429	Transdução de Sinal	protein kinase C activity; intracellular signal transduction
G-protein coupled receptor kinase 2	MELENIVANTVYLKAR (36)	gi 328779954	Transdução de Sinal	signal transduction
putative odorant receptor 63a-like	LTAFKVTTLSMQTFLAIQTAMSF TVLLSTT (70)	gi 328787313	Comunicação química	olfactory receptor activity; G- protein coupled receptor activity
serine threonine protein kinase PRP4 homolog	TLMLDAGK (20)	gi 380023011	Controle de expressão gênica	protein phosphorylation; RNA splicing
serine threonine kinase tousled-like-2- like	MSAGSQIQMAPQDTVNSGQSVHS QDSNMSTGSSHSDK (84)	gi 380013859	Metabolismo Citoplasmático	DNA replication, transcription, repair, and chromosome segregation
serine threonine protein kinase atr-like	LMLNFHESPEKIIGLLKIISDYDSN LEK (63)	gi 380022030	Ciclo Celular	actin filament organization; DNA repair; regulation of mitosis
cyclin-G-associated kinase-like	HPFPEGNKLAIVNGK (34)	gi 380020555	Ciclo Celular	cell cycle
dopamina beta-hydroxylase-like	LKAVSSDK (19)	gi 380030431	Metabolismo Citoplasmático	Conversion of dopamine to noradrenaline
serine threonine protein kinase MARK2- like	WMNMGYDDDELKPYLEPEPDYK DHK (57)	gi 380028692	Transdução de sinal	Controls the dynamics of microtubules
gamma-aminobutyric acid receptor alpha-like	ESISQSNKRTAGNLAAR (39)	gi 380013377	Neurotransmissão	signal transduction; ion transport; GABA-A receptor activity
putative gustatory receptor 64f	AAQIFGMFPVSGIGSSSYIK (45)	gi 328790773	Comunicação química	taste receptor activity
TGF-beta receptor type 1-like	MRGACDGGIASFLALLCLFHTSCL VDGLK (66)	gi 380016845	Transdução de Sinal	extracellular structure organization; activation of MAPKK activity; signal transduction
transient receptor potential channel pyrexia	NHAGLTK (19)	gi 66551469	Transdução de sinal	response to heat; negative gravitaxis
nicotinic acetylcholine receptor alpha6 subunit	GMELQESSK (19)	gi 121583858	Neurotransmissão	synaptic transmission, cholinergic; response to insecticide; cation transport
PDF receptor like	DVANAIK (20)	gi 3800127193	Modulação de cerebro	neuropeptide signaling pathway; regulation of circadian sleep/wake cycle

odorant receptor Or1-like	TEHLLSPICFMEMFKNILSICMLSY CIFAEWSGHIK (82)	gi 380014540	Comunicação química	olfactory behavior; sensory perception of smell; G-protein coupled receptor activity
Cgmp-Dependent protein kinase foraging	ETFNQLISSLDEIRTRYK (41)	gi 58585102	Defesa	regulation of response to food; feeding behavior
glycine receptor subunit alpha-3	DVLVSIDPSGMVR (29)	gi 328783559	Neurotransmissão	postsynaptic membrane; cell junction
serine threonine-protein kinase PLK4- like	LVRAKTPK (19)	gi 380026652	Transdução de sinal	regulation of centriole replication; regulation of protein stability;
inhibitor of nuclear factor kappa B- kinase subunit alpha-like	EAINVMK (21)	gi 380026892	Degradação de Proteínas	protein catabolic process; protein phosphorylation
PREDICTED: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2-like [Apis mellifera]	GLVALVTGGASGLGLGVVQR (71)	gi 110760701	Biosíntese de proteínas	tRNA processing; fatty acid metabolic process
	LGTPDEYAQLAEHIVENSLNGE VIR (36)			
PREDICTED: ATP synthase subunit delta, mitochondrial-like [Apis florea]	NDFMGSLSFGEISLIK (91)	gi 380017791	Metabolismo Mitochondrial	ATP synthesis coupled proton transport
	GSFGKVMLAERK (19)			
PREDICTED: ATP synthase subunit g, mitochondrial-like [Apis mellifera]	MSKIVGEVSTLIKLGVTG (23)	gi 328791879	Metabolismo Mitochondrial	ATP synthesis coupled proton transport
	IVGEVSTLIK (47)			
PREDICTED: 40S ribosomal protein S3a-like [Apis florea]	MVDTITNDVTK (47)	gi 380022797	Ciclo Celular	mitotic spindle organization; cytoplasmic translation
	LLELHGDGAGSK (59)			
	SEEVGESGSK (22)			
PREDICTED: 60S ribosomal protein L8-like [Apis florea]	ASGNYATVIAHNPDTK (78)	gi 380017591	Organização do Nucleossomo	translation; centrosome duplication
	AMVGIVAGGGR (45)			
PREDICTED: 40S ribosomal protein S2 isoform 1 [Apis mellifera]	STITGIEMFHQTLEAEAGDQMG ALLR (75)	gi 328777809	Diferenciação celular	Has a specific developmental role during oogenesis and a general role in protein synthesis as a component of the small ribosomal subunit
	GTGIVSAPVPK (36)			

calcium/calmodulin-dependent protein kinase II [Apis mellifera]	ICDPHLTAFEPEALGNLVEGMDF HK (64)	gi 201023361	Neurotransmissão	key regulator of plasticity in synaptic physiology and behavior, alterations in its activity produce pleiotrophic effects that involve synaptic transmission and development as well as various aspects of behavior. Directly modulates eag potassium channels
	QGVATHQSEESR (16)			
PREDICTED: calerythrin isoform 1 [Apis mellifera]	QGADTDQDGQVSR (65)	gi 328776808	Desconhecida	Unknow
	EEWFQLWEEYAK (39)			
Fonte: criado pelo autor, 2015.				

Figura 12. Processo Biológico – Proteínas identificadas somente no grupo controle.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

Na Figura 12, para as proteínas identificadas somente no grupo controle observou-se maior porcentagem para as proteínas classificadas no grupo Transdução de Sinal (21%), seguido de Neurotransmissão (13%), Ciclo Celular (12%), Comunicação Química (10%), Metabolismo Citoplasmático (8%), Defesa contra stress químico (8%), Controle da expressão gênica (6%), Metabolismo Mitocondrial (4%), Degradação de proteínas (4%), Diferenciação Celular (2%), Transporte (2%), Organização do Nucleossomo (2%), Maturação de Proteínas (2%), Modulação do cérebro (2%) e Desconhecidas (2%).

Quando comparadas ao grupo REP, as proteínas identificadas no grupo controle diferem-se principalmente, por apresentarem maior porcentagem de proteínas de Defesa contra stress químico e de Ciclo Celular, e menor porcentagem de proteínas nos grupos de Transdução de sinal, Comunicação Química, Neurotransmissão e Diferenciação Celular.

Com relação às proteínas que foram identificadas em maior número no grupo controle (Defesa contra estresse químico e Ciclo Celular) pode-se sugerir que as abelhas apresentavam alto nível de estresse tanto no grupo controle, quanto no grupo REP. Porém, em função do ensaio comportamental aplicado, as abelhas do grupo REP tinham a solução de sacarose funcionando como um sistema de recompensa, minimizando o efeito do estresse; já o grupo controle era submetido apenas ao estresse, não tendo um sistema de recompensa. As abelhas ficavam privadas de alimento por um período de 4 horas, e ainda eram imobilizadas em ponteiras; procedimento este responsável por grande estresse fisiológico e químico, e que provavelmente gerou a expressão elevada de proteínas de defesa contra estresse químico. Quanto às proteínas identificadas no grupo Ciclo Celular, pode-se inferir que o estresse causado gerou uma resposta da maquinaria celular a fim de evitar a morte celular e repor as células/proteínas que estavam sendo degradadas em função da condição pela qual as abelhas estavam sendo submetidas.

4.1.3 Proteínas identificadas: exclusivamente no grupo REP

As proteínas identificadas apenas no grupo REP podem ser visualizadas na Tabela 3. O gráfico contendo a classificação funcional das proteínas e o processo biológico pode ser visualizado na Figura 13.

Tabela 3. Proteínas identificadas somente no grupo REP.

Proteínas	Peptídeos (Ion Score)	Código de Acesso	Processo Biológico	Função
PREDICTED: PEST proteolytic signal-containing nuclear protein-like [Apis florea]	SPLRSDDR (19)	gi 380022799	Ciclo celular	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; cell cycle
	MRNIGR (20)			
PREDICTED: voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-4-like [Apis florea]	MNAVMR (21)	gi 380018614	Neurotransmissão	detection of light stimulus involved in visual perception; calcium ion transmembrane transport;
PREDICTED: REM2- and Rab-like small GTPase 1-like [Apis florea]	EFISKQMGQN (23)	gi 380022095	Transdução de sinal	cellular protein localization; cilium assembly; exocytosis; protein transport; regulation of vesicle fusion; small GTPase mediated signal transduction
sodium channel protein paralytic [Apis mellifera]	GNDDNNK (19)	gi 259906449	Neurotransmissão	neuronal action potential; membrane depolarization during action potential; response to mechanical stimulus; synaptic transmission; sodium ion transmembrane transport
	VGRVLRVLK (19)			
PREDICTED: tyrosine-protein kinase Fps85D-like isoform 2 [Apis florea]	MGFSTSLQGQSSHEALLARQDAEIKLLETMR (70)	gi 380011847	Desconhecida	actin filament bundle assembly; axon guidance; peptidyl-tyrosine phosphorylation
PREDICTED: tyrosine-protein phosphatase Lar-like [Apis florea]	DMGRAPMSVK (24)	gi 380021984	Componente do Citoesqueleto	Possible cell adhesion receptor. It possesses an intrinsic protein tyrosine phosphatase activity (PTPase).
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: carboxylesterase 5A-like [Apis florea]	AIAMSGDAVSSVGSPQMELPVVDIIAEKFGCYR (75)	gi 380030702	Comunicação química	carboxylic ester hydrolase activity; pheromone degradation

	KMADVMMAMLASFAR (34)			
nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit precursor [Apis mellifera]	IKLKLSQLIDVNLK (32)	gi 118601178	Neurotransmissão	acetylcholine-activated cation-selective channel activity; synaptic transmission; cation transport; nervous system development; neurotransmission; regulation of dendrite morphogenesis; regulation of excitatory postsynaptic membrane potential; synaptic transmission, cholinergic
	RVFIHVLPRLLVMR (33)			
PREDICTED: choline-phosphate cytidyltransferase B-like [Apis florea]	ITLKMAK (20)	gi 380025551	Metabolismo citoplasmático	Controls phosphatidylcholine synthesis
PREDICTED: regulator of G-protein signaling 7-like [Apis florea]	LAKEISTR (21)	gi 380018838	Transdução de sinal	G-protein coupled receptor signaling pathway; intracellular signal transduction; positive regulation of GTPase activity
metabotropic glutamate receptor 1 [Apis mellifera]	VTMGDKSKK (24)	gi 58585192	Neurotransmissão	G-protein coupled glutamate receptor signaling pathway; activation of MAPK activity; cellular response to electrical stimulus; regulation of synaptic transmission glutamatergic; synaptic transmission
PREDICTED: vascular endothelial growth factor receptor 1-like [Apis florea]	ELLVIVEYCR (23)	gi 380013584	Diferenciação celular	blood vessel morphogenesis; cell differentiation; cell migration; peptidyl-tyrosine phosphorylation; positive regulation of MAP kinase activity; positive regulation of cell proliferation
PREDICTED: coronin-1C-like [Apis florea]	EFTEEIRK (20)	gi 380020482	Componente do citoesqueleto	actin cytoskeleton organization; signal transduction

PREDICTED: sodium-coupled monocarboxylate transporter 2-like [Apis florea]	VSLTLHGITAGSMLGIFTLGMTVPW ATSK (66)	gi 380022193	Transporte	sodium ion transport
PREDICTED: iron/zinc purple acid phosphatase-like protein-like [Apis florea]	VGDEFMK (20)	gi 380015930	Metabolismo citoplasmático	acid phosphatase activity; metal ion binding
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: protein tyrosine phosphatase type IVA 1-like [Apis florea]	QLAYLEK (19)	gi 380023785	Ciclo celular	cell cycle; peptidyl-tyrosine dephosphorylation; positive regulation of cell migration
PREDICTED: transient receptor potential-gamma protein-like [Apis florea]	VSFDPEAPPPPSQPAR (36)	gi 380026207	Neurotransmissão	calcium ion transport; cation transport; detection of light stimulus involved in visual perception
PREDICTED: voltage-gated potassium channel subunit beta-3-like [Apis florea]	MEEFNNGGGGAGGGGGGGGGGG GGTVDSGIHCSNTAGTK (91)	gi 380015216	Neurotransmissão	potassium ion transport; synaptic transmission
PREDICTED: parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor-like [Apis mellifera]	VTLENK (21)	gi 328787438	Transdução de sinal	G-protein coupled receptor signaling pathway; aging; cell maturation; skeletal system development
odorant receptor 35 [Apis mellifera]	IGRSLAIFCAGFMYSGGFFYTTVMP LCTK (66)	gi 339715142	Comunicação química	odorant binding; olfactory receptor activity
PREDICTED: probable G-protein coupled receptor Mth-like 1-like [Apis mellifera]	NPRTNAGR (21)	gi 328780267	Transdução de sinal	G-protein coupled receptor signaling pathway; response to starvation
PREDICTED: atrial natriuretic peptide-converting enzyme-like [Apis florea]	IDDEENIQYVHMQDPLATEITFVR (53)	gi 380022629	Transdução de sinal	peptide hormone processing; proteolysis
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase grp-like [Apis florea]	SLLEDIILKGPVTWPIAVATECMP (55)	gi 380016394	Ciclo celular	DNA damage checkpoint; protein phosphorylation; regulation of proteolysis
PREDICTED: CDK5 regulatory subunit-associated protein 3-like [Apis mellifera]	QLGISGEQIK (26)	gi 328778627	Diferenciação celular	brain development; regulation of neuron differentiation
PREDICTED: endothelin-converting enzyme 1-like [Apis florea]	ITSSPDER (19)	gi 380021298	Defesa	Converts big endothelin-1 to endothelin-1. Also involved in the processing of various neuroendocrine peptides; May limit beta-amyloid peptide accumulation in brain

PREDICTED: rho guanine nucleotide exchange factor 7-like [Apis florea]	RSIGIMDGSVS (25)	gi 380028597	Transdução de sinal	intracellular signal transduction; nervous system development; positive regulation of GTPase activity
PREDICTED: putative odorant receptor 82a-like [Apis florea]	VLKFLALTEK (22)	gi 380014827	Comunicação química	olfactory receptor activity; odorant binding
PREDICTED: protein kinase shaggy-like [Apis florea]	ARTPPEAMELVAGLLEYTPSGR (50)	gi 380012417	Transdução de sinal	Cytoskeleton; microtubule organizing center
PREDICTED: glutamate receptor, ionotropic kainate 2-like [Apis mellifera]	QAGPGSYR (20)	gi 380015482	Neurotransmissão	glutamate receptor signaling pathway; intracellular protein transport; neuron apoptotic process; positive and negative regulation of synaptic transmission; neuronal action potential; regulation of short-term and long-term neuronal synaptic plasticity; synaptic transmission
	GMITYKAEIELKILENGLLEPLATWTR (64)	gi 328780788		
	YINGDLQLNVSITVLWMK (41)	gi 328780788		
	AIADVVESMK (24)	gi 328792543		
PREDICTED: protein distal antenna-like isoform 3 [Apis florea]	IDQQTSVNSAGTSFVGSDVCADTD GKQDNKPK (73)	gi 380025895	Diferenciação celular	central nervous system formation
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase SMG1-like [Apis florea]	EEMYMSVVDLVILHLTSRDEIVRD K (57)	gi 380021791	Biosíntese de proteínas	Serine/threonine protein kinase involved in mRNA surveillance
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine/threonine-protein kinase N-like [Apis florea]	HIAWDDLLLR (21)	gi 380014132	Ciclo celular	actin cytoskeleton reorganization; cell adhesion; cell division; cell cycle; protein phosphorylation; signal transduction
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase TBK1-like [Apis florea]	DLKPGNIMK (19)	gi 380017999	Defesa	inflammatory response; innate immune response

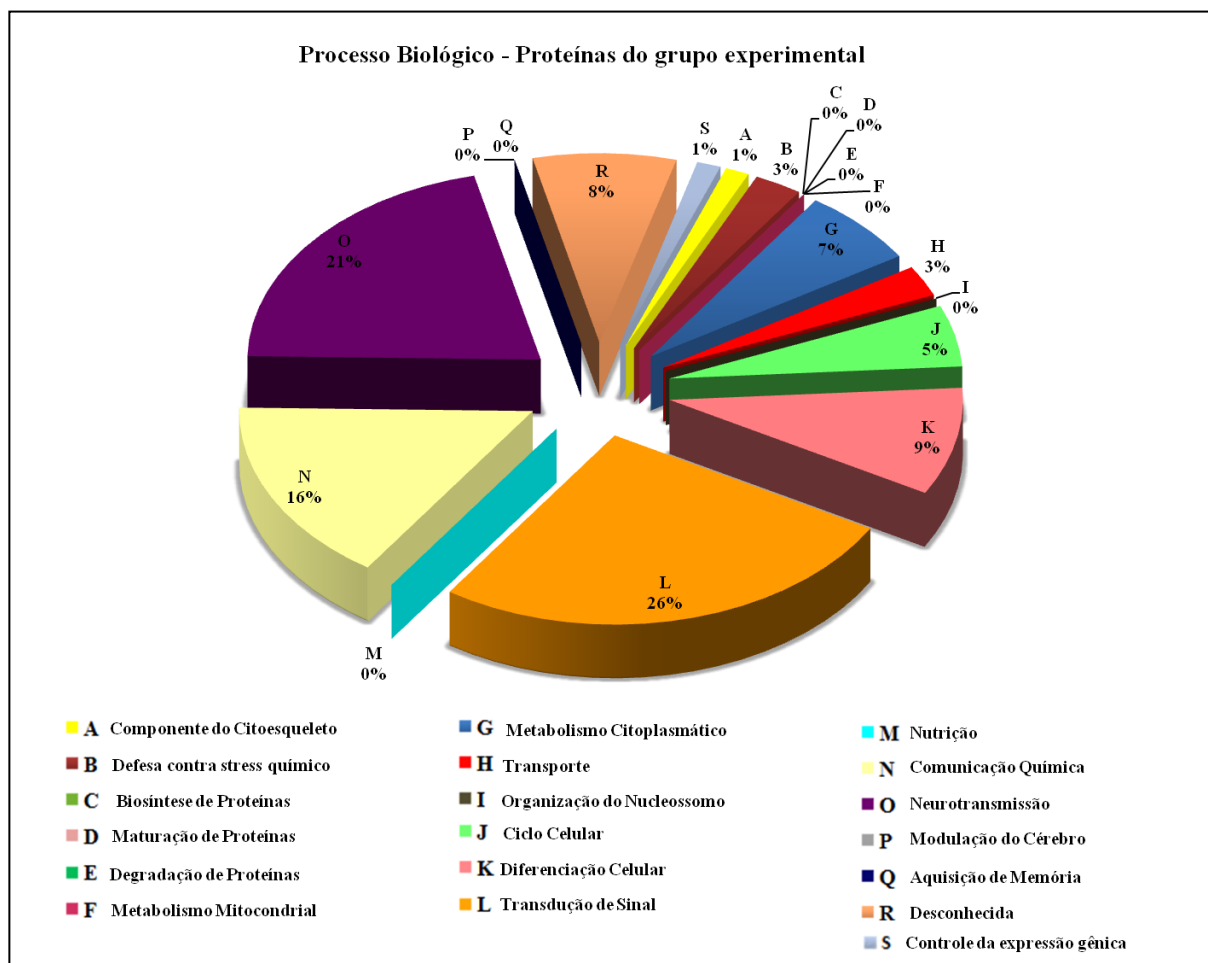
odorant binding protein 20 precursor [Apis mellifera]	KLVAECVISDANIYIR (39)	gi 94158813,	Comunicação química	response to stimulus; sensory perception of smell
PREDICTED: voltage-dependent calcium channel type D subunit alpha-1-like [Apis florea]	CCSSGHGGR (23)	gi 380026623	Neurotransmissão	calcium ion transport; membrane depolarization during action potential
PREDICTED: atrial natriuretic peptide receptor 1-like [Apis mellifera]	RMWGR (20)	gi 328783669	Transdução de sinal	intracellular signal transduction
PREDICTED: voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G-like [Apis florea]	HQMDEPK (19)	gi 38002898	Neurotransmissão	ion channel activity
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tyrosine-protein kinase Abl-like [Apis florea]	VYHYR (19)	gi 380023683	Transdução de sinal	may regulate cytoskeletal dynamics underlying a growth cone's response to midline cues
PREDICTED: inositol hexakisphosphate kinase 2-like [Apis florea]	NQVGGHTR (22)	gi 380012337	Transdução de sinal	inositol metabolic process; regulates dynamic of cytoskeleton
Eph receptor tyrosine kinase precursor [Apis mellifera]	IMNSVTALR (30)	gi 61316393	Neurotransmissão	signal transduction; protein phosphorylation; mushroom body development
TWiK family of potassium channels protein 18-like	QEDMDL (19)	gi 380024716	Transporte	potassium ion transport; locomotion
	VDEEAEENTEM (32)	gi 328789905		
muscarinic acetylcholine receptor DM-like	DTSGMGK (19)	gi 380018893	Neurotransmissão	phospholipase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway; G-protein coupled amine receptor activity; response to stress
homeodomain-interacting protein kinase 2	ESTPPSNMR (23)	gi 328789518	Diferenciação celular	organ growth
G-protein coupled receptor kinase 1-like	KQPHASVGTHGYMAPEVLSKGVTYDSSADWFSFGCMLHK (89)	gi 380023197	Transdução de sinal	phototransduction, visible light; signal transduction; protein phosphorylation
putative odorant receptor 13a-like	KSRSLILLIIMSNYPIK (39)	gi 380014598	Comunicação química	olfactory receptor activity

odorant receptor 13	ILSFIARIEHVMSPICFMEIMK (51)	gi 380014932	Comunicação química	sensory perception of smell
	KLADIVEYQMK (25)	gi 339715126		
glycerate kinase-like	DKDFPS (20)	gi 380018455	Metabolismo citoplasmático	protein phosphorylation
protein kinase C-binding protein NELL1-like	ENVVANGYR (22)	gi 380030628	Transdução de sinal	negative regulation of cyclin catabolic process; cell differentiation
p21-activated protein kinase-interacting protein 1-like	KKETFSSK (19)	gi 328788130	Diferenciação celular	Involved in the regulation of e late embryogenesis.
probable ras-GTPase-activating protein-like	QRGAGLRGCR (23)	gi 380013715	Transdução de sinal	signal transduction; negative regulation of Ras protein signal transduction
tyrosine protein kinase Abl-like	FNTLAELVHHHSMLADGLITQLLY PAK (61)	gi 380023683	Diferenciação celular	critical for embryonic epithelial morphogenesis regulating cell shape changes and cell migration
tyrosine protein kinase -like otk-like	HLDLLHKLNHEENVVKLIGLCR (52)	gi 380014239	Diferenciação celular	Acts as a calcium-dependent, homophilic cell adhesion molecule that regulates neural recognition during the development of the nervous system.
tyrosine protein kinase transmembrane receptor ROR1	TSISGRSCMQWSHGEFNLQISDYPE LAGK (66)	gi 328775898	Desconhecida	Tyrosine-protein kinase receptor whose role is not yet clear.
	TCAQFLPMTQELLDDKGNQSVYIP Y (57)			
receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2-like isoform 2	LDQEWAAALCAYEVDPSSTEIAQNE VNMK (75)	gi 328783976	Desconhecida	protein tyrosine phosphatase activity
ras supressor protein 1-like	NLPGNFFMMETLRALYLADNDFEY LPPEIGQLK (68)	gi 380024743	Transdução de sinal	Celular signal suppression during ageing

	VLDEAREIQNPELDLADKSISTFEE MPGLLNMINITR (89)			
odorant receptor 37	IIDMSVITFGNIIK (32)	gi 339715145	Comunicação química	olfactory receptor activity
aurora kinase A-like	HPNILKMYGYFHDDK (34)	gi 380028298	Transdução de sinal	Mitotic serine/threonine kinases that contributes to the regulation of cell cycle progression
ras-related protein Rab-1A-like	STMNPEYDYLFK (23)	gi 380024902	Transdução de sinal	Membrane sensing system, related to signal processing
odorant binding protein 2 precursor	NGADMSQLGCLK (27)	gi 58585122	Comunicação química	sensory perception of smell; G-protein coupled receptor signaling pathway; transport
serine threonine protein kinase SIK-30like	HHRSPATTPVSYSPPNSPALDMIQE EHPVEIPR (80)	gi 380019523	Desconhecida	Unknow
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2	HYDSQNASSPSVPAMVNASYSDE K (67)	gi 328780141	Neurotransmissão	G-protein coupled GABA receptor activity
nicotinic acetylcholine receptor alpha1 subunit	YLLFTMVLVTLVSVVTIAVLNVNF RSPVTHRMAR (77)	gi 148277574	Neurotransmissão	cation transport; synaptic transmission, cholinergic
odorant binding protein 14 precursor	KTIVLIFGFCVCVGALTIEELK (51)	gi 94158822	Comunicação química	odorant binding
serine threonine protein kinase OSR1-like	FGTALANKMASSSTTVVQGWPN T KDDYELK (70)	gi 380017380	Desconhecido	Unknow
ras-related protein Rab-9A-like	QQSPHRSSCCMPVSGAESNK (46)	gi 380030090	Transdução de sinal	protein transport; small GTPase mediated signal transduction
odorant receptor 105	TCMSYFMMFLSLR (30)	gi 339715179	Comunicação química	olfactory receptor activity
n-terminal kinase-like protein-like	DPFPPAR (21)	gi 380025903	Desconhecida	Unknow

protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2-like	PTYHK (19)	gi 380013452	Transdução de sinal	actin cytoskeleton organization; protein localization to endosome; cell projection morphogenesis
odorant receptor 47a0like	EIMLMNASFGK (25)	gi 380014579	Comunicação química	sensory perception of smell; G-protein coupled receptor signaling pathway
sodium and chloride dependent GABA transporter 1	LLGITPGIESIGGIQWELLGCLVIGW LLVYFIIR (77)	gi 328785453	Neurotransmissão	Plays a role in neuronal membrane excitation, important for normal response properties of the photoreceptor; signal transduction; transmission of nerve impulse
odorant receptor 58	HLFVRDQTNQPR (27)	gi 339715166	Comunicação química	olfactory receptor activity; sensory perception of smell
receptor type tyrosine protein phosphatase um-like	FPSCENTTYNGDTLCINDVNQREG GMSLVKVK (73)	gi 380030678	Transdução de sinal	Regulates CTNNB1 function both in cell adhesion and signaling. May function in cell proliferation
gamma-aminobutyric acid receptor subunit epsilon-like	MWASYNTLCCSFEDGK (39)	gi 380016304	Neurotransmissão	transport; GABA-A receptor activity
probable phosphorylase B regulatory b kinase regulatory subunit beta-like	VSSNEGK (20)	gi 380013108	Metabolismo citoplasmático	glycogen metabolic process
phosphoglycerate kinase-like	VQIHLPVDFVTADKFAENAAVGAA DIESGIPDGWMGLDDVGPKSR (102)	gi 380014436	Metabolismo citoplasmático	glycolytic process
probable G-protein coupled receptor 125-like	KNMALEEFR (19)	gi 380024805	Transdução de sinal	neuropeptide signaling pathway
steroid receptor seven-up, isoforms B/C, partial	VVAFMDHIR (23)	gi 328791488	Neurotransmissão	glial cell development; neuron-neuron synaptic transmission; visual perception
Fonte: criado pelo autor, 2015.				

Figura 13. Processo Biológico – Proteínas identificadas somente no grupo REP.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

Como mostrado na Figura 13 as proteínas identificadas somente no grupo REP apresentaram proteínas classificadas como Transdução de Sinal (26%), Neurotransmissão (21%), Comunicação Química (16%), Diferenciação Celular (9%), Desconhecidas (8%), Metabolismo Citoplasmático (7%), Ciclo Celular (5%), Transporte (3%), Defesa contra stress químico (3%), Componente do Citoesqueleto (1%) e Controle da expressão gênica (1%).

Em comparação com o grupo controle, as proteínas identificadas no grupo REP apresentaram maior porcentagem de proteínas classificadas como Transdução de sinal, Neurotransmissão, Comunicação Química e Diferenciação Celular.

Por terem sido submetidas aos mesmos procedimentos que o grupo controle, excetuando-se o contato com a solução de sacarose (estímulo para memória e aprendizado), as identificações de proteínas para este grupo são condizentes com a condição de submissão ao ensaio de memória e aprendizagem (REP).

Diversos receptores de odor e receptores de ligação de moléculas de odor foram identificados (Tabela 3). Segundo Claudianos e colaboradores (2014), o aprendizado olfativo induz modificações estruturais e funcionais no cérebro de abelhas. A memória olfativa de longo-prazo induz mudanças que sugerem que os mecanismos moleculares envolvidos na memória olfativa também regulam a expressão de receptores olfativos (CLAUDIANOS et al., 2014). No presente estudo o ensaio de REP parece agir como gatilho da cascata neural, pois ao tocarmos a antena das abelhas com a solução de sacarose fazemos com que o odor dessa molécula se ligue aos receptores específicos na antena, levando a ativação de uma série de cascatas metabólicas, através da transdução de sinais; esse processo de comunicação química parece ser essencial no processo de aquisição de memória e aprendizagem olfativa em *A. mellifera*.

Outro fator a ser levado em conta é a plasticidade celular/cerebral. 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). Na Tabela 3 pode-se observar que diversas proteínas estão classificadas como transdução de sinal, neurotransmissão, comunicação química e diferenciação celular (são as quatro categorias com maior porcentagem de identificação). Estas categorias somam 72% das proteínas identificadas no grupo REP, ao passo que no grupo controle somam apenas 46% das proteínas identificadas.

Estes processos biológicos certamente agem como fatores determinantes da plasticidade cerebral em abelhas submetidas ao ensaio de REP. Estes dados sugerem intensa atividade cerebral, alto gasto energético, intensa comunicação química e a ativação de diversas cascatas metabólicas (transdução de sinal) para que o sistema biológico possa adquirir e consolidar a informação recebida a partir da molécula de odor de sacarose.

Diversas proteínas identificadas neste grupo foram previamente descritas em literatura e relacionadas ao processo de memória e aprendizagem. Wang e colaboradores (2013) analisaram a expressão gênica de *A. mellifera* submetidas a ensaios de memória olfativa. Neste trabalho identificam proteínas como:

- *nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit*: tem como função atividade de canal seletivo a cátions ativado por acetilcolina;
- *muscarinic acetylcholine receptor DM-like*: tem como função ativação de receptor de amina acoplado à proteína-G;
- *gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2*: tem como função atividade de receptor de GABA acoplado à proteína-G;
- *metabotropic glutamate receptor 1 precursor*: tem como função a ativação da cascata de sinalização de receptor de glutamato acoplado à proteína-G e ativação de atividade de MAPK

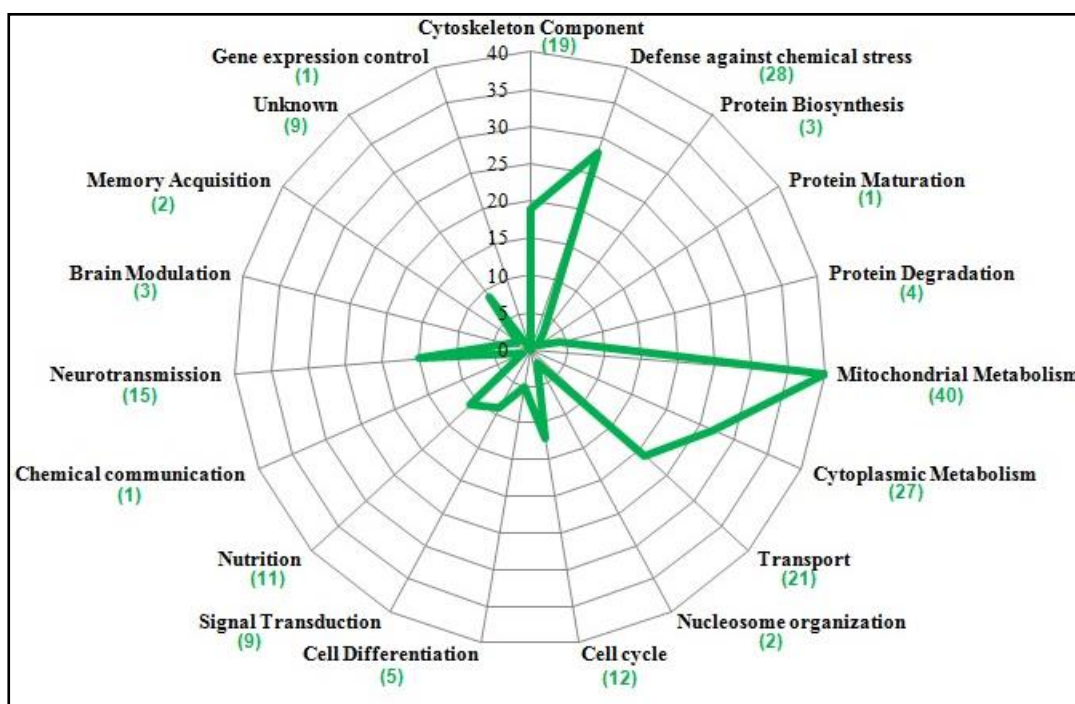
Todas essas proteínas possuem como função a ativação de receptores e cascatas que são essenciais para aquisição de memória (WANG et al., 2013).

Durante o processo de memória e aprendizagem muitas moléculas agem ligando-se a receptores acoplados às proteínas G (*G protein-coupled receptor* - GPCR), tais como os neuropeptídeos e moléculas odoríferas. As GPCRs são uma grande família proteica de receptores transmembranares que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinais no interior da célula. A ligação ao GPCR induz uma alteração conformacional no receptor, que leva à ativação de proteínas G intracelulares (POL, 2012). A ativação dessas proteínas resulta na troca de GDP por GTP na subunidade α das proteínas G e na dissociação da proteína G do GPCR (POL, 2012). Os sinais das moléculas ligantes são, então, amplificados pela indução de múltiplas cascatas de sinalização intracelular que podem envolver a adenilil ciclase, cAMP, MAPK/ERK e a fosforilação de inúmeras proteínas (POL, 2012) (POL, 2012). Na tabela 3 podemos observar que diversas proteínas identificadas estão envolvidas com a cascata de sinalização das GPCRs, tais como a proteína *Regulator of G-protein signaling 7* e a *Metabotropic Glutamate Receptor 1* também foram identificadas proteínas envolvidas na amplificação da sinalização intracelular, tais como proteínas que interagem na rota MAPK/ERK. Essa rota é formada por diversas proteínas celulares que comunicam um sinal do receptor da superfície celular com o DNA no núcleo das células, através da transdução de sinais. Dentre as proteínas identificadas que estão envolvidas nesse processo temos: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-like* e a *Metabotropic Glutamate Receptor 1*.

Para melhor comparação das identificações obtidas foram criados gráficos em teia (Figuras 14 e 15).

A maioria das proteínas identificadas em ambos os grupos (Figura 14) pertence às classes funcionais de: components do citoesqueleto, metabolisme mitocondrial e citoplasmático, transporte e defesa contra estresse químico. Desta forma, os dados sugerem alto nível de estresse químico causado pela submissão das abelhas ao ensaio de extensão de probóscide.

Figura 14. Representação em formato de teia da distribuição funcional das proteínas identificadas em ambos os grupos (verde). O número entre parênteses corresponde ao número de proteínas identificadas em cada grupo funcional.

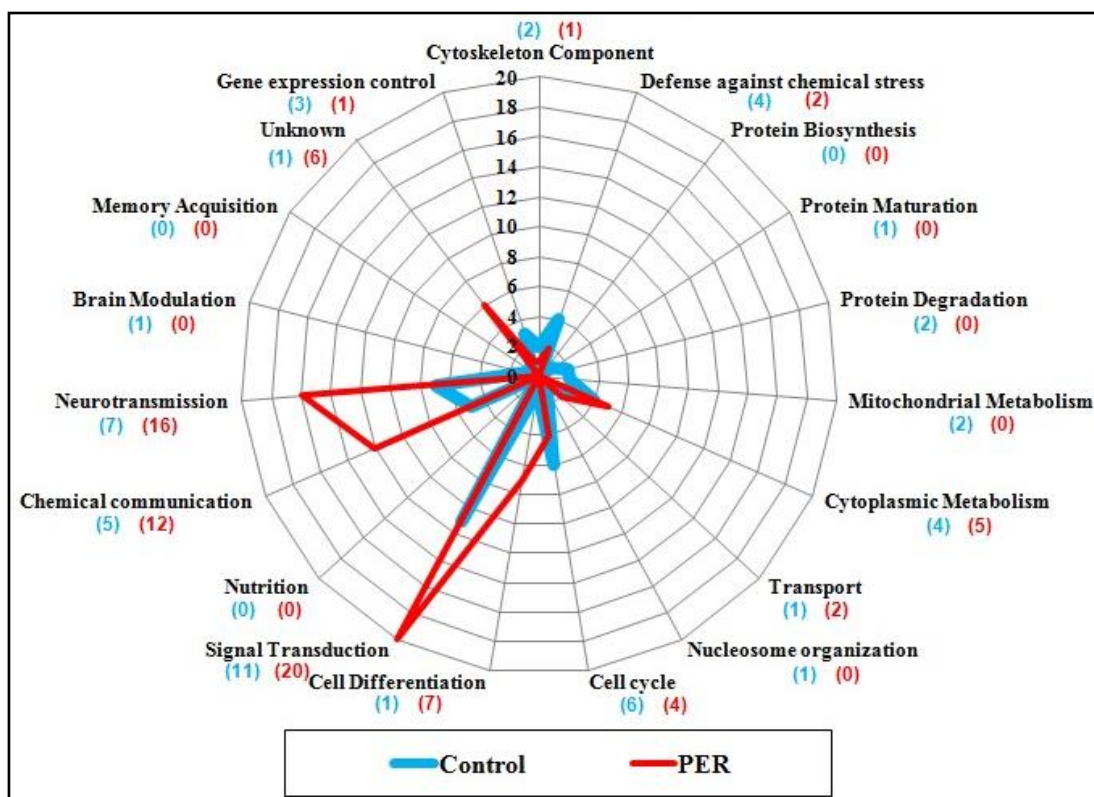


Fonte: criado pelo autor, 2015.

Para as proteínas identificadas exclusivamente no grupo REP (Figura 15), foi observado que a maioria das proteínas pertence aos grupos funcionais de “transdução de sinal”, “neurotransmissão”, “comunicação química” e “diferenciação celular”. Estas quatro categorias funcionais representam 72% das proteínas identificadas no grupo REP, enquanto que essas mesmas quatro categorias representam apenas 46% no grupo controle (Figura 15).

Estes resultados são consistentes com o ensaio biológico aplicado e indica que o grupo REP foi capaz de correlacionar o odor de sucrose com a fonte de alimento.

Figura 15. Representação em formato de teia da distribuição funcional das proteínas identificadas no grupo controle (azul) e no grupo REP (vermelho). O número entre parenteses corresponde ao número de proteínas identificadas em cada grupo funcional.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

4.1.4 Análise de rede de interação de proteínas (exclusivas ao grupo controle, ou exclusivas ao grupo REP)

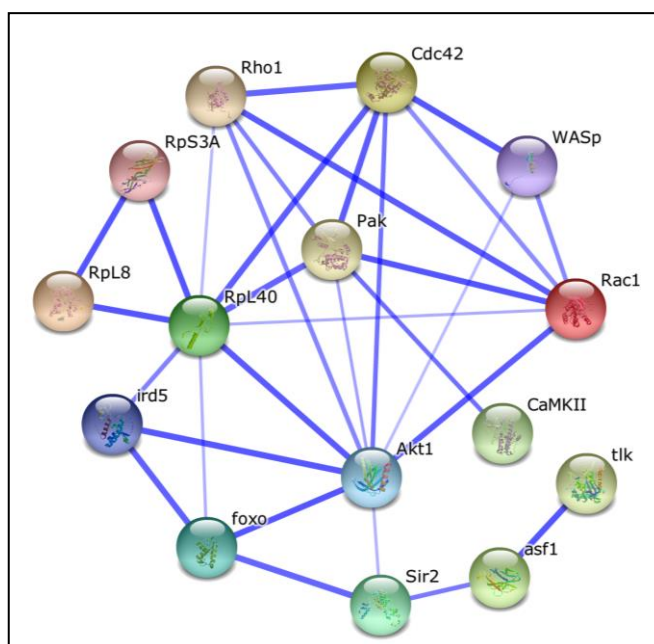
Para as proteínas identificadas somente no grupo controle, ou somente no grupo REP foram criadas redes de interações de proteínas através do software String, a fim de se compreender como as proteínas de cada um destes grupos, interagem entre si, dentro de cada grupo.

Em decorrência da ausência de informação detalhada sobre as funções das proteínas em *Apis*, nós tentamos uma correspondência em *Drosophila* para criar as redes de interação. Comparações entre *Apis* e *Drosophila* são comumente feitas e descritas em literatura (BAER et al., 2009; LI et al., 2013; FENG et al., 2009; WOLCSHIN et al., 2009 e ZANG et al., 2014); neste procedimento, buscou-se por proteínas identificadas em *Apis*, mas com um código correspondente, depositado no software String para *Drosophila*.

Desta forma, redes de interações foram criadas para as proteínas identificadas somente no grupo controle (Figura 16) ou somente no grupo REP (Figura 17).

Para as proteínas exclusivas ao grupo controle, observou-se que as proteínas estão envolvidas no controle do metabolismo e na fosforilação de proteínas. O processo de fosforilação é utilizado em vários processos metabólicos, ativando a sinalização de síntese de proteínas, provavelmente ocasionado pelo estresse do experimento.

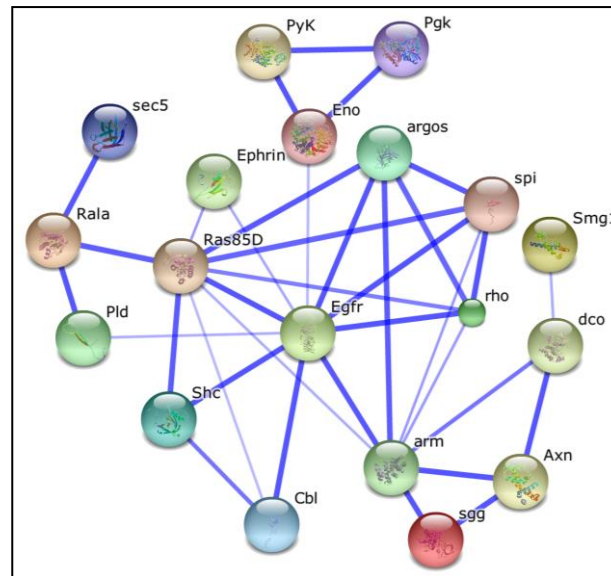
Figura 16. Rede de interação de proteínas identificadas somente no grupo controle. Rac1; RPL8 – Ribosomal protein L8; Cdc42; asf1 - anti-silencing factor 1; Rpl40 - Ribosomal protein L40; Sir2; foxo - forkhead box%2C sub-group O; Akt1; ird5 - immune response deficient 5; WASp; RpS3A - Ribosomal protein S3A; FOR – foraging; Pak; tlk - Tousled-like kinase; CaMKII - alcium/calmodulin-dependent protein kinase II.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

Na Figura 17, a rede de interações criada para as proteínas identificadas somente no grupo REP. Nesta rede obervou-se várias divisões funcionais de acordo com o Gene Ontology (Figura 18, Figura 19 e Figura 20).

Figura 17. Rede de interações de proteínas identificadas somente no grupo REP. Sgg – shaggy; Rala - Ras-related protein; Smg1; Egfr - Epidermal growth factor receptor; rho – rhomboid; Argos; Shc - SHC-adaptor protein; Cbl; sec5; Pgk - Phosphoglycerate kinase; Eno – Enolase; spi – spitz; Ras85D - Ras oncogene at 85D; Pyk - Pyruvate kinase; Axn – Axin; dco - discs overgrown; Ephrin; arm – armadillo; Pld - Phospholipase D.

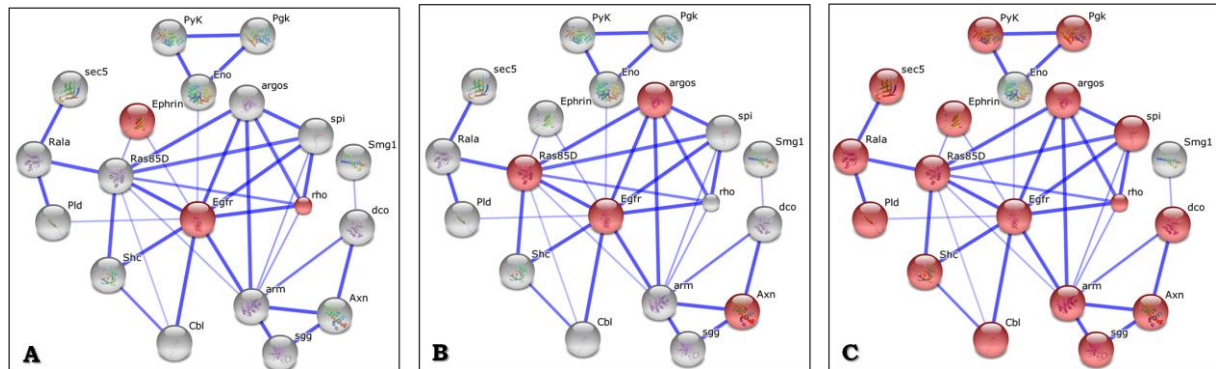


Fonte: criado pelo autor, 2015.

Já na Figura 18, a rede de interações mostra que as proteínas parecem estar envolvidas em diversos processos de desenvolvimento: em A, desenvolvimento do sistema nervoso central, em B desenvolvimento de olhos e antena e em C, desenvolvimento de estruturas anatômicas. O processo de desenvolvimento (Fig. 18) é descrito em literatura como sendo importante no processo de aquisição de memória. Foi demonstrado que, em nível estrutural, experiências olfativas durante o forrageamento induzem robusto aumento no volume de estruturas. Segundo Sandoz (2011), observa-se um aumento no volume dos neuropílos que é dependente da idade para os corpos pedunculados, mas o volume do lobo olfativo e de estruturas visuais aumenta não só idade-dependente, como também de acordo com a experiência (comportamento).

Outros estudos de glómerulos (SIGG et al., 1997; BROWN et al., 2002) também relatam a indução de mudanças de volume e estrutura durante experiências olfativas. Foi demonstrado um aumento específico de volume glomerular em um subconjunto dos glomérulos como um resultado da formação de uma memória olfativa de longo prazo (HOURCADE et al., 2009). Os autores descrevem ainda que, no lobo antenal, a plasticidade neural é diretamente induzida pela aprendizagem.

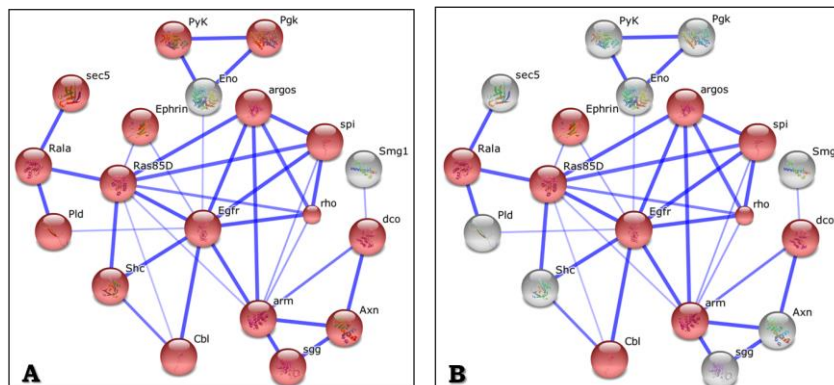
Figura 18. Rede de interação de algumas proteínas identificadas somente no grupo REP e classificadas de acordo com a base GO. A: desenvolvimento do sistema nervoso central; B: desenvolvimento de olhos e antena e C: desenvolvimento de estruturas anatômicas.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

De acordo com as redes de interações visualizada na Figura 19 o cérebro parece ativar a morfogênese de células nervosas para promover a plasticidade cerebral. Estudos demonstram que a neurogênese na fase adulta participa de funções importantes, especialmente as relacionadas com a aprendizagem e memória (GROSS, 2000; KEMPERMANN, 2002). A idéia de que os neurônios gerados na fase adulta estão envolvidos com mecanismos de aprendizagem foi discutida e estudada inicialmente por Nottebohm e Goldman durante o estudo da aprendizagem do canto em aves (GOLDMAN e NOTTEBOHM, 1983). Atualmente, muitos pesquisadores questionam a função da neurogênese na vida adulta, e estudam os efeitos de tal processo (ou a ausência dele) em diferentes organismos a fim de se compreender como estes novos neurônios atuam no sistema nervoso (armazenamento de informações a longo prazo, aumento da capacidade cognitiva dentre outros processos) (CAMERON e GLOVER, 2014; LEUNER et al., 2002).

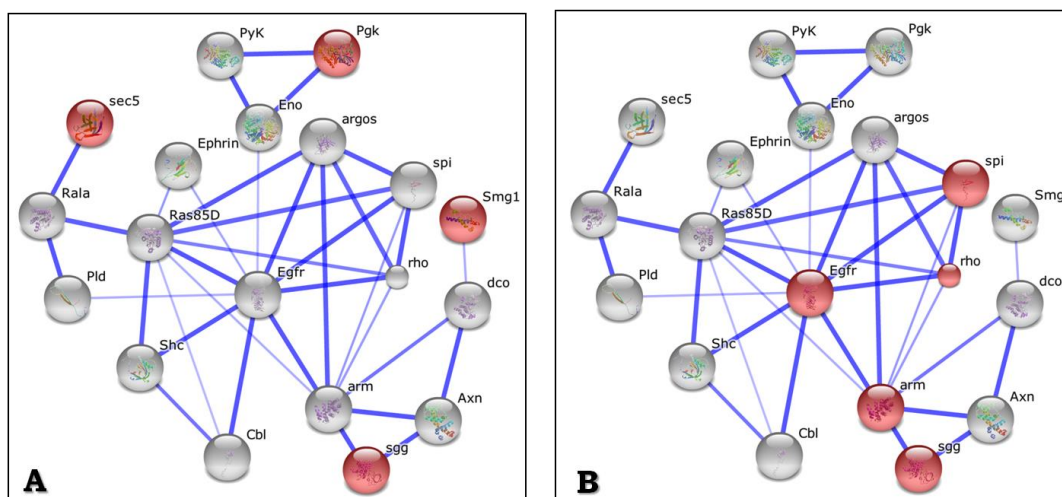
Figura 19. Rede de interação de algumas proteínas identificadas somente no grupo REP e classificadas de acordo com a base GO. A: diferenciação de neurônios/neurogênese; B: morfogênese de estruturas anatômicas.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

Além disso, algumas proteínas foram diretamente associadas com aprendizado e memória, memória olfativa, comportamento olfativo e transmissão sináptica (Figura 20).

Figura 20. Rede de interação de algumas proteínas identificadas somente no grupo REP e classificadas de acordo com a base GO. A: aprendizagem e memória; aprendizado olfativo e cognição; B: transmissão sináptica.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

O processo de aprendizagem e memória é mediado pela plasticidade neuronal, a qual inclui prolongação de sinapses existentes, sinaptogêneses, modulação da excitabilidade intrínseca e neurogênese em adultos. Muitos estudos de eletrofisiologia, imageamento funcional, ou estudos neuroanatômicos descrevem forte plasticidade neural dentro de circuitos olfativos (SANDOZ, 2011). Todos estes estudos demonstram que o sistema olfativo das abelhas está programado para a realização de uma série de operações que são cruciais para atender as demandas da vida social e a busca por comida.

Neste estudo, por análise proteômica, diversos processos biológicos são descritos como sendo ativado durante o processo de memória e aprendizado, tais como desenvolvimento do cérebro e neurogênese, além de processos envolvidos na plasticidade neural.

Muitos animais já foram caracterizados por apresentarem declínio das funções cerebrais em idades avançadas, incluindo abelhas (WOLSCHIN et al., 2012). Entretanto, variações no desenvolvimento social em abelhas resultam em diferenças individuais na progressão da idade que podem ser acelerados, atrasados e algumas vezes revertidos por mudanças no comportamento e necessidades da colônia. Além disso, o sistema olfativo permanece altamente plástico ao longo de toda a vida adulta do organismo (SANDOZ,

2011). Isto sugere que abelhas são um modelo interessante para o estudo da plasticidade em processos cognitivos.

Em função do número de identificações obtido: análise 1 (321 identificações) e na análise 2 (1353 identificações), optou-se por realizar quantificação *label-free* das proteínas identificadas na análise 2.

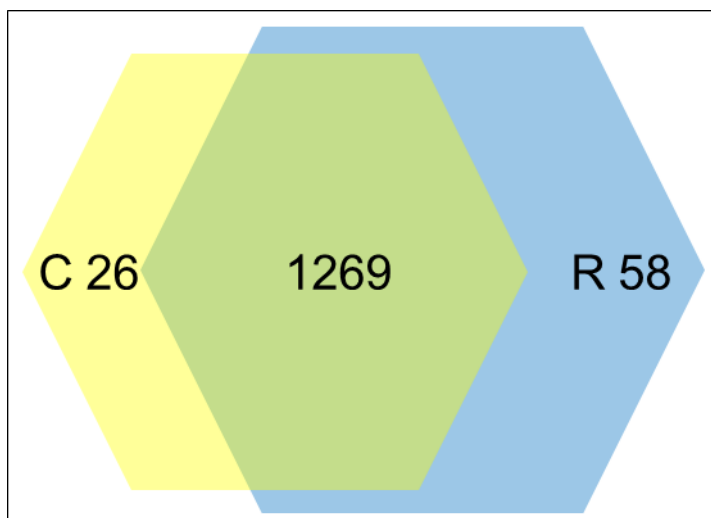
4.2 Resultados obtidos por estratégia *shotgun* em espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL ETD

Durante um treinamento em espectrometria de massas realizado na FioCruz de Curitiba, com equipamento Orbitrap e sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo Costa Carvalho e auxílio da Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer um teste com um novo método de extração de proteínas solúveis permitiu que um maior número de identificações fosse obtido. Os testes iniciais (com abelhas forrageiras, não marcadas e que não passaram pelo ensaio de REP) permitiram a identificação de mais de 1200 proteínas. O experimento em que se aplicou o ensaio comportamental de REP (abelhas com 20 dias de idade) permitiu a identificação de cerca de 1300 proteínas.

Para extração das proteínas solúveis utilizou-se RapiGest (Waters) a 0,2% (v/v) em trietilamônio 50mM. Após o ensaio de REP, dez cérebros foram dissecados e macerados em 150 µL da solução de RapiGest por cinco minutos. As amostras foram centrifugadas a 18000 rcf por quinze minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para que a amostra fosse quantificada. Para quantificação utilizou-se o equipamento Qubit (Invitrogen). A partir do valor de quantificação obtido, 150 µg de amostra foi separada para digestão trípica. O processo de digestão foi realizado conforme descrito no item 3.3. Os experimentos foram realizados em triplicata tanto para o grupo controle quanto para o grupo REP.

Foram identificadas 1353 proteínas, sendo 1269 comuns aos dois grupos, 26 únicas do controle, 58 únicas de REP e 44 diferencialmente expressas utilizando-se o software PatternLab (CARVALHO et al., 2008). A distribuição das proteínas (Diagrama de Venn) nos grupos pode ser visualizada na Figura 21. Em função do tamanho/espço, a tabela completa das identificações está no Anexo III.

Figura 21. Diagrama de Venn para as proteínas identificadas nos grupos controle e experimental, identificadas com o uso do sistema LTQ-Orbitrap XL ETD.



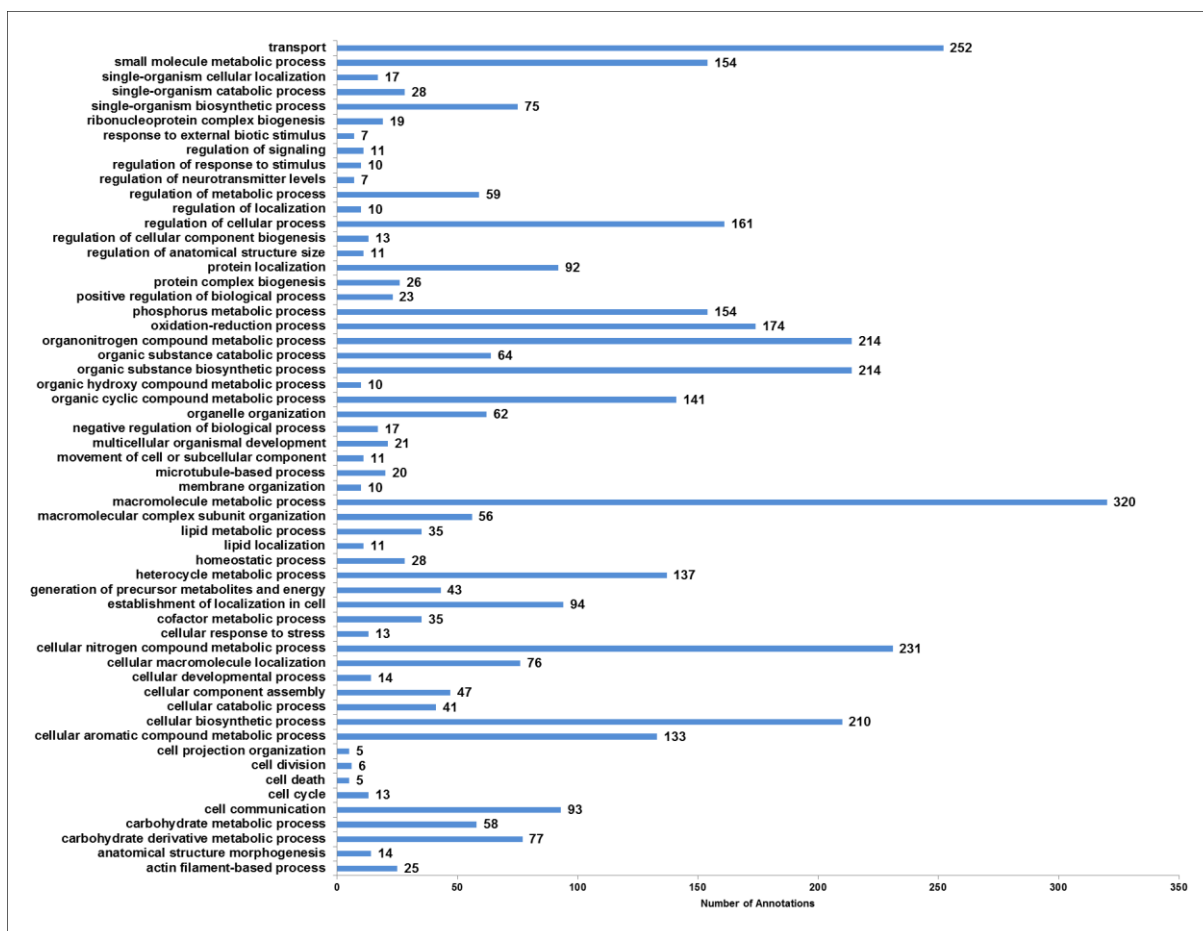
Fonte: criado pelo autor, 2016.

4.2.1 Proteínas identificadas tanto no grupo controle quanto no grupo REP

Segundo os parâmetros descritos anteriormente, 1269 proteínas foram identificadas como sendo comuns a ambos os grupos (Tabela 4 – Anexo II). Na tabela pode-se visualizar a identificação das proteínas, o código de acesso da proteína no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e valor de pValue obtidos a partir do software PatternLab (CARVALHO et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos no software Blast2GO, foi criado um gráfico de barras (Figura 22) que representa os processos biológicos mais significantes dentre as proteínas identificadas. Os dados completos referentes às análises de Blast2GO pode ser encontrado no Anexo IV.

Figura 22. Categorização de todas as proteínas identificadas no cérebro da abelha (considerando os grupos controle e REP) em processo biológico de nível 4 de acordo com a análise pelo Blast2GO.



Fonte: criado pelo autor, 2016.

Este resultado mostra que os principais processos biológicos no cérebro da abelha são relacionados ao transporte, o processamento de pequenas moléculas, a regulação dos processos celulares, o metabolismo do fósforo, processos ox-redox, a biossíntese / catabolismo de substâncias orgânicas, a biossíntese de proteínas e o metabolismo de compostos nitrogenados.

4.2.2 Proteínas identificadas exclusivamente no grupo controle e exclusivamente no grupo REP com o uso do sistema LTQ-Orbitrap XL ETD

Foram identificadas 26 proteínas únicas no grupo controle, e 58 no grupo REP. As proteínas identificadas somente no grupo controle podem ser visualizadas na Tabela 5 e as identificadas somente no grupo REP podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 5. Proteínas identificadas somente no grupo controle.			
Código de acesso	pValue	Proteína	Função
572316394	0.00027036	gephyrin-like isoform X1 [Apis dorsata]	Establishment of synaptic specificity at neuromuscular junction
572309684	0.00069031	cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial-like [Apis dorsata]	Mitochondrial electron transport; gene expression
820861115	0.00015598	cell cycle control protein 50A isoform X1 [Apis florea]	Transport
572266110	0.00025658	eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-like isoform X1 [Apis dorsata]	Translation; gene expression; Directs the termination of nascent peptide synthesis (translation) in response to the termination codons UAA, UAG and UGA
820864455	6.22E-05	E3 ubiquitin-protein ligase SMURF2 isoform X1 [Apis florea]	Gene expression; protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process
572307607	0.00019385	microsomal triglyceride transfer protein large subunit-like [Apis dorsata]	Lipid transport
820865977	0.00027499	alpha-N-acetylglucosaminidase [Apis florea]	Carbohydrate metabolic process;
28201825	0.00283531	Melittin	It increases the permeability of cell membranes to ions, particularly Na ⁺ and indirectly Ca ²⁺
48101413	0.00018412	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase [Apis mellifera]	tRNA processing
571572819	0.0001607	85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2-like [Apis mellifera]	lipid metabolic process; Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis
380021437	0.00021794	cGMP-dependent protein kinase, isozyme 2 forms cD5/T2 [Apis florea]	Signal transduction; neuron migration
380017597	8.80E-05	putative ATP-dependent RNA helicase Pl10 [Apis florea]	Translational initiation; cell differentiation
571501059	0.00018403	importin subunit alpha-3 [Apis mellifera]	Cytokine-mediated signaling pathway
380028389	0.000257	uncharacterized protein LOC100866826 [Apis florea]	Unknown

820858777	0.00092961	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic [Apis florea]	Response to starvation; ketone body biosynthetic process; brain development
66508242	0.00091819	cysteine sulfinic acid decarboxylase-like isoform X3 [Apis mellifera]	Carboxylic acid metabolic process; taurine biosynthetic process
820865075	0.00067687	uncharacterized protein LOC100872391 [Apis florea]	Unknow
572318265	0.00021249	metaxin-2-like isoform X2 [Apis dorsata]	Protein targeting to mitochondrion
820838108	0.00029829	type-2 histone deacetylase 1 [Apis florea]	Transcriptional regulation
110755983	0.00058894	coiled-coil domain-containing protein 58-like [Apis mellifera]	Unknow
571577446	0.00036202	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoform X1 [Apis mellifera]	DNA repair; protein deubiquitination
380013771	0.00010145	ATP-binding cassette sub-family E member 1 [Apis florea]	May protect against heart failure under conditions of tachycardic stress; transport
373203037	0.00042852	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7 [Apis cerana]	Oxidation-reduction process
572306641	0.00017764	DNA mismatch repair protein Mlh3-like [Apis dorsata]	Mismatch repair; protein localization
571507718	1.46E-05	nesprin-1-like [Apis mellifera]	May be involved in the maintenance of nuclear organization and structural integrity
572305886	9.38E-05	methionine--tRNA ligase, cytoplasmic-like [Apis dorsata]	Gene expression; translation
Fonte: criado pelo autor, 2016.			

Tabela 6. Proteínas identificadas somente no grupo REP.			
Código de acesso	pValue	Proteína	Função
572303892	0.006187327	tropomyosin-1, isoforms 9A/A/B-like isoform X34 [Apis dorsata]	Muscle contraction; dendrite morphogenesis
20138953	0.001096794	Full=Major royal jelly protein 3	Nutrition
572308465	0.002221738	troponin I-like isoform X21 [Apis dorsata]	Muscle contraction
373211472	0.001784346	40S ribosomal protein S23 [Apis cerana]	Translation; gene expression
380030096	0.003100389	60S ribosomal protein L37a [Apis florea]	Translation; focal adhesion
572297073	0.000619919	protein FAM162B-like [Apis dorsata]	Integral component of membrane
328782283	0.000521622	tumor suppressor candidate 3-like [Apis mellifera]	Protein N-linked glycosylation; transport; cognition
380014359	0.000193501	scavenger receptor class B member 1 [Apis florea]	Receptor-mediated endocytosis; cell adhesion;
380028021	0.000176258	bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Apis florea]	Purine biosynthesis; brainstem development; cerebral cortex development
328777128	0.000421962	putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1-like isoformX2 [Apis mellifera]	Aminoacyl-tRNA hydrolase activity
571574382	0.001930889	chymotrypsin inhibitor-like isoform X3 [Apis mellifera]	Peptidase inhibitor activity
820848042	0.000326684	dnaJ homolog subfamily C member 22 [Apis florea]	Protein refolding
380015267	0.000404485	persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial isoform X1 [Apis florea]	hydrogen sulfide catabolism in the mitochondrial matrix; glutathione metabolic process.
380017778	0.000455638	programmed cell death protein 5 [Apis florea]	Apoptotic process; cellular response to transforming growth factor beta stimulus;
571527764	1.75E-05	papilin-like isoform X2 [Apis mellifera]	Cell rearrangements; modulating metalloproteinases action during organogenesis
571573872	0.000154503	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial-like isoform X1 [Apis mellifera]	Ketogenesis (alternative source of energy to glucose); mitochondrion organization;

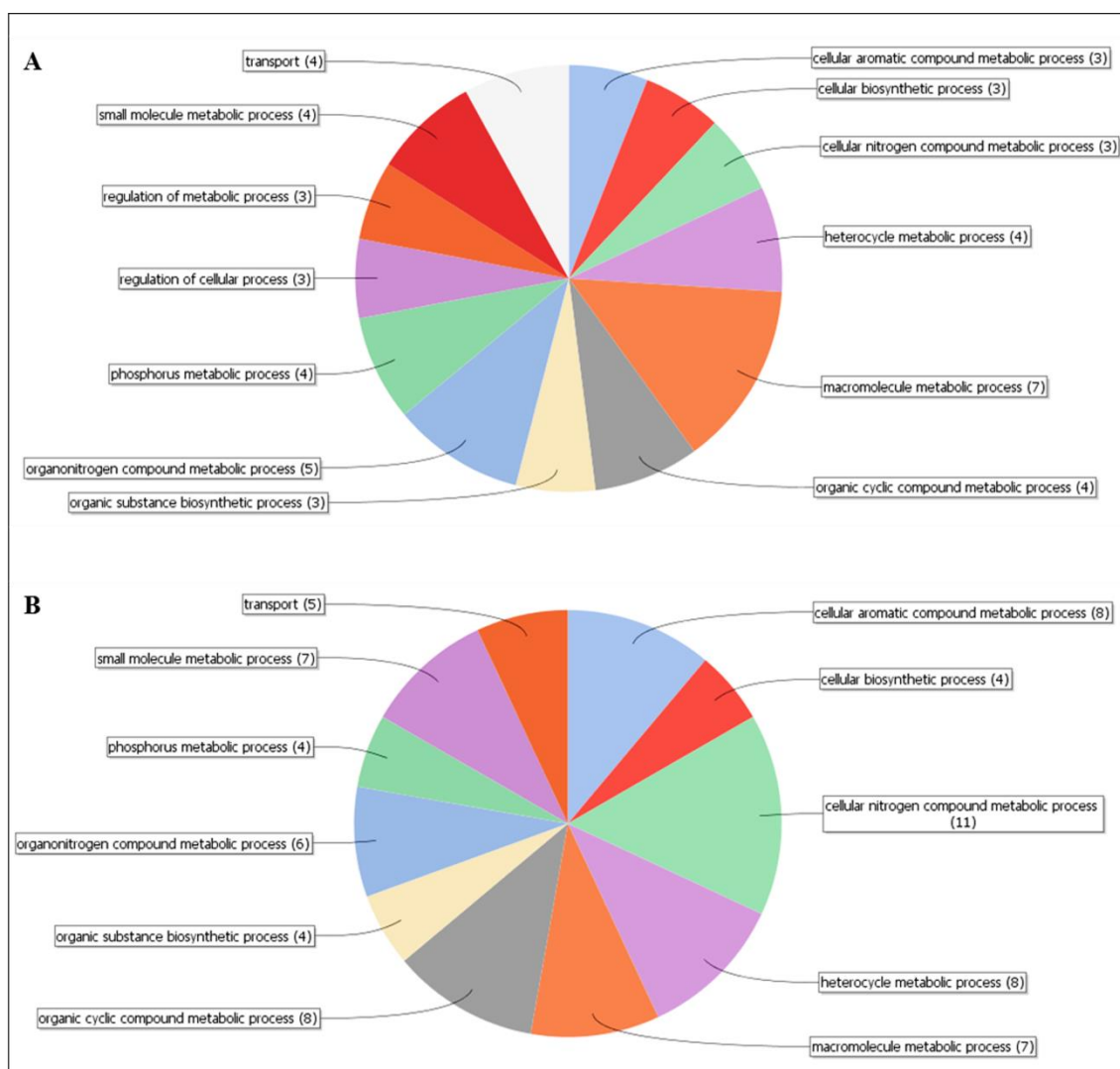
66514532	0.000433533	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like [Apis mellifera]	Recruitment, assembly and/or regulation of a variety of signaling molecules;
572314172	0.000452313	nucleolar protein 58-like isoform X2 [Apis dorsata]	rRNA modification; cell growth
572271381	0.000154627	putative ferric-chelate reductase 1 homolog isoform X1 [Apis dorsata]	Oxidation-reduction process
820844091	8.79E-05	asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] isoform X1 [Apis florea]	L-asparagine biosynthesis; response to nutrient levels
820866486	0.000622215	small ubiquitin-related modifier 3 [Apis florea]	Nuclear transport, DNA replication and repair, mitosis and signal transduction; post-translational protein modification
571576375	0.000266203	long-chain fatty acid transport protein 4 [Apis mellifera]	Response to nutrient; transmembrane transport
572317990	0.000251191	PX domain-containing protein kinase-like protein-like isoform X1 [Apis dorsata]	Binds to and modulates brain Na,K-ATPase subunits ATP1B1 and ATP1B3 and may thereby participate in the regulation of electrical excitability and synaptic transmission.
572297844	0.000228298	GDP-Man:Man(3)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-mannosyltransferase-like [Apis dorsata]	Biosynthetic process; post-translational protein modification
380024704	0.000384287	dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial [Apis florea]	Response to starvation; oxidation-reduction process;
820844631	0.000898456	small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 [Apis florea]	Splicing of cellular pre-mRNAs; central nervous system development; neuron differentiation
820839774	0.00102055	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 isoform X2 [Apis florea]	Transfer of electrons from NADH to the respiratory chain; respiratory electron transport chain
373204224	0.000614338	Septin-2 [Apis cerana]	Cytokinesis; neurogenesis; regulation of L-glutamate transport
380014988	0.001130075	apolipoporphins [Apis florea]	Transport for various types of lipids; Wnt signaling pathway; transport
572298373	0.001230644	apolipoporphins-like [Apis dorsata]	Transport for various types of lipids; Wnt signaling pathway; transport

820841040	0.000305035	coatomer subunit beta [Apis florea]	Mediate biosynthetic protein transport from the ER, via the Golgi up to the trans Golgi network
380017696	0.000416433	mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog 1-like [Apis florea]	Channel-forming protein essential for import of protein precursors into mitochondria
380022501	0.000729133	endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1-like [Apis florea]	Structural constituent of cuticle
380022594	0.001110577	endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2-like isoform X1 [Apis florea]	Structural constituent of cuticle
373208644	0.000718669	Protein lethal(2)essential for life [Apis cerana]	Protein lipidation; regulation of translational initiation by eIF2 alpha phosphorylation
571540960	0.000508494	non-specific lipid-transfer protein-like isoform X1 [Apis mellifera]	May play a role in regulating steroidogenesis
571576907	0.00058646	26S protease regulatory subunit 7 [Apis mellifera]	ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins; protein polyubiquitination
300593245	0.000255337	unnamed protein product [Apis mellifera]	Unknow
572305981	0.002430722	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8-like [Apis dorsata]	Import and insertion of some multi-pass transmembrane proteins into the mitochondrial inner membrane; nervous system development;
380020436	0.000858849	regucalcin-like isoform X2 [Apis florea]	Modulates Ca ²⁺ signaling, and Ca ²⁺ -dependent cellular processes and enzyme activities
110758964	0.001808931	regucalcin-like [Apis mellifera]	Modulates Ca ²⁺ signaling, and Ca ²⁺ -dependent cellular processes and enzyme activities
572302484	0.000417999	solute carrier family 25 member 46-like [Apis dorsata]	Transport
572307192	0.000663906	neuronal calcium sensor 2-like isoform X3 [Apis dorsata]	Neuronal calcium sensor, regulator of G protein-coupled receptor phosphorylation in a calcium dependent manner
571514423	9.70E-05	twitchin [Apis mellifera]	Regulator of muscle contraction and relaxation; protein phosphorylation
571506597	0.000434749	histone H1.2-like [Apis mellifera]	Histones H1 are necessary for the condensation of nucleosome chains into higher-order structures

572313551	0.000281528	protein lethal(2)essential for life-like [Apis dorsata]	protein lipidation; regulation of translational initiation by eIF2 alpha phosphorylation
572304388	0.000812124	probable small nuclear ribonucleoprotein Sm D1-like [Apis dorsata]	Essential for pre-mRNA splicing; mRNA processing
66523683	0.000144149	aspartate-tRNA ligase, cytoplasmic [Apis mellifera]	Translation; tRNA aminoacylation for protein translation
380015451	0.002008667	tetra-peptide repeat homeobox protein 1-like [Apis florea]	DNA binding
572313862	0.000850678	PDZ and LIM domain protein Zasp-like isoform X1 [Apis dorsata]	Regulator of cell matrix adhesion; act as an adapter that brings other proteins (like kinases) to the cytoskeleton;
571525756	1.25E-05	uncharacterized protein LOC408779 [Apis mellifera]	Unknow
66532125	0.000913657	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J isoform 1 [Apis mellifera]	Required for several steps in the initiation of protein synthesis; neurogenesis
66511652	0.000180624	asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic-like [Apis mellifera]	Translation; tRNA aminoacylation for protein translation
571505185	0.0003463	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial-like [Apis mellifera]	Accessory subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase;
449310784	0.000284438	dehydrogenase/reductase SDR family member 4 [Apis mellifera]	Alcohol metabolic process; protein tetramerization; receptor binding
571546137	0.001017636	pupal cuticle protein-like [Apis mellifera]	Chitin-based cuticle development
328783881	0.000105038	slit homolog 2 protein-like isoform X1 [Apis mellifera]	Nervous system development; axonogenesis; axon guidance; olfactory bulb development
571532852	0.000188716	UDP-glucuronosyltransferase 2B13-like [Apis mellifera]	Flavonoid biosynthetic process; xenobiotic metabolic process
Fonte: criado pelo autor, 2016.			

A análise Blast2GO para as proteínas únicas é mostrada na Fig. 23A (para o grupo de controle) e 23B (para o grupo REP). Esta análise revelou que as 26 proteínas únicas no grupo de controle pertencem a 13 categorias dos processos biológicos, enquanto que as 58 proteínas únicas REP pertencem a 11 diferentes processos biológicos.

Figura 23. Categorização de acordo com o processo biológico em nível 4 usando o algoritmo Blast2GO para as proteínas únicas de cada grupo: **(A)** proteínas identificadas apenas no controle grupo; **(B)** proteínas identificadas apenas no grupo REP.



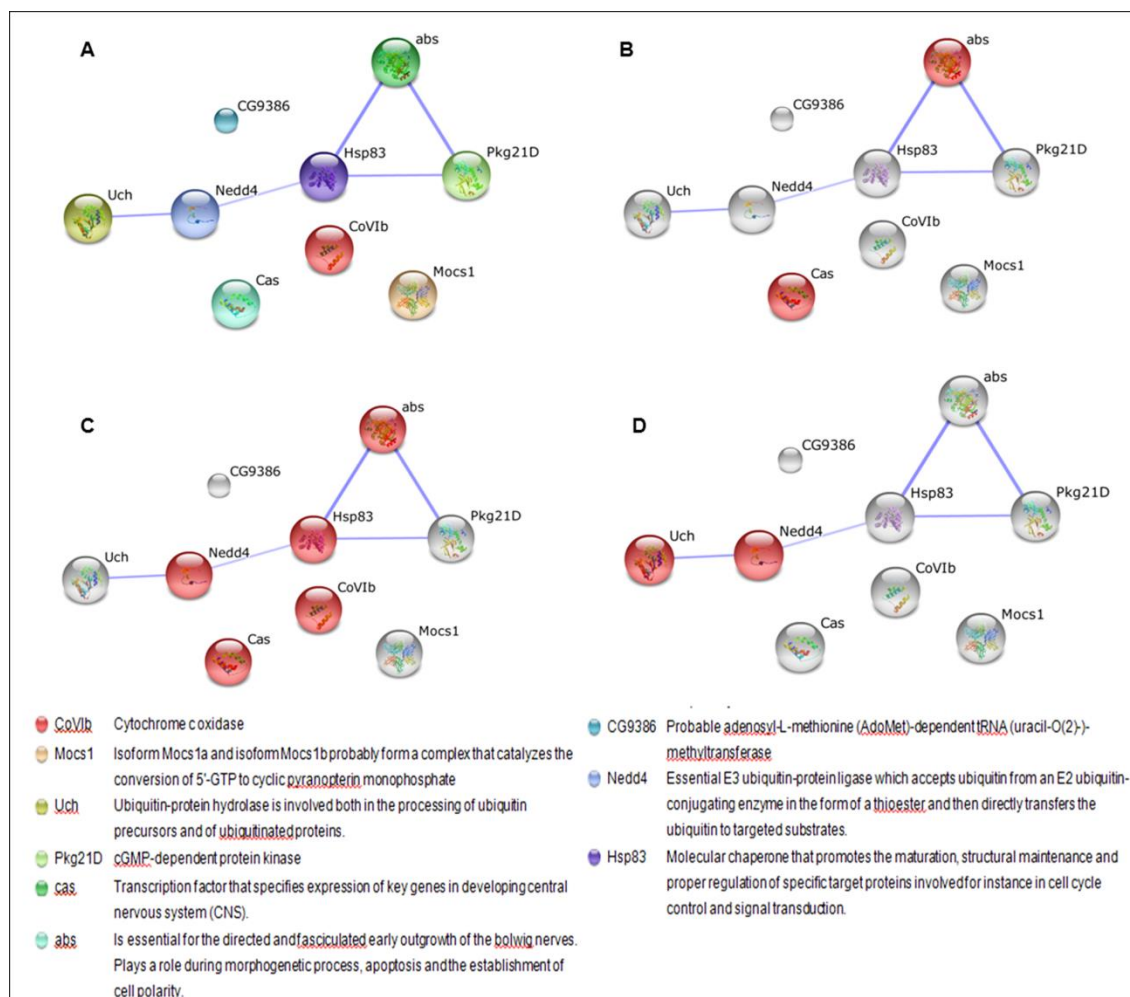
Fonte: criado pelo autor, 2016.

A análise dos termos GO enriquecidos para as proteínas únicas do grupo controle revelou 5 e 4 processos biológicos e / ou moleculares diferentes nos cérebros dos indivíduos do grupo controle (*naive*) e no grupo REP, respectivamente. Os termos GO enriquecidos do

grupo de controle foram os de importação de proteínas no núcleo (GO: 0006606), processo metabólico de ATP (GO: 0046034), metionina (GO: 0006555), a ubiquitinação de proteínas (GO: 0016567) e desubiquitinação de proteínas (GO: 0016579). Entretanto, entre as proteínas únicas do cérebro de indivíduos do grupo REP, os termos GO enriquecidos foram processamento de RNA (GO: 0006396), tradução (GO: 0006412), nucleotídeos (GO: 0009117), e montagem de proteína macromolecular (GO: 0034622).

Redes de interação proteína-proteína foram criadas utilizando-se a ferramenta String. Assim, quando as 26 proteínas únicas do grupo controle foram submetidas à análise com o algoritmo String, 9 foram identificadas para participar com redes protéicas, conforme ilustrado na Figura 24A. As redes identificadas estão relacionadas com a regulação da morte celular (Figura 24B), diferenciação do sistema nervoso (Figura 24C) e catabolismo protéico (Figura 24D). Quando as 58 proteínas únicas do grupo REP foram analisadas com String, 19 foram identificadas como participantes de redes protéicas conhecidas (Figura 25A). Essas redes estavam relacionadas aos circuitos reguladores dos processos biossintéticos (Figura 25B), ao metabolismo dos carboidratos (Figura 25C), à diferenciação do sistema nervoso (Figura 25D), ao metabolismo geral (Figura 25E) e a uma resposta específica ao estímulo (percepção do odor da sacarose) (Figura 25F).

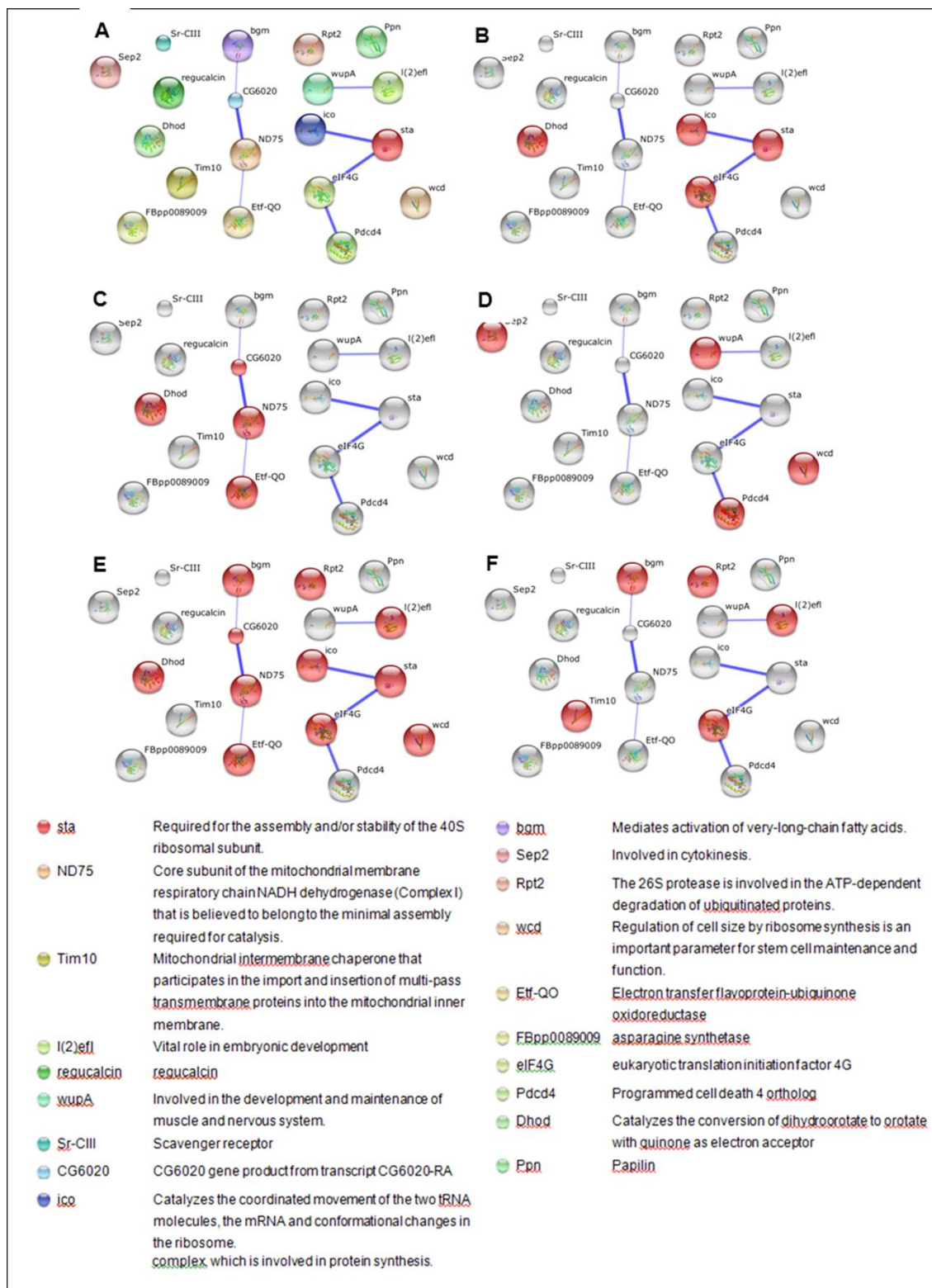
Figura 24. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para **(A)** proteínas identificadas apenas no grupo controle; **(B)** Morte celular, **(C)** Desenvolvimento do sistema nervoso, neurogênese e diferenciação neuronal e **(D)** Proteólise envolvida no processo de catabolismo de proteína. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas.



Fonte: String, criado pelo autor, 2016.

Uma interpretação dos resultados mostrados na Figura 24 revela que nove das proteínas únicas do grupo de controle formaram uma pequena rede relacionada com o controle da morte celular (Figura 24B) e a diferenciação do sistema nervoso (Figura 24C), e a proteólise associada ao catabolismo proteico (Figura 24D). Estes processos constituem circuitos reguladores normais necessários à plasticidade cerebral das abelhas operárias, que estão principalmente relacionadas com as características temporais do polietismo desses insetos.

Figura 25. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para (A) proteínas identificadas apenas no grupo REP; (B) Processo biossintético, (C) Processo metabólico derivado de carboidrato, (D) Desenvolvimento do sistema nervoso, neurogênese e diferenciação neuronal, (E) Processo metabólico primário e (F) Resposta ao estímulo. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas.



Fonte: String, criado pelo autor, 2016.

Quando as proteínas únicas do cérebro dos indivíduos do grupo REP foram analisadas com o algoritmo String, formaram uma rede envolvida na regulação de cinco circuitos reguladores diferentes (Figura 25B-F): processos biossintéticos gerais (Figura 25B), metabolismo de carboidratos (Figura 25C), desenvolvimento do sistema nervoso (Figura 26D), metabolismo primário (Figura 26E) e resposta específica ao estímulo (Figura 26F). Entre esses circuitos reguladores, i) o metabolismo dos carboidratos, ii) o desenvolvimento de sistema, e iii) resposta específica ao estímulo merecem ênfase.

O cérebro da abelha parece se adaptar ao REP, requerendo energia e metabolismo de carboidratos. Em relação à resposta específica ao estímulo (reconhecendo o odor da sacarose e estendendo a probóscide), as proteínas envolvidas nessa resposta (chaperona mitocondrial, desenvolvimento embrionário de proteínas vitais, proteínas responsáveis pela ativação de ácidos graxos e fatores de tradução) parecem estar relacionados à síntese de fatores de crescimento. Estes processos aparentemente estão relacionados com a adaptação do cérebro a um estímulo específico.

Um total de 1353 proteínas foram identificadas de forma confiável nos cérebros de ambos os grupos (1295 proteínas foram identificadas no grupo controle, 1327 proteínas foram identificadas no grupo REP). Entre estas proteínas, 26 eram únicas para o grupo de controle (Tabela 4), enquanto 58 eram únicas para o grupo REP (Tabela 5). A interrogação de Blast2GO DB para estas proteínas únicas revelou

Conforme ilustrado na Figura 23:

i) 11 foram relacionadas ao metabolismo de compostos nitrogenados no grupo REP (versus apenas 3 proteínas no grupo controle).

ii) 8 proteínas foram relacionadas ao metabolismo de compostos heterocíclicos no grupo REP, enquanto que apenas 4 proteínas foram relacionadas a esse metabolismo no grupo controle.

iii) 8 proteínas foram relacionadas ao metabolismo de compostos aromáticos no grupo REP, enquanto que apenas 3 proteínas foram relacionadas a esse metabolismo no grupo controle.

iv) 8 foram relacionadas ao metabolismo de compostos cíclicos no grupo REP, enquanto que apenas 4 proteínas foram relacionadas a esse metabolismo no grupo controle.

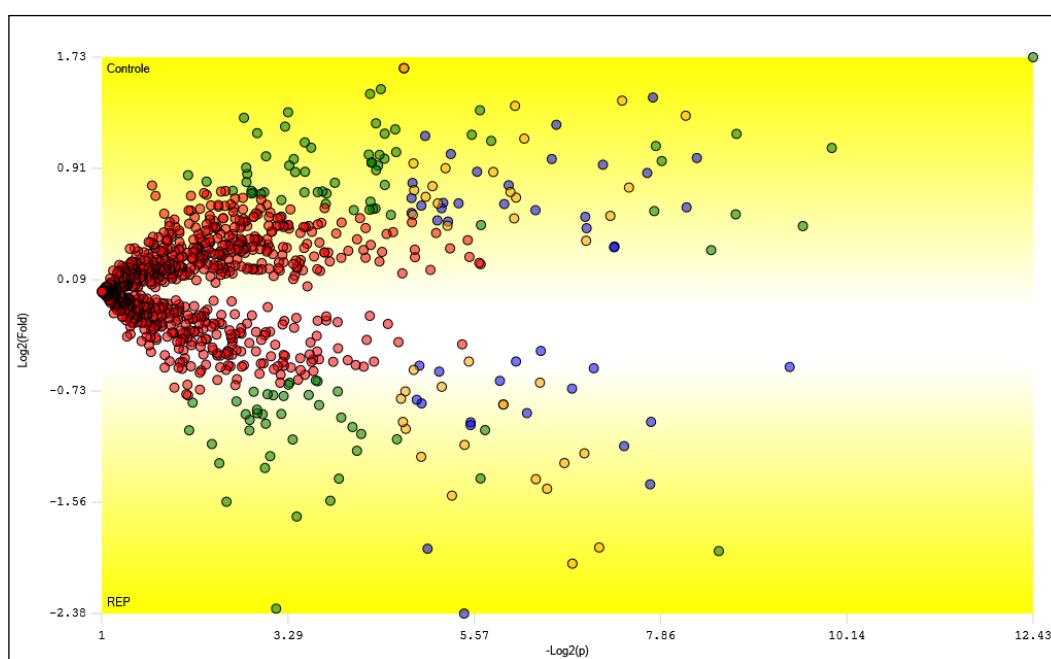
Deste modo, 35 das 58 proteínas únicas para os cérebros de indivíduos no grupo REP estão relacionadas com o metabolismo de compostos cíclicos / heterocíclicos / aromáticos; Contudo, 14 das 26 proteínas individuais no grupo de controle estão relacionadas com estas transformações, sugerindo que as transformações metabólicas de compostos contendo estruturas aneladas são particularmente importantes durante o REP. Essas observações incluem o metabolismo de algumas classes neurofisiologicamente importantes de compostos tais como piridinas (niacina), pirroles (pirrole-2-carboxilato), purinas (adenosina), pirimidinas (uridina 5'-monofosfato), indoles (serotonina, triptamina), imidazoles e compostos fenil (Dopa e dopamina).

Os resultados da análise de termos GO enriquecidos estão indicando que o treinamento de abelhas forrageiras para o comportamento REP parece desencadear respostas diferentes no cérebro da abelha, com diferentes tipos de regulação da expressão da proteína.

4.2.3 Proteínas comuns a ambos os grupos, mas que são diferencialmente expressas

As proteínas que apresentaram valores de NSAF estatisticamente significativos (Figura 26) e que, portanto, foram consideradas diferencialmente expressas podem ser visualizadas na Tabela 7 (*down-regulated* – valores negativos de TFold) e Tabela 8 (*up-regulated* – valores positivos de TFold de acordo com os dados gerados pelo PatternLab). A classificação tem como referência o grupo REP, sendo que as proteínas podem estar *up-regulated* ou *down-regulated* em relação ao grupo controle. Os valores de TFold, pValue e NSAF são gerados pelo software PatternLab 3.0.0.30.20 (CARVALHO et al., 2008).

Figura 26. Quantificação *label-free* baseada nas contagens espectrais para as proteínas identificadas nos grupos controle e REP, usando o teste-T. As proteínas são plotadas como pontos de acordo com o Log_2 do valor de p (eixo x) e Log_2 do valor de TFold (eixo y). Os pontos vermelhos são proteínas que não atingiram valores satisfatórios tanto para valores “p”, como para valores de TFold (FDR com $\alpha = 0,05$); os pontos verdes são aqueles que satisfazem o valores de TFold, mas não os valores de p; os pontos alaranjados são aqueles que satisfazem valores de p, mas não de TFold. Os pontos azul representam as proteínas que satisfazem todos os filtros estatísticos.



Fonte: criado pelo autor por meio do software PatterLab, 2016.

Tabela 7. Proteínas *down-regulated* no grupo REP, quando comparadas ao grupo controle.

Código de acesso	Fold Change	pValue	Proteína	Função
20138892	-5.202536	0.022944	Major royal jelly protein 2; Short=MRJP-2	Plays an important role in honeybee nutrition
572264329	-3.732665	0.031317	PREDICTED: muscle-specific protein 20-like [Apis dorsata]	maintenance of the neuromuscular junction; synapse; phosphorylation
380017591	-2.683406	0.004716	PREDICTED: 60S ribosomal protein L8 [Apis florea]	translation; centrosome duplication
20138866	-2.206654	0.005886	Major royal jelly protein 1; Short=MRJP-1	Caste determination, defense against microorganism infection
572315191	-1.981185	0.021713	PREDICTED: 60S ribosomal protein L30-like [Apis dorsata]	translation; focal adhesion
571544763	-1.953545	0.021704	PREDICTED: putative acyl-CoA-binding protein-like [Apis mellifera]	energy metabolism; transport; learning and memory; long-term synaptic potentiation
66552169	-1.949275	0.00468	PREDICTED: 60S ribosomal protein L28 [Apis mellifera]	translation; gene expression; neurogenesis
571500813	-1.863367	0.013449	PREDICTED: 40S ribosomal protein S17 [Apis mellifera]	translation; gene expression; focal adhesion;
572302099	-1.773173	0.032934	PREDICTED: 60S ribosomal protein L4-like [Apis dorsata];	translation; centrosome duplication; gene expression; focal adhesion
571500154	-1.740841	0.03432	PREDICTED: alkylidihydroxyacetonephosphate synthase-like [Apis mellifera]	ether lipid biosynthesis; oxidation-reduction process
380027232	-1.643647	0.009163	PREDICTED: 40S ribosomal protein S4 [Apis florea]	translation; focal adhesion
571550343	-1.579705	0.016926	PREDICTED: fatty acid synthase-like [Apis mellifera]	regulation of muscle contraction; troponin complex

572299096	-1.506677	0.028357	PREDICTED: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type-like isoform X4 [Apis dorsata]	glutamine metabolic process
284812514	-1.480842	0.007616	MRJP5 [Apis mellifera]	caste determination, influence by environmental factors
78101800	-1.471263	0.00144	TPA_exp: troponin T isoform 4 [Apis mellifera]	signal peptide; peripheral nervous system axon regeneration; calcium ion binding
380029418	-1.461579	0.033559	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100871673 [Apis florea]	structural constituent of ribosome; translation
94400893	-1.43053	0.01476	troponin T, skeletal muscle [Apis mellifera]	structural constituent of ribosome; translation; RNA binding
820837885	-1.355229	0.011953	PREDICTED: 40S ribosomal protein S6 [Apis florea]	mitochondrion degradation; regulation of autophagy; multicellular organismal aging; protein homodimerization activity
Fonte: criado pelo autor, 2016.				

Tabela 8. Proteínas *up-regulated* no grupo REP, quando comparadas ao grupo controle.

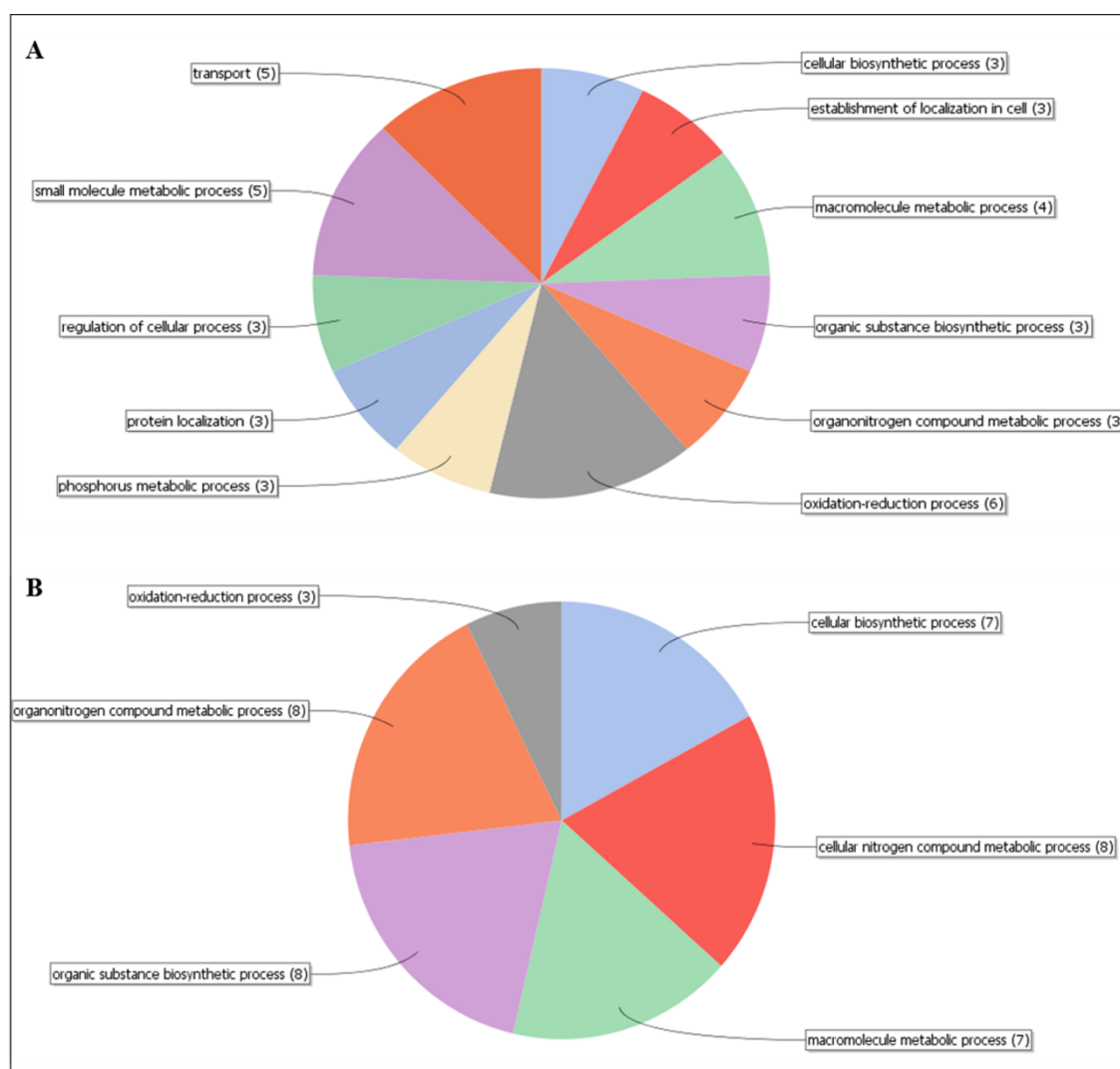
Código de acesso	Fold Change	pValue	Proteína	Função
66514595	1.25493	0.00641	PREDICTED: ras-related protein Rab-3 isoformX2 [Apis mellifera]	multicellular organismal development; caste determination, influence by environmental factors
571554588	1.259689	0.006386	PREDICTED: 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X5 [Apis mellifera]	tricarboxylic acid cycle; oxidation-reduction process
335892820	1.383799	0.008097	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial [Apis mellifera]	protein transport; signal transduction; GTP binding
571575167	1.431369	0.026327	PREDICTED: NADP-dependent malic enzyme isoform X1 [Apis mellifera]	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process;
507418852	1.439915	0.02881	Rab escort protein [Apis mellifera]	transferase activity; cell cycle
380028013	1.466512	0.00819	PREDICTED: ATP-dependent RNA helicase WM6 [Apis florea]	mRNA export;
380026816	1.496064	0.035878	PREDICTED: mitochondrial fission 1 protein [Apis florea]	apoptotic process; peroxisome fission;
571537241	1.517303	0.012505	PREDICTED: transcriptional activator protein Pur-beta-B-like isoform X2 [Apis mellifera]	cell differentiation; cell proliferation
295422209	1.532515	0.0278	unnamed protein product [Apis mellifera]	intracellular signal transduction; protein ubiquitination
66561330	1.539567	0.00346	PREDICTED: phosphoglucomutase isoform X3 [Apis mellifera]	breakdown and synthesis of glucose; cell adhesion
820856961	1.552771	0.033009	PREDICTED: EH domain-containing protein 3 [Apis florea]	endocytic transport

572263147	1.565997	0.016314	PREDICTED: proton-coupled amino acid transporter 1-like isoform X1 [Apis dorsata]	Neutral amino acid/proton symporter; transport
328779221	1.571725	0.024051	PREDICTED: UDP-glucuronosyltransferase 1-3-like [Apis mellifera]	elimination of potentially toxic xenobiotics and endogenous compounds; glycoprotein biosynthetic process
380030413	1.575212	0.027414	PREDICTED: failed axon connections [Apis florea]	neurogenesis
380016147	1.614437	0.03588	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100867355 [Apis florea]	unknown
571514456	1.724201	0.015708	PREDICTED: RNA-binding protein squid-like [Apis mellifera]	mRNA splicing, via spliceosome
66546988	1.744358	0.035589	PREDICTED: D-arabinitol dehydrogenase 1-like [Apis mellifera]	desconhecido
571573277	1.836049	0.004836	PREDICTED: CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 homolog isoform X1 [Apis mellifera]	depression of endoplasmic reticulum Ca ²⁺ stores during autophagy
373205486	1.84741	0.020548	Ras-related protein Rab-8A [Apis cerana]	regulators of intracellular membrane trafficking; transport
572316658	1.915055	0.007048	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: proteasome subunit alpha type-5-like [Apis dorsata]	proteolysis; proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; apoptotic process
66547760	1.971948	0.010894	PREDICTED: dihydropteridine reductase isoform X2 [Apis mellifera]	cofactor for phenylalanine, tyrosine, and tryptophan hydroxylases; oxidation-reduction process
571550590	1.982327	0.003171	PREDICTED: glutaminase kidney isoform, mitochondrial isoformX1 [Apis mellifera]	Regulates the levels of the neurotransmitter glutamate in the brain; glutamate biosynthetic process; gene expression
571518500	2.022802	0.025687	PREDICTED: 40S ribosomal protein S21-like isoform X1 [Apis mellifera]	translation initiation factor; gene expression
380024395	2.219811	0.031959	PREDICTED: glutaredoxin 3 [Apis florea]	cell redox homeostasis
66506276	2.350153	0.010474	PREDICTED: uncharacterized protein LOC551541 [Apis mellifera]	unknown

380025630	2.702238	0.004606	PREDICTED: calumenin [Apis florea]	peripheral nervous system axon regeneration
Fonte: criado pelo autor, 2016.				

A análise de Blast2GO para as proteínas diferencialmente expressas é mostrada na Figura 27A (proteínas *down-regulated* no grupo REP) e 27B (proteínas *up-regulated* no grupo REP). A análise revelou que 26 proteínas *down-regulated* pertencem a 11 categorias diferentes de processos biológicos, enquanto que 18 proteínas *up-regulated* pertencem a 6 categorias diferentes de processos biológicos.

Figura 27. Categorização de acordo com o processo biológico em nível 4 usando o algoritmo Blast2GO para as proteínas diferencialmente expressas: **(A)** proteínas *down-regulated* no grupo REP; **(B)** proteínas *up-regulated* no grupo REP.



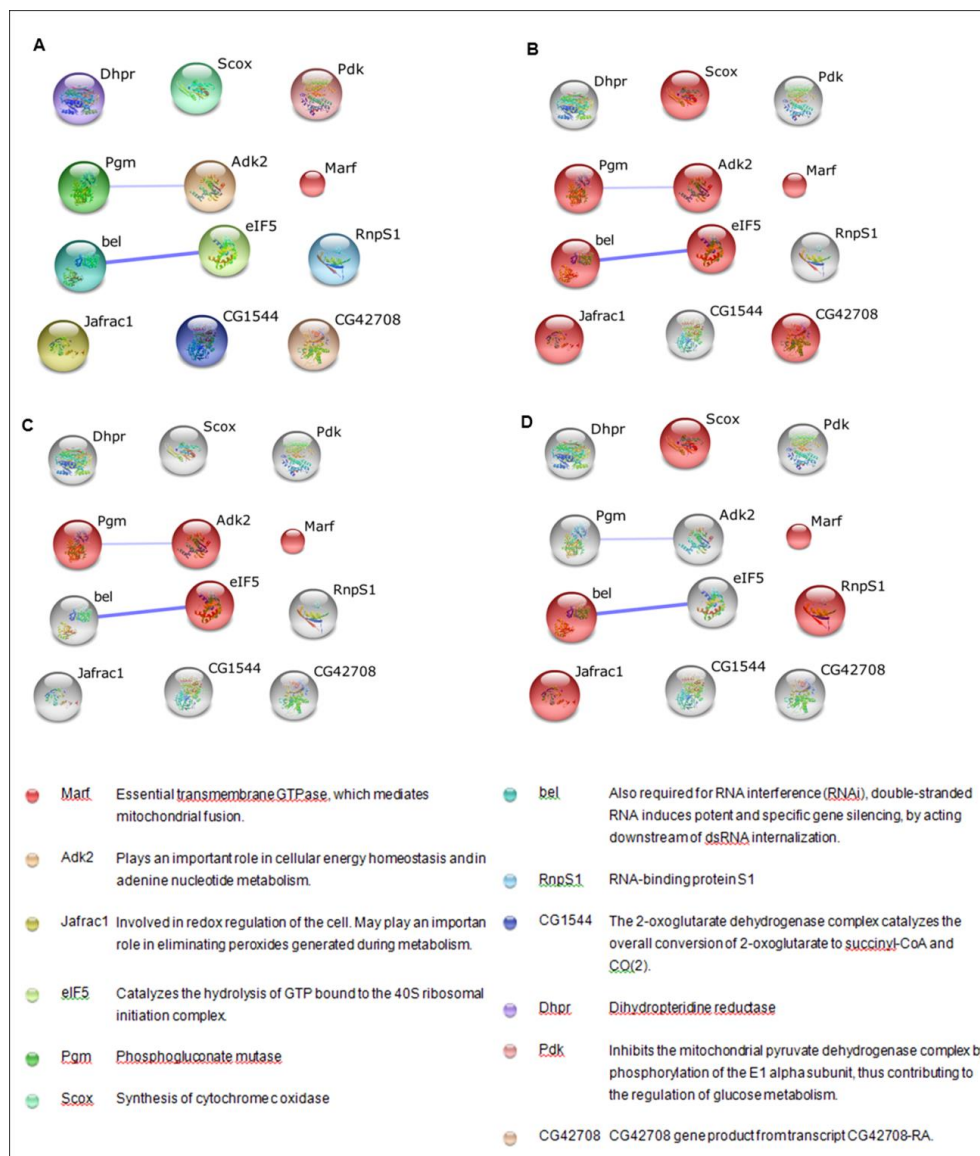
Fonte: criado pelo autor, 2016.

A análise de enriquecimento de termos GO detectou 5 e 4 processos biológicos e moleculares para as proteínas *down-regulated* e para as *up-regulated* no grupo REP, respectivamente. Os termos GO enriquecidos das proteínas *down-regulated* foram o transporte intracelular (GO: 0046907), a transdução de sinal (GO: 0007165), o processo catabólico do ácido tricarboxílico (GO: 0072352), a regulação do processo metabólico da

nucleobase purina (GO: 0006141), modificação-dependente do processo catabólico (GO: 0019941). Entretanto, entre as proteínas *up-regulated*, os termos GO enriquecidos foram o transporte intracelular de proteínas transmembranares (GO: 0006725), a regulação do processo metabólico de RNAm (GO: 1903311) e a resposta imune inata (GO: 0045087).

As proteínas *down-regulated* nos cérebros das abelhas do grupo REP foram submetidas ao String e 12 destas proteínas foram identificadas em redes de proteínas (Figura 28A). As redes identificadas foram relacionadas à regulação do desenvolvimento anatômico e diferenciação celular (Figura 28B), processos biossintéticos gerais (Figura 28C) e regulação biológica geral (Figura 28D). As 18 proteínas *up-regulated* no grupo REP foram também analisadas com String, e 10 participaram em redes de proteínas (Figura 29A). As redes identificadas foram relacionadas à regulação do desenvolvimento da estrutura anatômica (Figura 29B), organização do citoesqueleto (Figura 29C) e processos biossintéticos gerais (Figura 29D).

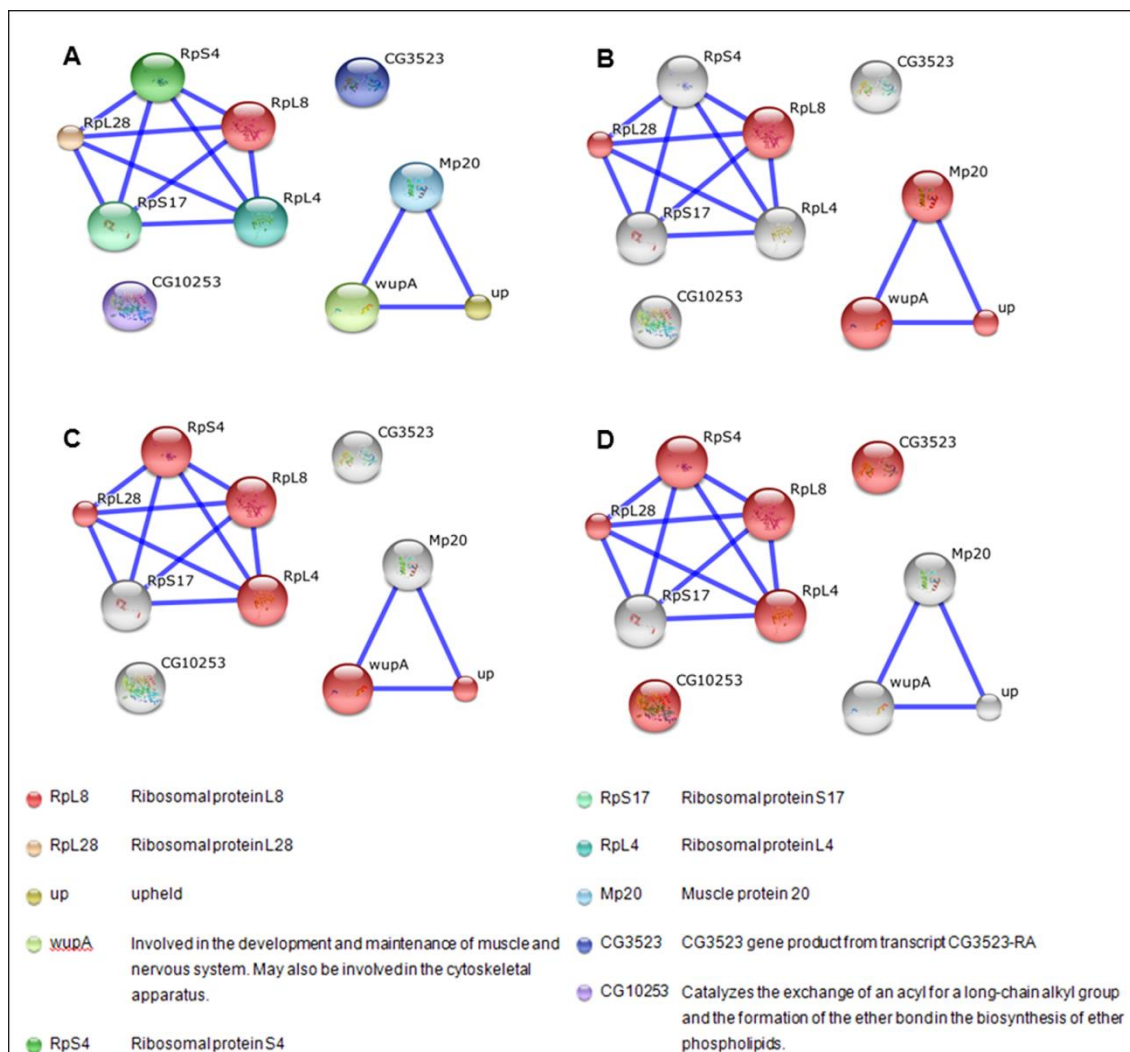
Figura 28. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para **(A)** proteínas *down-regulated* no grupo REP; **(B)** Sistema de desenvolvimento, estruturas anatômicas desenvolvimento e diferenciação celular, **(C)** Processo biossintético e **(D)** Regulação biológica. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas.



Fonte: String, criado pelo autor, 2016.

A análise de rede realizada para as proteínas *down-regulated* nos cérebros dos indivíduos do grupo REP (Fig. 28B-D) revelou três circuitos reguladores: i) desenvolvimento anatômico e diferenciação celular (Figura 28B), ii) processo biossintético geral (Figura 28C), e iii) regulação do processo biológico geral (Figura 28D).

Figura 29. Rede de interação proteína-proteína construída usando STRING v10.0 para **(A)** proteínas *up-regulated* no grupo REP; **(B)** Sistema de desenvolvimento, estruturas anatómicas desenvolvimento e diferenciação celular, **(C)** Processo biossintético e **(D)** Regulação biológica. Proteínas com associação mais forte são ligadas por linhas mais espessas.



Fonte: String, criado pelo autor, 2016.

A análise com o algoritmo String das proteínas *up-regulated* no cérebro de indivíduos do grupo REP, revelou a formação de uma pequena rede relacionada à regulação de três processos (Fig. 29B-D): i) desenvolvimento anatômico (Fig. 29B), ii) desenvolvimento do citoesqueleto (Fig. 29C), e iii) processos biossintéticos gerais (Fig. 29D). A sub-regulação do desenvolvimento anatômico e do citoesqueleto é de notável importância.

Os resultados podem indicar algum grau de diferenciação celular. Algumas regiões do cérebro das abelhas são conhecidas por ter uma importância especial em termos de memória odorante, especialmente os corpos cogumelares, que têm uma notável plasticidade estrutural de acordo com a idade e / ou ambiente específico das abelhas (HEISENBERG et al., 1998).

Entre as 1269 proteínas comuns a ambos os grupos, 18 foram *up-regulated* nos indivíduos do grupo REP (Tabela 7), 26 foram *down-regulated* no grupo REP (Tabela 6). Quando Blast2GO foi utilizado para a análise dessas proteínas, algumas características metabólicas foram observadas (como mostrado na Figura 27):

- i) um total de 16 das proteínas *up-regulated* foram relacionadas com processo metabólico de compostos nitrogenados, enquanto apenas 3 proteínas *down-regulated* pertenciam a este processo.
- ii) 3 proteínas *down-regulated* estavam relacionadas com o metabolismo de metabólitos fosforilados.

O fato de que foram identificadas mais proteínas *down-regulated* do que *up-regulated* é consistente com relatos anteriores em que o uso de REP foi associado com o CS e em que se descreveu mais genes *down-regulated* do que *up-regulated* (MATSUMOTO et al., 2014; WANG et al., 2013 e Cristino et al., 2014). Importante enfatizar que dentre as proteínas que apresentaram maior FC no grupo de proteínas *up-regulated* no grupo REP, as proteínas de geléia real (royal jelly proteins), MRJP-1 e MRJP-2, são também as proteínas mais abundantes em cérebros de abelhas cuidadoras quando comparadas com abelhas forrageiras (GARCIA et al., 2009).

5. Conclusões gerais

O REP é considerado um estímulo não-condicionado (US) e é frequentemente utilizado em ensaios comportamentais para avaliar a capacidade destes insetos para estabelecer associações entre o US e CS. As abelhas geralmente são recompensadas com uma solução de carboidratos (GIURFA et al., 2012; HAMMER et al., 1992; GARCIA et al., 2009; GERBER et al., 1996). Esses experimentos avaliam mudanças bioquímicas e genéticas no final de dois tipos de manipulação de insetos, ou seja, indivíduos são treinados para REP em associação com um segundo comportamento (como reconhecer o tamanho de um objeto / cor ou até mesmo um odor). Se uma associação entre processos é estabelecida por abelhas, os indivíduos estendem sua probóscide para serem recompensados com uma solução de carboidratos. Assim, as variáveis bioquímicas e / ou genéticas observadas refletem as mudanças globais induzidas por ambas as manipulações de insetos. O REP sozinho é um reflexo importante na parte da estratégia experimental para acessar a habilidade das abelhas em aprender. Portanto, é necessário identificar as alterações bioquímicas induzidas nos cérebros das abelhas por este reflexo (US).

Ao investigar esse processo, é importante considerar que a memória olfativa de abelhas operantes foi inicialmente adquirida durante visitas às flores para coletar néctar. Esta memória é então transferida para o paradigma no laboratório durante os ensaios. Portanto, um componente da memória olfativa no cérebro da abelha operária está presente na aplicação do paradigma laboratorial. Para acessar os principais processos bioquímicos ocorridos durante a execução de REP no cérebro de abelhas forrageiras, a presente pesquisa delineou o perfil proteômico de abelhas de 20 dias, treinadas para a execução de REP e comparado com abelhas não treinadas (grupo controle).

Notavelmente, não existe um banco de dados rico em anotações funcionais para *A. mellifera*, assim como não existe até o momento um banco de dados específico de interações proteína-proteína para abelhas. Os dados disponíveis em String DB para a taxa *A. mellifera* são reduzidos e o número de redes específicas formadas também foi relativamente reduzido, mas estas simulações de redes são consistentes.

Em suma, o presente estudo objetivou estudar os cérebros de abelhas forrageiras submetidas ao ensaio de REP. Como resultado, observou-se que o cérebro sofreu uma série de transformações metabólicas específicas e vários processos biológicos em nível celular para adaptar os cérebros dos insetos para coordenar o reconhecimento de odor e associar este odor a um comportamento reflexo de extensão da probóscide.

A análise comparativa dos perfis proteômicos para os cérebros de operárias de abelhas submetidas e não submetidas ao ensaio de REP revelou que os cérebros de indivíduos estimulados por REP demonstraram uma ativação do metabolismo de compostos cíclicos / heterocíclicos / aromáticos em paralelo com o metabolismo de compostos nitrogenados. Este processo seguiu-se pela regulação negativa de proteínas envolvidas no metabolismo de metabólitos fosforilados e a regulação positiva das proteínas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos. Isto provavelmente ocorreu para fornecer energia metabólica para os processos celulares necessários para adaptar o cérebro ao REP. Em relação aos processos celulares, o perfil proteômico foi estimulado pelo REP, o que indica uma série de vários estímulos à diferenciação do sistema nervoso. Contudo, houve uma regulação negativa no desenvolvimento anatômico e na diferenciação celular em outros neurônios, seguida pela regulação positiva das proteínas envolvidas no desenvolvimento anatômico e do citoesqueleto.

PARTE II
Transcriptoma

6. MATERIAIS E MÉTODOS

O isolamento de RNA foi realizado utilizando o kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha). Foram utilizados 800 indivíduos e após a remoção do cérebro, os mesmos foram imersos em azoto líquido e pulverizados com a ajuda de uma argamassa e pilão e homogeneizados em QIAzol *Lysis Reagent*. A adição de gDNA *Eliminator Solution* e clorofórmio viabilizaram a separação de uma fase aquosa (RNA partições) e uma fase orgânica (DNA e proteínas) após a centrifugação. A fase aquosa superior foi recolhida, misturada com etanol, e o RNA foi purificado utilizando colunas de rotação de RNeasy. A fase aquosa foi misturada com etanol para proporcionar condições de ligação apropriadas, e aplicada a uma coluna de rotação RNeasy Mini. O RNA total ligou-se à membrana da coluna de rotação, enquanto que os fenóis e outros contaminantes foram lavados de forma eficiente. RNA de alta qualidade foi então eluído em água isenta de RNase.

6.1 Isolamento de mRNA, fragmentação e priming

O primeiro passo no fluxo de trabalho envolveu a purificação das moléculas de mRNA poli (A) utilizando esferas magnéticas poli (T)-oligo-ligadas. O RNA total reunido foi submetido a RNA-Seq seguindo o protocolo de sequenciação de mRNA fornecido por New England Biolabs (NEBNext kit, NEB, Frankfurt, Alemanha). Resumidamente, o RNA total foi diluído com água livre de nuclease num tubo de PCR livre de nuclease e mantido em gelo, seguido pela adição de pérolas NEBNext Oligo d (T) 25 e misturados. A solução estava no suporte magnético à temperatura ambiente durante 2 min e o sobrenadante foi removido do tubo. Estas etapas foram repetidas 2 vezes. Depois disso as esferas foram ressuspensas em tampão de ligação de RNA e 50 µl de RNA total. O tubo foi incubado durante 5 min a 65 °C e depois arrefecido até 4 °C para desnaturar o RNA e facilitar a ligação do RNAm poli-A às pérolas após 5 min de incubação à temperatura ambiente. O tubo estava no suporte magnético à temperatura ambiente durante 2 minutos para separar as esferas de ligação de mRNA poli-An da solução. O sobrenadante foi removido, enquanto o sedimento foi lavado 2 vezes com tampão de lavagem. Depois de se adicionarem 50 µl de tampão tris, misturou-se a amostra, incubou-se a 80 °C durante 2 minutos e depois manteve-se a 25 °C para eluir o mRNA Poly-An das esferas. Novamente, adicionou-se 50 µl de tampão de ligação de RNA à amostra para permitir que o mRNA voltasse a se ligar às esferas. E como no passo anterior, a mistura completa foi incubada à temperatura ambiente durante 5 min, colocada num suporte

magnético durante 2 min, após o que o sobrenadante foi removido. As amostras foram lavadas com tampão de lavagem e depois com tampão tris. A remoção das esferas foi realizada com 15 µl do primeiro tampão de reação de síntese de cadeia e misturado a 94 °C durante 15 minutos.

6.2 Cadeia primária e segunda síntese de cDNA

Os fragmentos de RNA foram copiados para DNA complementar de primeira cadeia (cDNA) utilizando transcriptase inversa e *primers* aleatórios. 10 µl de RNAm foram misturados com inibidor de RNase Murino, Actinomicina D (0,1 µg / µl), Transcriptase Reversa ProtoScript II (NEBNext kit, NEB) e água livre de nuclease de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas num termo ciclador pré-aquecido: 10 minutos a 25 °C, 15 minutos a 42 °C, 15 minutos a 70 °C e manter a 4 °C. De modo a realizar a segunda síntese de DNAC, foram adicionadas as seguintes soluções à mistura anterior, de acordo com as instruções do fabricante: água livre de nuclease, tampão de reação de síntese de segunda cadeia (10X) e mistura de enzima de síntese de segunda cadeia, incubando-se a 25°C durante 1 h, com tampa aquecida ajustada a ≤ 40 °C.

6.3 Purificação de cDNA de cadeia dupla

A fim de purificar o cDNA de cadeia dupla, utilizaram-se grânulos de 1,8X Agencourt AMPure XP (NEBNext kit, NEB). Misturaram-se 144 µl das esferas com uma reação de síntese de segunda cadeia (~80 µl), seguido de incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Enquanto os alvos de DNA foram ligados a pérolas, o sobrenadante foi removido após 5 min de incubação da mistura sobre suporte magnético. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol a 80% e seco ao ar durante 10 minutos num suporte magnético. A eluição do alvo de DNA foi realizada com água livre de nuclease. Misturaram-se as amostras com água isenta de nucleases, agitaram-se em vórtice, centrifugaram-se rapidamente e colocaram-se num suporte magnético. O sobrenadante foi utilizado para os passos seguintes.

6.4 End repair/dA-tail da biblioteca de cDNA

O cDNA de cadeia dupla purificado foi misturado com DNAC de dA-Tailed, tampão de reação de reparação NEBNext End Repair (10X) e NEBNext End Prep Enzyme Mix (kit NEBNext, NEB) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas num termo ciclador como segue: 30 minutos a 20 °C, 30 minutos a 65 °C e mantido a 4 °C. Blunt / TA ligase máster foi misturado com o adaptador NEBNext diluído e a água livre de nuclease e incubou-se durante 15 minutos a 20 °C. Utilizou-se água isenta de nuclease para

ajustar o volume a 100 µl, seguido pela mistura com a amostra do passo anterior e incubação à temperatura ambiente durante 5 min. O sobrenadante (contendo fragmentos indesejados) foi rejeitado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol a 80% e seco ao ar. O alvo de DNA foi eluído com água isenta de nuclease, misturado com pérolas 1X AMPure XP, incubado durante 5 min e o sobrenadante foi separado das esferas no suporte magnético. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol a 80% e seco ao ar. O alvo de DNA foi eluído com água livre de nucleasse, prosseguindo para o passo seguinte.

6.5 USER excisão, enriquecimento e purificação da biblioteca PCR

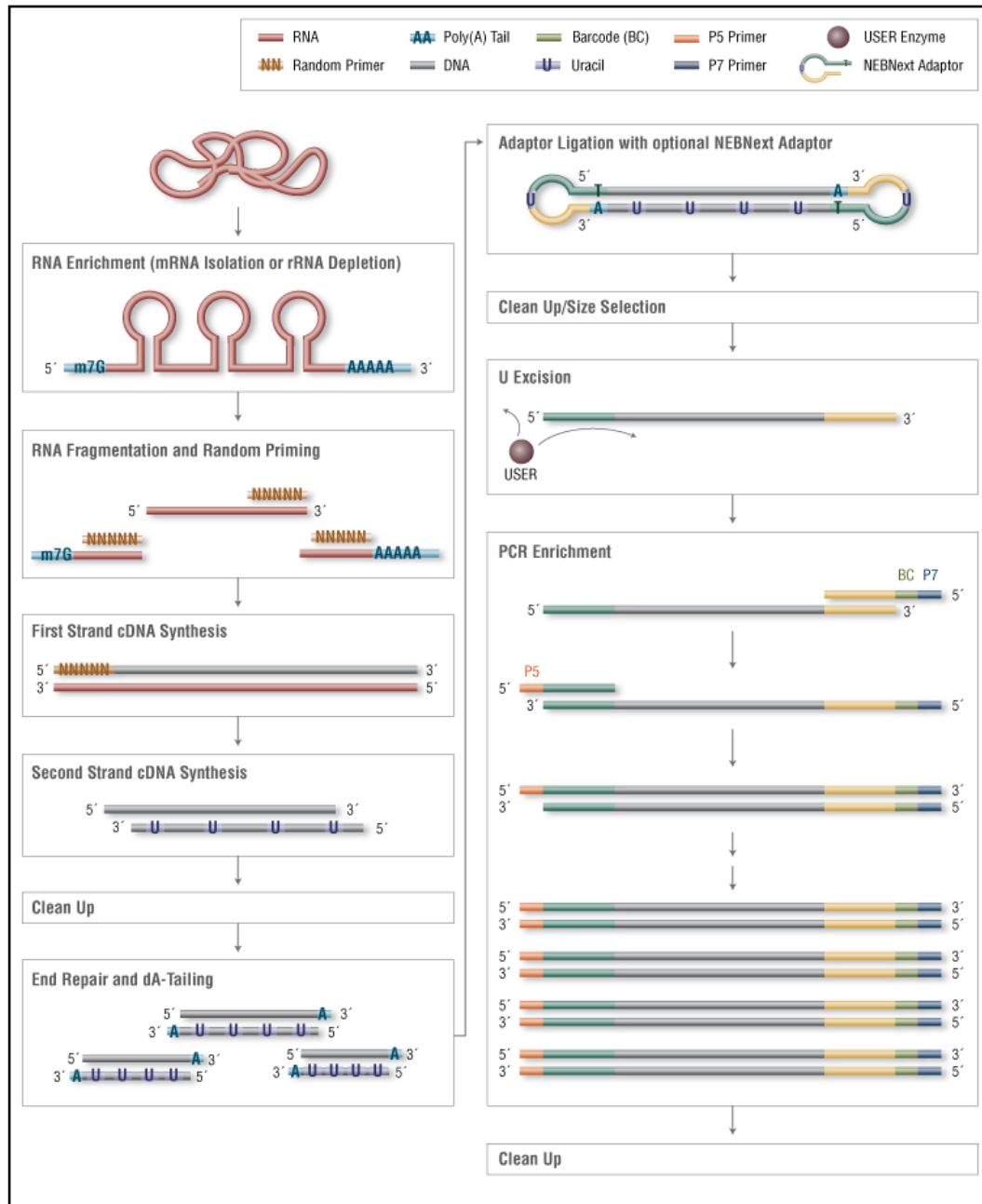
A amostra foi misturada com enzima NEBNext USER, NEBNext de alta fidelidade PCR master mix (2X), Universal PCR primer e índice (273) primer de acordo com as instruções do fabricante. As condições de ciclagem de PCR foram: digestão USER (37 °C, 15 min e 1 ciclo), desnaturação inicial (98 °C, 30 segundos e 1 ciclo), desnaturação (98 °C, 10 seg e 15 ciclos), recozimento (65 °C, 30 seg e 15 ciclos), extensão (72 °C, 30 seg e 15 ciclos), extensão final (72 °C, 5 min, 1 ciclo). As amostras foram misturadas com pérolas AMPure XP e incubadas 5 min à temperatura ambiente. Após 5 min em estante magnética, o sobrenadante foi rejeitado, o sedimento foi lavado duas vezes com etanol a 80% e seco ao ar. O alvo de DNA (distribuição de tamanho de ~ 200-250 pb) foi eluído com água livre de nuclease e armazenado a -20 °C.

6.6 Seleção de *Adaptor-ligated* DNA e sequenciamento

A amostra foi misturada com esferas AMPure XP (NEBNext kit, NEB) de acordo com as instruções do fabricante e incubadas 5 minutos à temperatura ambiente. O suporte magnético foi utilizado para separar as esferas (contendo fragmentos grandes não desejados) do sobrenadante (contendo DNA). Repetiu-se o procedimento, mas neste passo o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento (contendo DNA alvo) foi lavado duas vezes com etanol a 80% e seco ao ar. O DNA alvo foi eluído com Tris-HCl 10 mM e transferido para um novo tubo de PCR. Finalmente, o DNA ligado ao adaptador foi sequenciado durante 100 ciclos num sistema de sequenciação HiSeq2000 (Illumina, San Diego, EUA).

Uma representação esquemática do prepare do material ibiológico que viabilizou a criação de uma biblioteca de RNA para o sequenciamento de nova geração pode ser visualizada na Figura 30, de acordo com o manual do fabricante, <https://www.neb.com/products/e7420-nebnext-ultra-directional-rna-library-prep-kit-for-illumina>).

Figura 30. Fluxograma mostrando o preparo da biblioteca de RNA.



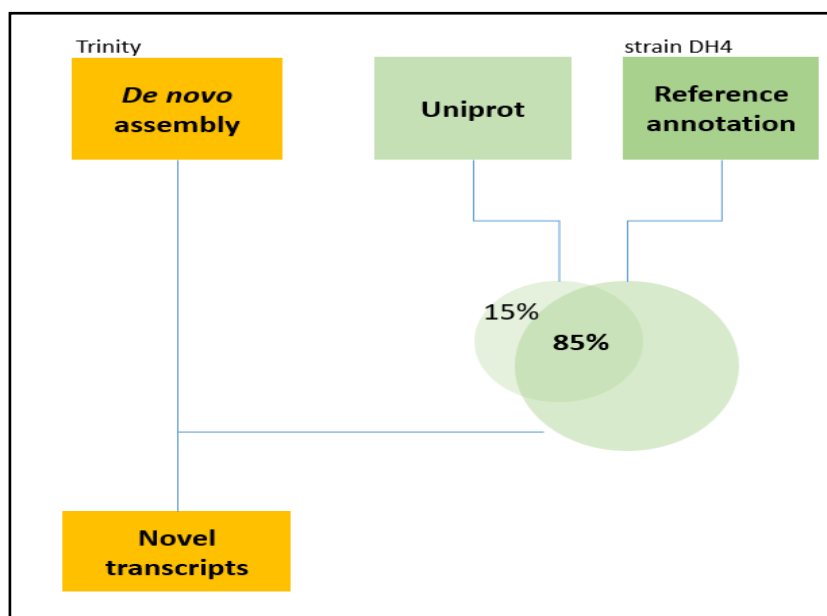
Fonte: Retirado de <https://www.neb.com/products/e7420-nebnext-ultra-directional-rna-library-prep-kit-for-illumina>, 2016.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 31 ilustra todo o fluxo de trabalho de análise incluindo a construção de uma montagem de novo com os dados transcriptômicos completos. Além disso, fizemos uso do genoma de referência de abelhas (*Apis mellifera*) para mapear dados de transcriptoma diretamente para a sequência de referência existente de *Apis mellifera*. Adicionalmente, sequências de proteínas curadas manualmente a partir de UniProt são utilizadas como referência para analisar modelos de emenda com curadoria.

A montagem de novo deve permitir a detecção de novos transcritos que não são anotados ou não existem no conjunto de proteínas de referência enquanto que as proteínas UniProt representam modelos de genes validados splices alternativos e devem permitir analisar os dados com outras evidências experimentais. Os resultados reais serão descritos nas seções a seguir. A tabela completa de identificações está disponível no Anexo V.

Figura 31. Visão geral global do projeto sobre a análise transcriptômica que abrange o estabelecimento de uma montagem de novo e inclusão de dados de transcriptoma publicados abelha obtidos de repositórios públicos (estirpe DH4: NC_001566.1, Uniprot).



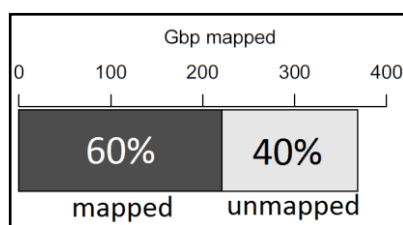
Fonte: criado pelo autor, 2016.

7.1. Reference-guided e de novo assembly approach

Tophat (TRAPNELL et al., 2011) foi utilizado para mapear 369 milhões de transcritos paired-end reads para a estirpe DH4 de *Apis mellifera* (NC_001566.1; The Honeybee Genome Sequencing Consortium). A montagem compreende dezesseis cromossomos e ~ 5k unplaced scaffolds com um comprimento cumulativo de ~ 250 Mbp no total de codificação ~ 22,5k

modelos de genes. Após a remoção do RNA ribossômico e das sequências adaptadoras do conjunto de dados transcriptômico, as leituras remanescentes obtiveram uma taxa de mapeamento de ~ 60% (Figura 32).

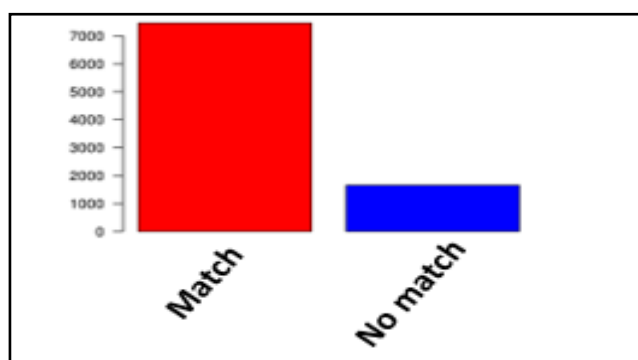
Figura 32. Proporção de RNA-seq mapeado nas sequências de referência de DH4.



Fonte: criado pelo autor, 2016.

Além disso, os dados de RNA-seq foram mapeados para 6 556 sequências de UniProt com a ajuda de Rapsearch 2,0 (YET et al., 2011) quando se requer um valor e de $\leq 10e-20$. Estas seqsequências complementaram a análise para cobrir variantes de *splice* experimentais validados. Para obter um referenciamento de mapeamento robusto para os estudos de proteômica, as sequências de UniProt redundantes para as anotações de genes oficiais foram agrupadas (CD-hit (95% de identidade) e, finalmente, as leituras foram novamente mapeadas para o restante do Uniprot com a ajuda de bwa (LI e DURBIN 2010) e combinada com a informação da anotação de genes de *Apis mellifera* (Figura 33). ~ 85% das sequências UniProt se sobrepõem com as proteínas do repositório público enquanto 15% só existem no conjunto UniProt.

Figura 33. Quantidade de proteínas onde o cluster contém um modelo de gene a partir da anotação de referência ("Match") e aqueles sem correspondência com a anotação de referência ("No match").

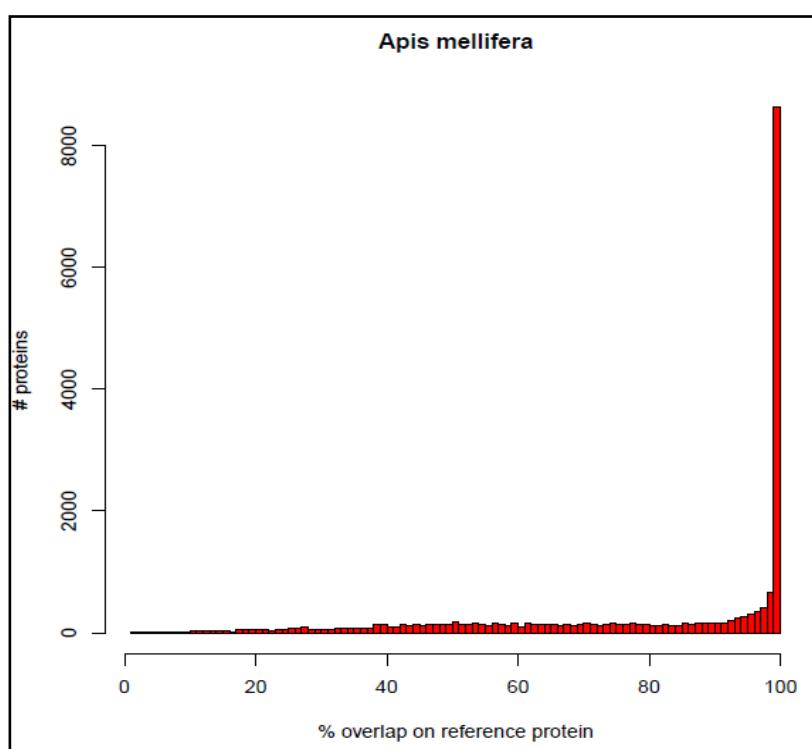


Fonte: criado pelo autor, 2016.

Além da abordagem baseada em mapeamento também foi gerada um *de novo* assembly a fim de se revelar possíveis novos transcritos.

Obteve-se 221.187 contigs após a montagem e Transdecoder (HAAS et al., 2013) previu 100.019 transcrições putativas de codificação de proteínas. Quando comparamos as proteínas às proteínas depositadas para *Apis mellifera* usando pesquisas BLAT (KENT, 2002), as correspondências foram encontradas em 19.962 (89%) das proteínas definidas com uma identidade de sequência média $\geq 95\%$ de identidade de sequência (Figura 34).

Figure 34. Comparação *de novo assembled contigs* com as proteínas de referência.



Fonte: criado pelo autor, 2016.

Até o momento, as seqüências de referência de *Apis mellifera* e as do Uniprot são usadas para analisar os conjuntos de dados proteômicos e listar genes altamente expressos, mas mais tarde os dados proteômicos serão comparados também com a *de novo assembled*. Para a maioria dos transcritos, quando comparados com a anotação de referência, há quase perfeita concordância em suas variantes de *splice*.

7. 2 Anotação funcional

Para enriquecer os transcritos com anotações funcionais, realizaram-se buscas de Interproscan (Mulder e Apweiler 2008) e identificadores de família de proteínas (PFAM), termos de ontologia de genes, domínios Interpro e atribuições de KEGG para analisar as

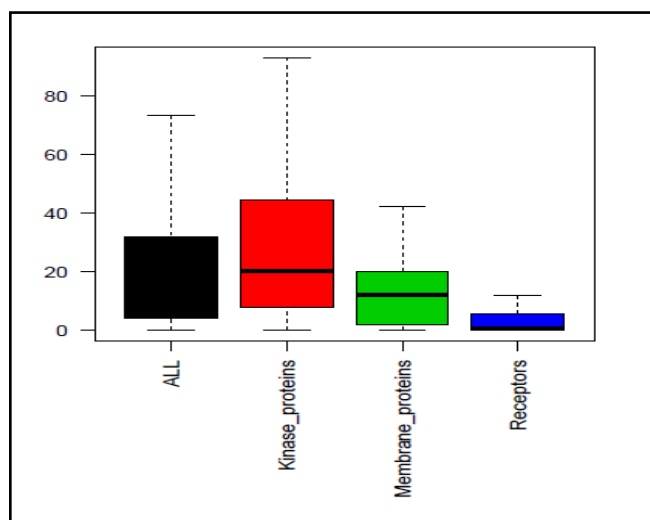
categorias funcionais. Como um de nossos principais focos é a pesquisa de proteínas de membrana, receptores e proteínas de quinase, coletamos descrições Pfam relacionadas a cada uma das três categorias e resumimos sua expressão (Figura 35). Quando buscamos as classes mais abundantes de proteínas de membrana, receptor e quinase, obtemos 53, 306 e 397 genes (Tabela 9).

Tabela 9. Visão geral dos genes que pertencem às proteínas da membrana, receptores ou proteínas quinase.

<u>Classe funcional</u>	<u>Pfam, termo Gene ontology, Interpro</u>	<u>Descrição</u>	<u>Número de genes</u>
<u>Proteínas de membrana</u>	PF10267	Tmem_cc2	10
	PF00089	Trypsin	13
	PF00595	PDZ	15
	PF00657	Lipase_GDSL	15
<u>Receptores</u>	PF07714	Pkinase_Tyr	30
	PF00104	Hormone_recep	31
	PF02931	Neur_chan_LBD	37
	PF00001	7tm_1	132
	PF02949	7tm_6	165
<u>Proteínas quinase</u>	PF00069	Pkinase	317
	PF07714	Plinase_Tyr	54
	PF08332	CaMKII_AD	26

Fonte: criado pelo autor, 2016.

Figure 35. Expressão de proteínas quinase, proteínas de membrana e receptores comparados com a expressão geral.



Fonte: criado pelo autor, 2016.

7.3 Sequências com maior grau de expressão

A Tabela 10 apresenta as sequências UniProt com a maior quantidade de leituras mapeadas. A maioria das sequências UniProt pertencem à família de proteínas da geléia real.

Tabela 10. Sequências UniProt mais expressas no conjunto de dados.

UniProt	Número de Reads	Descrição
sp O18330 MRJP1_APIME	206860933	Major royal jelly protein 1
tr A0A088A3F5 A0A088A3F5_APIME	87625132	Uncharacterized protein
tr D3Y5T0 D3Y5T0_APIME	82514106	Major royal jelly protein
sp Q17060 MRJP3_APIME	80147430	Major royal jelly protein 3
sp O77061 MRJP2_APIME	75462978	Major royal jelly protein 2
tr A0A088AU26 A0A088AU26_APIME	72787135	Uncharacterized protein
tr A0A088AU25 A0A088AU25_APIME	40638810	Uncharacterized protein
tr A0A088AU27 A0A088AU27_APIME	38235495	Uncharacterized protein
tr A0A088A3F4 A0A088A3F4_APIME	36765388	Uncharacterized protein
sp Q17061 MRJP4_APIME	21984741	Major royal jelly protein 4

Fonte: criado pelo autor, 2017.

Os dados do transcriptoma foram utilizados para criar um banco de dados proteômico, a fim de melhorar as identificações de proteínas. O procedimento utilizado para criar a base e dados para a análise proteômica (UniProt, transcriptoma e NCBI) será discutido na seção a seguir.

PARTE III
PROTEOMA DE MEMBRANA

8. MATERIAL e MÉTODOS

8.1 Ensaio de REP e REP-condicionado

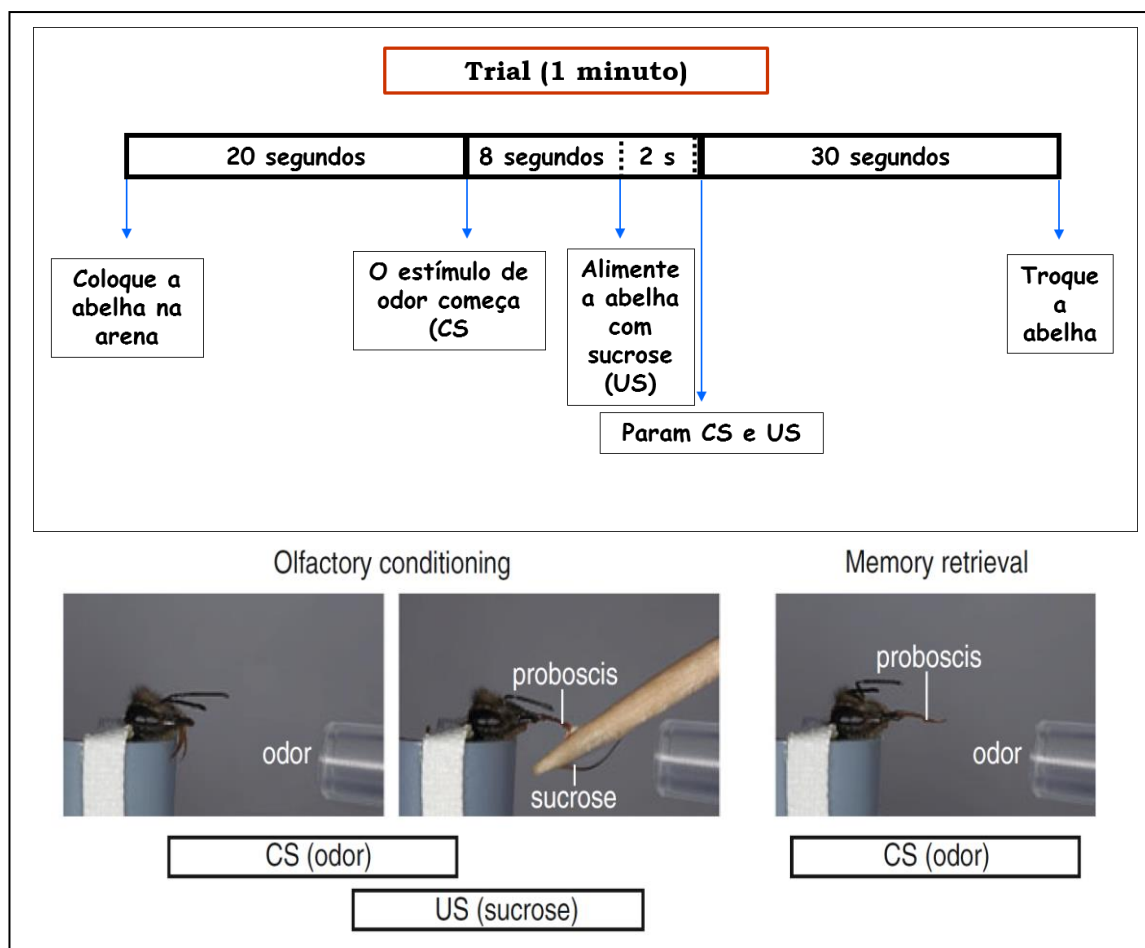
O ensaio de REP foi adaptado de Smith e Burden (2014). As abelhas (*A. mellifera*) foram mantidas no apiário do Instituto de Zootecnia da Universidade de Medicina Veterinária de Viena - Áustria. Inicialmente, as abelhas forrageiras foram coletadas na entrada da colônia, alimentadas com sacarose 1 M e mantidas durante 1 h dentro de uma incubadora Bioquímica de Demanda de Oxigênio (ELETROlab) previamente ajustada para 32 °C e 70% de umidade relativa.

O comportamento de "Reflexo de Extensão de Probóscide" (REP) foi utilizado como *input* para estudos neuroproteômicos. REP é a extensão da probóscide por um inseto como um reflexo à estimulação antenal. As abelhas foram fixas a um tubo com o auxílio de pequenos pedaços de fita a fim de restringir as abelhas sem prejudicá-las; ficam livres apenas a cabeça a antena e as peças bucais. Após estarem devidamente posicionadas, cada abelha foi individualmente alimentada com 2 uL de solução de sacarose 1M e permaneceu em B.O.D por 30 min para ambientação e redução de estresse. Após este período foi oferecido a cada indivíduo um cotonete contendo solução de sacarose para avaliação do apetite e disposição para o teste. Foram considerados aptos para o teste os indivíduos que estenderam a probóscide. Durante esta avaliação os indivíduos tiveram contato apenas com o odor da sacarose, mas não se alimentaram. Em seguida, cada abelha foi submetida ao ensaio biológico.

O grupo REP foi composto por indivíduos que responderam a estímulos com solução de sacarose (1M), mas não responderam à água em todos os trials (a solução de sacarose foi intercalada com água) e o grupo controle foi composto por indivíduos que foram submetidos às mesmas condições aplicadas ao grupo experimental, exceto por não expor os insetos ao odor de sacarose, ou seja, cada indivíduo teve como “estímulo” apenas um cotonete com água. O grupo REP-condicionado foi estabelecido aplicando-se os mesmos procedimentos prévios do grupo experimental, mas os indivíduos foram expostos à 2-octanona como estímulo condicionado (CS) e a solução de sacarose foi utilizada como estímulo não-condicionado (US). O teste foi aplicado de acordo com o esquema apresentado na Figura 36. Cada abelha foi submetida a 5 trials, com intervalo de 10 min entre cada trial. Após o último ensaio as abelhas foram mantidas em B.O.D durante 3 horas. Para avaliar a eficácia do comportamento ensaiado (memória de curto prazo), elas foram expostas apenas ao odor de 2-

ocatanona por 5 segundos. Os indivíduos que estenderam a probóscide formaram o grupo treinado.

Figura 36. Teste de reflexo de extensão de probóscide condicionado (REP-condicionado) aplicado a indivíduos forrageiros para compor o grupo REP-condicionado para estudos de aprendizagem e memória.



Fonte: criado pelo autor, 2015.

Após o teste correspondente, as abelhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas até que os cérebros pudessem ser dissecados. Todo o procedimento de dissecação foi realizado a 4 °C em cocktail de inibidor de protease.

8.2 Preparo de amostra

8.2.1 Fração total da membrana

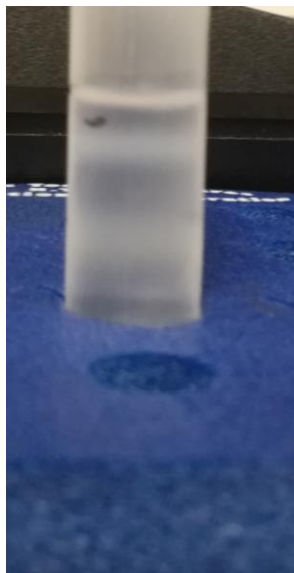
Todos os procedimentos foram realizados a 4°C (incluindo a dissecação do cérebro). Os cérebros de abelha foram lavados com 10 mM de HEPES, pH 7,5, 300 mM de sacarose, 1 mM de EDTA e cocktail de protease inibidora (tampão de homogeneização) e macerados com

o auxílio de um pestilo. A amostra foi centrifugada durante 10 min a 1000 g e o pellet foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado durante 40 min a 50000 g. O pellet foi ressuspenso em 5 mL de tampão de lavagem e incubado em gelo durante 30 min. Os homogeneizados foram centrifugados durante 40 min a 50000 g.

8.2.2 Enriquecimento de proteínas de membrana

As amostras processadas de acordo com o procedimento descrito no item 8.2.1 foram submetidas à fracionamento de membrana plasmática foram separadas por centrifugação de densidade de equilíbrio em um gradiente descontínuo de sacarose de acordo com Aradska e colaboradores (2015) (exemplo na Figura 37). O *pellet* foi ressuspenso em tampão de homogeneização para ultracentrifugação em gradiente de sacarose (HEO et al., 2010). O pellet, ressuspenso em tampão de lavagem, foi colocado sobre o gradiente de sacarose (solução de sacarose 1 M e 1,25 M) seguida por centrifugação a 100 000 g durante 2 horas a 4°C. Após centrifugação, as frações da interface de sacarose foram recolhidas e diluídas dez vezes com tampão de lavagem e subsequentemente centrifugadas durante 30 min a 100000 g. As quantidades de proteína foram estimadas pelo ensaio de proteína Pierce 660.

Figura 37. Exemplo de resultado obtido através do procedimento de ultracentrifugação com gradiente de sucrose aplicado para enriquecimento de proteínas de membrana.



Fonte: criado pelo autor, 2016.

8.3 Digestão sequencial de tripsina-quimotripsina (FASP)

Os procedimentos foram aplicados seguindo os métodos descritos por Wisniewski e Mann (2012) e Kang e colaboradores (2009).

As amostras foram solubilizadas com tampão de extração forte-caotrópico (SCEB) (uréia 7 M, tioureia 2 M, CHAPS 4%, DTT 100 mM e TEAB 50 mM). Em seguida, as amostras foram sonicadas durante 80s a 200 ciclos e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente para processo de redução de pontes dissulfeto na amostra. A amostra foi mensurada com o ensaio de proteína BCA- Pierce 660.

Os filtros VIVACON 500 foram lavados com 200 μ L de UA, centrifugados a 14 000 x g a 20 °C durante 15 min. As amostras foram carregadas e misturadas na unidade de filtração com ureia 8 M em Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) (UA) e centrifugadas a 14 000 g durante 15 min a 22 °C. Qualquer detergente remanescente será trocado por uréia com 200 μ L de UA. As proteínas foram alquiladas pela adição de 100 μ L de iodoacetamida 50 mM em UA e incubadas durante 30 minutos a 22 °C. Subsequentemente, o excesso de reagente foi removido por 3 x 100 μ L de solução UA seguida por 3 x 100 μ L de tampão TEAB 50 mM. A fim de prosseguir com a digestão, foram adicionados 40 μ L de TEAB 50 mM, pH 8,5 com tripsina (proporção de enzima para proteína 1: 100 (p / p)) às unidades de filtros, os filtros foram incubados a 37 °C *overnight*). Os péptidos tripticos foram recuperados do filtro com 40 μ L de tampão TEAB 50 mM seguido por 50 μ L de NaCl 0,5 M. O filtrado continha a fracção de proteína digerida e foram armazenados a -20 °C. O procedimento foi repetido 3 vezes (50 μ g) para cada amostra biológica para cada grupo biológico.

A digestão consecutiva utilizando FASP foi aplicada. Com base na capacidade da quimiotripsina para gerar peptídeos das regiões do domínio transmembranar (TMD), foi implementada uma digestão sequencial de quimiotripsina dos grandes péptidos digeridos por via tryptica que permaneceram no filtro para gerar péptidos das regiões de proteína hidrofóbicas.

O material semi-digerido restante no filtro FASP foi lavado com 50 μ L de tampão TEAB 50 mM e adicionalmente digerido com quimiotripsina (proporção entre enzima e proteína de 1:10 p / p). Os péptidos de quimiotripsina foram recuperados do filtro com 40 μ L de tampão TEAB 50 mM seguido de 50 μ L de NaCl 0,5 M. O filtrado continha a fracção de proteína digerida e foram armazenados a -20 °C.

As amostras digeridas tripticamente digeridas e sequencialmente tripsinadas com quimiotripsina foram acidificadas, dessalinizadas e concentradas com C₁₈ de fase reversa

(stage-tip). Os peptídeos ligados foram eluídos com um tampão contendo 90% de acetonitrila e TEAB 100 mM e liofilizados num concentrador a vácuo.

Todos os resultados obtidos para proteínas de membrana são oriundos de amostras digeridas por meio uso do método FASP, mesmo que a quimiotripsina não tenha sido aplicada no filtro após a tripsina. Em estratégias tais como a de quantificação por TMT apenas a digestão com tripsina é viável, não sendo possível a aplicação de digestão com quimiotripsina.

8.4 Fracionamento *off-line*

Os peptídeos trípticos gerados utilizando-se o método FASP foram pré-fracionados de acordo com o protocolo que foi publicado por Gilar e colaboradores (2012). As digestões de peptídeos foram reunidas, purificadas por extração em fase sólida (colunas UltraMicroSpin 3-30 µg de capacidade, Nest Group Inc., Southboro, MA, EUA) e separadas a pH 10 por cromatografia líquida de fase inversa utilizando um sistema HPLC (Agilent, série 1200). A separação foi realizada a uma taxa de fluxo de 100 µL / min numa coluna Phenomenex (150 × 2,0 mm Gemini-NX 3 µm C₁₈ 110 Å, Phenomenex) com um gradiente linear de 50 min de 5-70% (vol / vol) de acetonitrila contendo 20 mM de formato de amônio. Foram recolhidas cem frações, acidificadas e reunidas em 25 frações. Os peptídeos foram liofilizados numa centrífuga a vácuo e reconstituídos em ácido fórmico a 5% (v / v). A abundância de peptídeos por fração foi estimada com base no rastro UV e as amostras foram diluídas em conformidade para evitar a sobrecarga do sistema nano-LCMS.

8.5 LC-MS / MS

As frações ou amostras digeridas (*shotgun*) foram acidificadas utilizando-se ácido fórmico 5% e foram analisadas por LC-MS / MS com duas repetições técnicas por amostra. As foram separadas utilizando um sistema nano-LC Dionex Ultimate 3000 com coluna de armadilha PM100-C₁₈ (3 m, 75 m × 20 mm, ThermoFisher Scientific, Áustria) e uma coluna analítica PepMap-C₁₈ (2 m, 75 mx 500 mm, ThermoFisher Scientific, Áustria). Injetaram-se dez microlitros de amostras e concentrou-se na coluna de armadilha durante 5 min utilizando ácido fórmico (FA) a 0,1% em água como solvente isocrático a um fluxo de 5 L / min. Os peptídeos foram então separados na coluna analítica utilizando o seguinte gradiente de solvente A (FA a 0,1% em água) e solvente B (acetonitrila / água 80/20 v / v) [0-7 min 5% B; 7-65 min 10-37,5% B; 65-70 min 37,5-50% B; 70-75 min 90% B; 75-90 min 5% B] para as frações de peptídeos trípticos. Já para as frações da digestão sequencial tripsina-quimiotripsina utilizou-se e o gradiente [0-7 min 5% B; 7-245 min 8-40% B; 245-250 min 40-90% B; 250-

255 min 90% B; 255-270 min 5% B]. A análise de MS foi realizada pelo espectrômetro de massa Thermo Q-Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Áustria) em modo positivo com EM de varredura total na gama de m/z 380-1800 com resolução de 70.000 (a m/z 200). As varreduras de MS/MS foram adquiridas na resolução de 17.500 (a m/z 200) através da fragmentação de HCD dos 20 íons mais intensos utilizando-se 27% de energia de colisão normalizada com uma massa fixa de 100 m/z . A exclusão dinâmica foi ativada por 60 s e para não atribuídas, cargas +1 e + 7.

8.6 Análise de Dados

Os dados de MS foram contratados com o banco de dados criado especificamente para este projeto (UniProtKB e NCBI (Refseq) para a taxa de *Apis mellifera* e os dados de gerados pela análise do transcriptoma do cérebro de *Apis mellifera*). Este banco de dados foi criado em 2 de fevereiro de 2017. As buscas foram feitas usando o *software* Proteome Discoverer 2.1 (ThermoFisher, Viena, Áustria) e o MASCOT 2.4 (MatrixScience, Londres, Reino Unido). Os critérios de busca foram os seguintes: enzima: tripsina ou trypchymo com um máximo de dois locais de clivagem perdidos; modificação fixa: carbamidometilação (C); modificação variável: oxidação da metionina (M); modo de busca de íons MS/MS com pesquisa de base de dados de chamariz incluída; tolerância de massa peptídica ± 10 ppm; tolerância de massa para MS/MS: $\pm 0,02$ Da e FDR 1%. Apenas as proteínas identificadas por pelo menos dois peptídeos distintos e um peptídeo único foram consideradas para o conjunto final de dados.

O banco de dados foi gerado seguindo estas etapas:

Geração de arquivo .fasta

1. As sequências do arquivo .fasta bee_transcript_20170201 foram agrupadas com 100% de identidade de sequência utilizando CD HIT. CD HIT clusters proteínas que atendem a um limiar de similaridade, geralmente uma identidade de sequência. Cada cluster tem uma sequência representativa. A entrada é um conjunto de dados de proteína em formato. fasta. Ele gera um arquivo fasta de sequências representativas e um arquivo de texto de lista de clusters.
2. CD-HIT-2D foi utilizado para comparar 2 bancos de dados de proteínas (db1, bee_tr_iso_v16_20170201.fasta) e db2, bee_transcript_20170201_NR.fasta). Identifica as sequências em db2 que são semelhantes ao db1 a 100% de limiar.
3. Os espectros de MS foram comparados contra bee_tr_iso_v16_20170201.fasta + bee_transcript_20170201_novel.fasta + contaminants.fasta

Descrições Funcionais das Proteínas

1. As seqüências foram obtidas em <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000005203>
2. 14.183 de 15.325 seqüências não foram caracterizadas em UniProt.
3. NCBI *Apis mellifera* seqüências foram mapeadas para bee_tr_iso_v16_20170201.fasta. Foram utilizadas descrições de proteínas para seqüências semelhantes em NCBI para descrever 8.469 proteínas não caracterizadas em UniProt.
4. Restaram 2.116 proteínas não caracterizadas que foram analisadas contra uma base de dados de insetos (não-redundante) utilizando Blast2Go.
5. Das 14.183 seqüências não caracterizadas, 3.598 seqüências ainda não foram caracterizadas.
6. O arquivo Fasta das seqüências de bee_tr_iso_v16_20170201.fasta com descrições de proteínas não caracterizadas foram substituídos pelas descrições de proteínas NCBI e Blast2Go utilizando http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/header_replacer.php#. Novo arquivo FASTA foi gerado.

8.7 Anotações funcionais

O mapeamento de anotações de Ontologia de Genes Funcionais (GO) foi primeiramente realizado usando a aplicação InterPro e Protein Center (Proxeon, Thermo Fisher Scientific). Entretanto, visando um maior esclarecimento dos processos biológicos em questão, outros algoritmos foram utilizados a fim de se obter maiores informações funcionais.

A plataforma DAVID foi utilizada para categorizar as proteínas identificadas por componente celular, função molecular, processo biológico e via canônica utilizando-se a ferramenta de Anotação Funcional (disponível em <https://david.ncifcrf.gov>).

O algoritmo Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>) (GOTZ et al., 2011) foi utilizado para relatar a categorização do processo biológico das proteínas identificadas de acordo com Gene Ontology, que contém ontologias e um subconjunto dos termos encontrados em todo o GO (<http://www.geneontology.org>) (Gene ontology Consortium, 2015). As categorias para cada classificação não são exclusivas (i.e., verificou-se que um número de candidatos estava localizado em mais do que um compartimento celular). As proteínas foram classificadas em categorias funcionais usando Blast2GO, e a representação de ontologias de genes estatisticamente enriquecidas foi realizada com a ferramenta GO enrichment dentro do próprio Blast2GO.

As proteínas diferencialmente expressas em cada um dos grupos foram também submetidas à ferramenta BlastKOALA disponível nas ferramentas analíticas do KEGG (KANEHISA et al., 2016) (<http://www.kegg.jp/kegg/>). A ferramenta permite que as proteínas

recebam uma ortologia e uma anotação obtida a partir de BLAST com um banco de dados gerado pelo KEGG Genes, neste caso `genus_eukaryotes`. Os resultados são categorizados (por exemplo: metabolismo energético, transcrição, sistema nervoso e etc) e podem ser plotados em rotas metabólicas, viabilizando a análise funcional das proteínas identificadas nos mais variados processos biológicos.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Criação de perfil de proteoma e estabelecimento de estratégias

O objetivo principal do projeto foi otimizar um método padrão para estudar proteínas de membrana / receptores nervosos no cérebro de abelhas. O primeiro passo foi decidir entre usar toda a cabeça ou dissecar o cérebro. Dissecar o cérebro é uma tarefa demorada e difícil. Começamos tentando isolar as proteínas utilizando toda a cabeça. Para isso, as abelhas *naive* (NB - indivíduos forrageiros coletados diretamente da colméia) tiveram as cabeças separadas do corpo e foram maceradas em nitrogênio líquido com a ajuda de um almofariz e pestilo. A amostra foi submetida a fração total de membrana (item 8.2.1) e enriquecimento de membrana (item 8.2.2), digerida e submetida a análise shotgun em Orbitrap. A partir desta primeira análise, decidiu-se dissecar o cérebro porque proteínas da cutícula e olhos estavam presentes em alta concentração e mesmo após o procedimento de enriquecimento de membrana estavam suprimindo as proteínas de membrana e receptores.

Em um segundo momento, a estratégia em que se utilizou o cérebro dissecado e em que foi aplicado o gradiente de sacarose ao enriquecimento de proteínas de membrana nos permitiu concluir que embora o método tenha sido extremamente eficiente e elucidativo, exigiu um grande número de cérebros (quantidade de amostra e tempo), tornando a aplicação do método impraticável para o projeto em questão (comparação de três grupos de amostras diferentes). No entanto, o número de proteínas / receptores de membrana identificados foi muito bom, demonstrando que, analisando o cérebro de abelhas, pode ser estudado um elevado número de proteínas / receptores de membrana.

Os resultados para a segunda análise foram satisfatórios, mostrando que a fração total da membrana é suficiente para identificar as proteínas da membrana e obter um perfil dos receptores no cérebro da abelha. O fracionamento *off-line* aplicado antes do LC-MS/MS também provou ser uma boa maneira de melhorar o número de proteínas identificadas.

Depois de otimizar a estratégia de preparação da amostra para analisar proteínas de membrana, os três grupos foram comparados utilizando a quantificação por TMT. O método foi previamente estabelecido e otimizado pela equipe do Prof. Dr. Lubec e foi aplicado com sucesso em estudos sobre cérebros de abelhas.

Considerando o número de proteínas identificadas para cada análise e as anotações disponíveis no GO, os resultados podem ser comparados na Tabela 11.

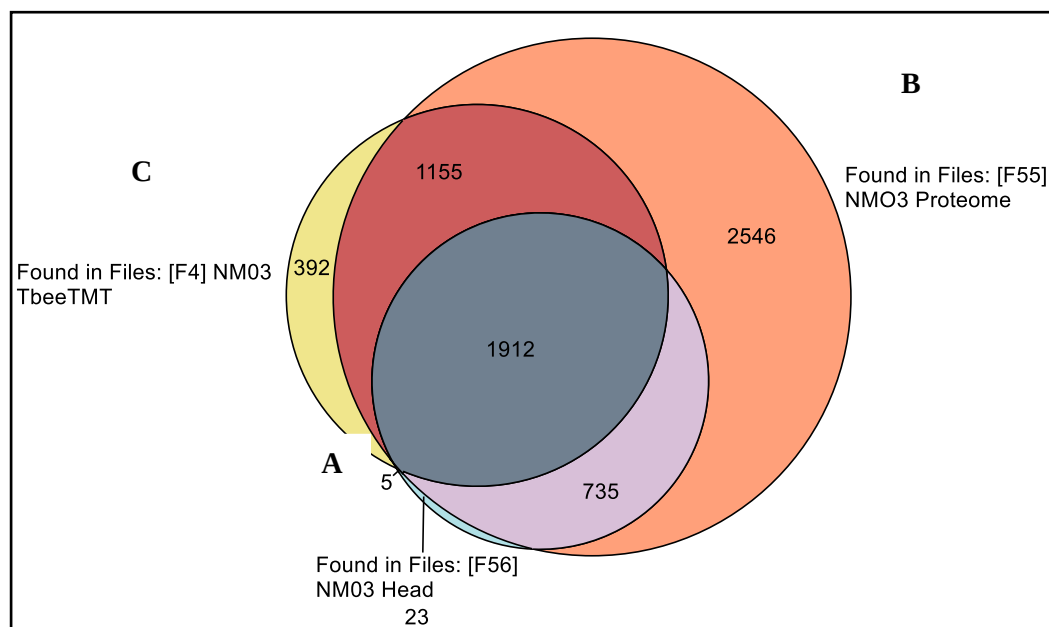
Tabela 11. Comparação entre as diferentes análises aplicadas ao estudo do cérebro das abelhas: número de proteínas identificadas; número de proteínas de membrana identificadas; número de proteínas com atividade de receptor; número de proteínas com função de neurobiologia (sinapse, transporte de neurotransmissores e neurogênese). A contagem foi feita com base nos termos GO.

	Número de proteínas identificadas	Número de proteínas de membrana	Número de proteínas descritas receptor	Número de proteínas com função neurobiológica
Cabeça inteira	2791	815	23	22
Cérebro dissecado	6374	1547	82	58
Análise de TMT	3589	658	34	35
Overall	6882	1582	82	62

Fonte: criado pelo autor, 2017.

Uma visão geral dos resultados da análise 3 e do número de proteínas comuns identificadas em cada um deles é mostrada na Figura 38.

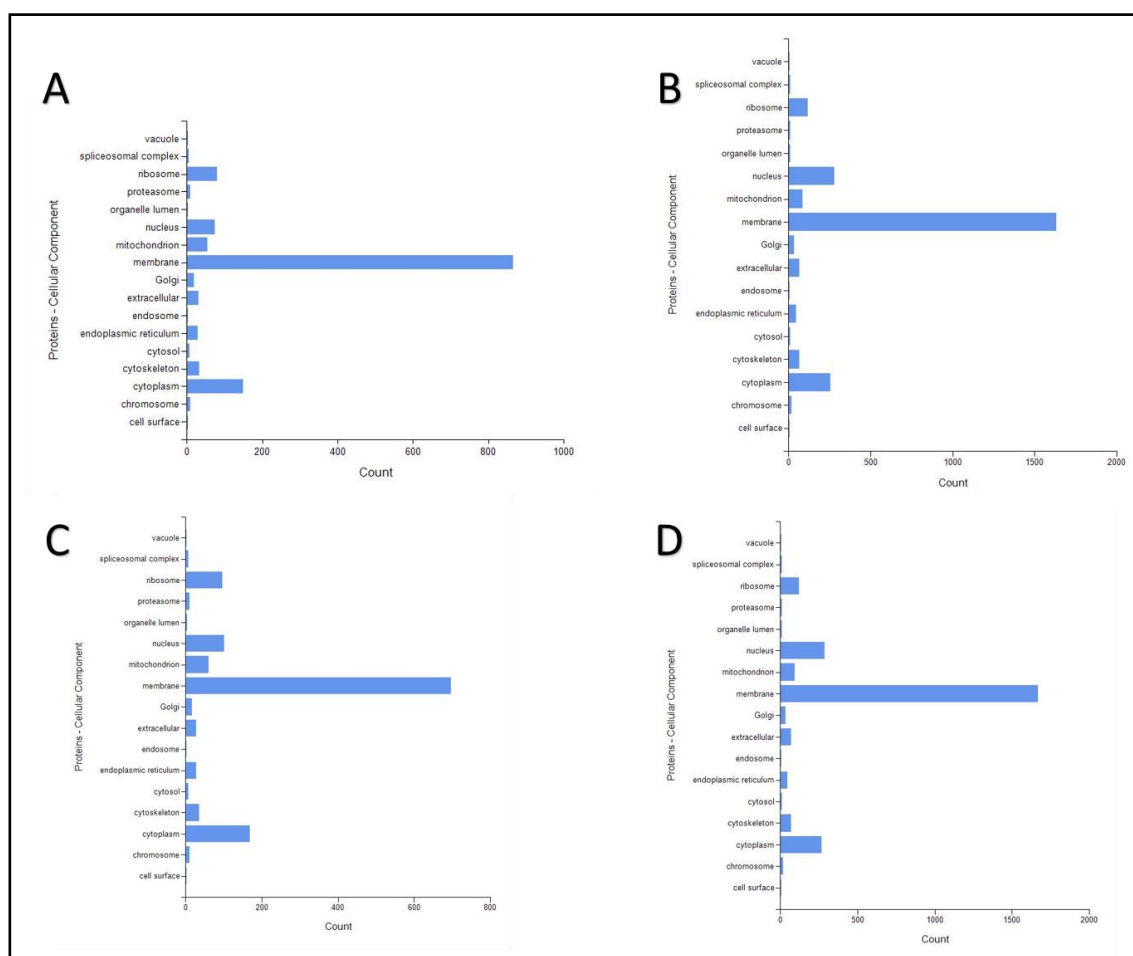
Figura 38. Número de proteínas identificadas em cada análise. **A.** Cabeça inteira submetida à fração total de membrana e ao enriquecimento de membrana, seguida pela estratégia *shotgun*; **B.** Cérebro dissecado submetido à fração total de membrana, fracionamento *off-line* e LC-MS/MS e **C.** Cérebro dissecado submetido à fração total de membrana, quantificação por TMT, fracionamento *off-line* e LC-MS/MS.



Fonte: criado pelo autor, 2017.

Uma vez que o objetivo principal era identificar as proteínas de membrana, na Figura 39 é mostrado, de acordo com o componente GO celular, o número de proteínas identificadas em cada análise quando se compara o componente celular de membrana com os outros componentes celulares. Ficou nítido que os procedimentos realizados para o enriquecimento das proteínas de membrana foram aplicados com sucesso.

Figura 39. Proteínas de membrana identificadas em: **A.** cabeça inteira (815); **B.** Cérebro dissecado (1547); **C.** TMT (658) e **D.** Total (1582).



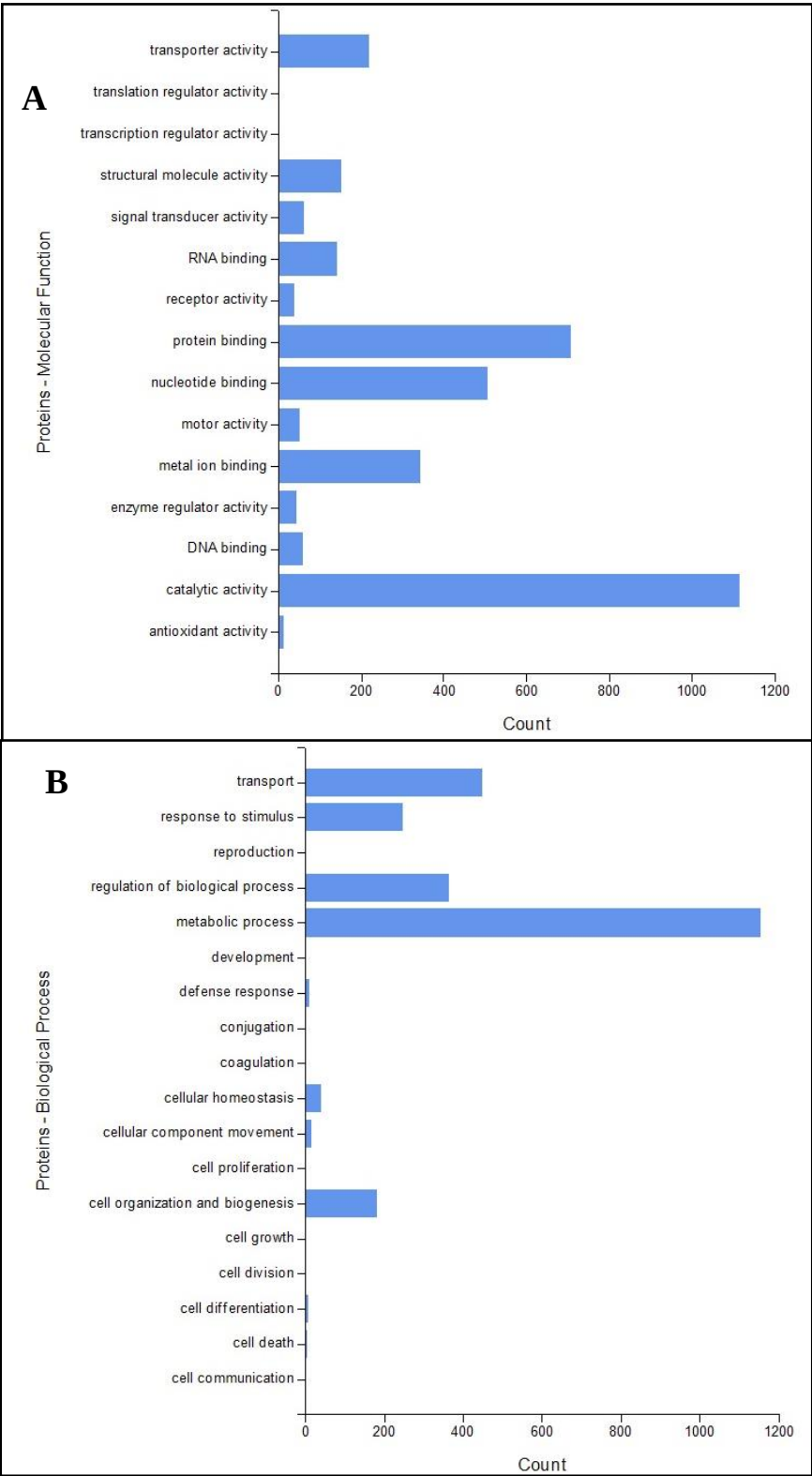
Fonte: criado pelo autor, 2017.

9.2 Análise de quantificação

No que se refere à análise de quantificação, os três grupos: (i) grupo controle, (ii) grupo REP e (iii) grupo REP-condicionado foram comparados utilizando o método padronizado para o preparo de amostras (cérebros dissecados submetidos à fração total da membrana, digestão FASP, pré-fracionamento em LC e LC-MS/MS) e a marcação isotópica com reagente TMT.

Conforme mencionado acima, 3589 proteínas foram identificadas (diferencialmente expressas), de acordo com GO e Protein Center (Proxeon, Thermo Fisher Scientific), as proteínas foram categorizadas para o Processo Biológico e a Função Molecular (Figura 40). A tabela completa de identificações está disponível no Anexo VI.

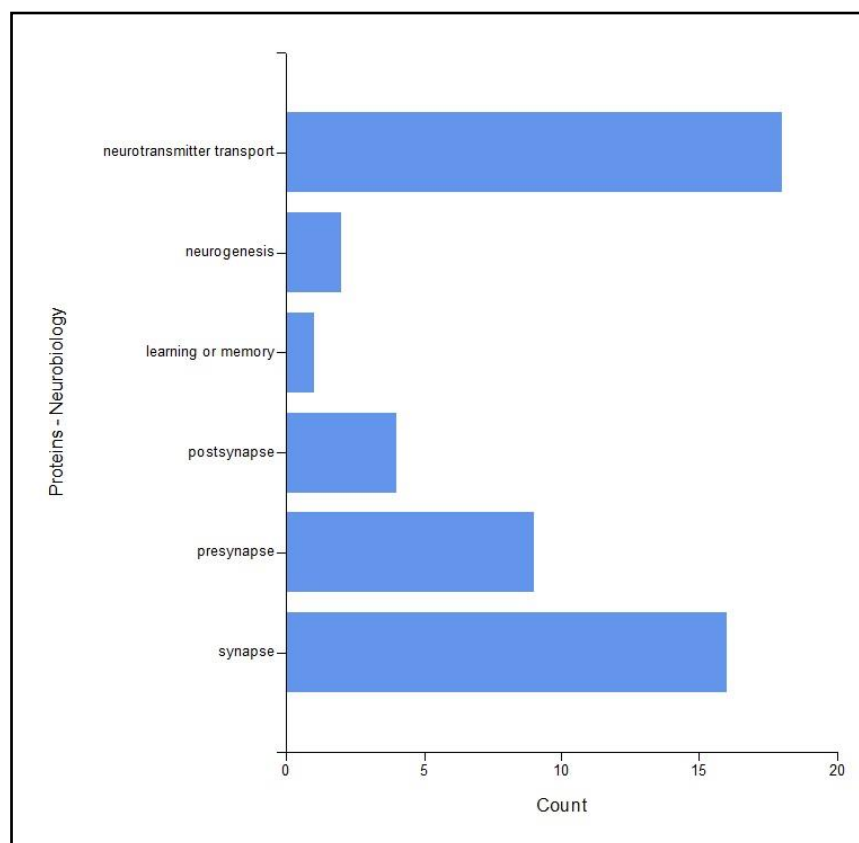
Figura 40. Anotação de GO para a análise quantitativa. **A.** Processo Biológico e **B.** Função Molecular.



Fonte: criado pelo autor, 2017.

Já foram descritas 658 proteínas de localização membranar (Figura 39); dentre elas 34 já foram descritas como receptor e 35 foram descritas como componente de neurobiologia de *A. mellifera* (GO anotações) (Figura 41).

Figura 41. Anotação de GO para o processo de neurobiologia.



Fonte: criado pelo autor, 2017.

Embora *Apis mellifera* tenha o genoma sequenciado, a maioria das proteínas depositadas em UniProtKb e / ou NCBI (RefSeq) não foram caracterizadas, nem anotadas. Conforme mencionado no item 8.5, 14.183 de 15.325 sequências não são caracterizadas no UniProt. Isso torna a interpretação dos dados um grande desafio; para resolvê-lo, foi desenvolvido durante este projeto toda uma nova base de dados para análise de dados. Além disso, o novo banco de dados foi submetido ao software Blast2GO para otimizar / aumentar as anotações. Neste momento, a maioria das proteínas não tem uma anotação descrita disponível na literatura.

9.2.1 Análises funcionais das proteínas diferencialmente expressas

9.2.1.1 David - Functional Annotation Tool

A base de dados DAVID integra quase todos os principais e conhecidos recursos públicos de bioinformática centralizados pelo DAVID *Gene Concept*, um método de ligação única para reunnir dezenas de milhões de diversos identificadores de genes / proteínas e termos de anotação de uma variedade de bancos de dados públicos de bioinformática. Para qualquer lista de genes carregados, o DAVID *Resources* fornece não apenas a análise de enriquecimento genético típica, mas também novas ferramentas e funções que permitem aos usuários condensar grandes listas de genes em grupos funcionais de genes, clusters redundantes e heterogêneos, dentre outras ferramentas. De acordo com os cinco níveis de GO no banco de dados de David, as proteínas expressadas diferencialmente foram analisadas.

Grupo REP-condicionado vs grupo REP

Foram identificadas 2080 proteínas com valores positivos de *Fold Change* (up-regulated) e 1190 proteínas com valores negativos de *Fold Change* (down-regulated). Após a submissão na ferramenta de anotação funcional do David:

O grupo up-regulated: 1647 David IDs, distribuídos em 107 clusters e 380 entradas não foram agrupadas. Os três primeiros clusters (os mais representativos) são mostrados na Figura 42. O cluster onde encontramos o maior número de anotações diretamente relacionadas às funções do sistema nervoso (Cluster 73) é apresentado na Figura 43 e uma visão 2D deste cluster é mostrada na Figura 44.

Figura 42. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 6.52			Count	P_Value	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Membrane	RT		473	2.3E-10	4.8E-8
☐	UP_KEYWORDS	Transmembrane	RT		453	3.1E-8	2.1E-6
☐	UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	RT		452	3.5E-8	1.8E-6
☐	GOTERM_CC_DIRECT	integral component of membrane	RT		449	3.5E-2	4.2E-1
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 5.92			Count	P_Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	ATP hydrolysis coupled proton transport	RT		16	5.9E-9	2.0E-6
☐	GOTERM_MF_DIRECT	hydrogen ion transmembrane transporter activity	RT		13	1.0E-7	4.1E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	proton-transporting V-type ATPase, V0 domain	RT		6	2.9E-3	9.4E-2
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 5.67			Count	P_Value	Benjamini
☐	INTERPRO	Small GTP-binding protein domain	RT		36	1.2E-7	2.5E-4
☐	GOTERM_MF_DIRECT	GTP binding	RT		57	1.8E-7	3.6E-5
☐	INTERPRO	Small GTPase superfamily	RT		30	9.6E-7	1.0E-3
☐	GOTERM_BP_DIRECT	small GTPase mediated signal transduction	RT		40	4.7E-6	3.9E-4
☐	GOTERM_CC_DIRECT	intracellular	RT		75	4.8E-4	6.4E-2

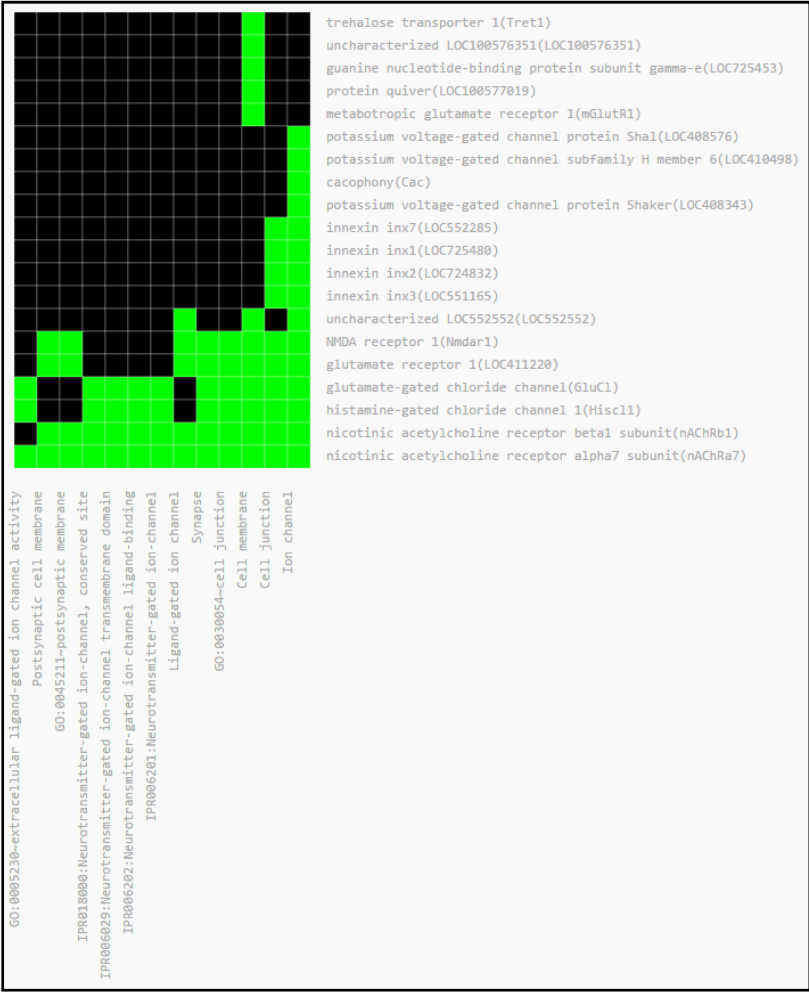
Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

Figura 43. Agrupamento de anotações funcionais para o Cluster 73 que foram consideradas up-regulated no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo de REP. Várias importantes anotações neurobiológicas são representadas no cluster.

Annotation Cluster 73		Enrichment Score: 0.28				Count	P_Value	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Cell junction	RT			10	1.1E-1	5.7E-1
☐	UP_KEYWORDS	Cell membrane	RT			12	2.5E-1	7.5E-1
☐	UP_KEYWORDS	Ion channel	RT			15	2.7E-1	7.6E-1
☐	UP_KEYWORDS	Synapse	RT			6	5.1E-1	9.2E-1
☐	UP_KEYWORDS	Ligand-gated ion channel	RT			5	5.6E-1	9.4E-1
☐	UP_KEYWORDS	Postsynaptic cell membrane	RT			4	6.3E-1	9.7E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cell junction	RT			6	6.6E-1	1.0E0
☐	GOTERM_CC_DIRECT	postsynaptic membrane	RT			4	7.4E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel, conserved site	RT			4	7.7E-1	1.0E0
☐	GOTERM_MF_DIRECT	extracellular ligand-gated ion channel activity	RT			3	7.7E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel transmembrane domain	RT			4	8.3E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel	RT			4	8.5E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel ligand-binding	RT			4	8.5E-1	1.0E0

Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

Figura 44. Uma visão 2D das evidências dos treze termos / categoria dos membros presentes no Cluster 73. Verde - associação correspondente do gene-termo relatada positivamente; Preto - associação correspondente do gene-termo não relatada ainda.



Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

O grupo *down-regulated* tinha 1190 Ids em David, distribuídas em 65 clusters e 227 entradas não foram agrupadas. Os três primeiros clusters (os mais representativos) são mostrados na Figura 45. Nenhum dos clusters apresentou um enriquecimento de anotações diretamente ligadas às principais funções do sistema nervoso.

Figura 45. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *down-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 24.71		Count	P_Value	Fold Change	Benjamini
☐	GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	RT	66	1.8E-30	4.4E0	5.0E-28
☐	UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	RT	39	4.4E-27	6.9E0	7.6E-25
☐	UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	RT	35	2.5E-26	7.5E0	2.2E-24
☐	GOTERM_CC_DIRECT	ribosome	RT	52	2.2E-24	4.5E0	2.3E-22
☐	GOTERM_BP_DIRECT	translation	RT	64	1.2E-23	3.5E0	2.9E-21
☐	KEGG_PATHWAY	Ribosome	RT	67	1.0E-20	3.0E0	1.0E-18
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 7.94		Count	P_Value	Fold Change	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	RT	29	9.6E-16	5.5E0	4.3E-14
☐	UP_KEYWORDS	Initiation factor	RT	14	3.6E-9	6.6E0	1.0E-7
☐	GOTERM_MF_DIRECT	translation initiation factor activity	RT	16	4.9E-8	4.8E0	4.7E-6
☐	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic translation initiation factor 3 complex	RT	11	1.2E-7	6.6E0	4.3E-6
☐	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic 48S preinitiation complex	RT	11	1.2E-7	6.6E0	4.3E-6
☐	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic 43S preinitiation complex	RT	11	1.2E-7	6.6E0	4.3E-6
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of translational initiation	RT	11	9.8E-7	5.3E0	1.2E-4
☐	GOTERM_BP_DIRECT	formation of translation preinitiation complex	RT	11	9.8E-7	5.3E0	1.2E-4
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 4.54		Count	P_Value	Fold Change	Benjamini
☐	KEGG_PATHWAY	Proteasome	RT	27	1.9E-12	4.0E0	9.6E-11
☐	INTERPRO	Proteasome, subunit alpha/beta	RT	12	1.1E-8	7.0E0	1.9E-5
☐	GOTERM_MF_DIRECT	threonine-type endopeptidase activity	RT	12	2.2E-8	6.6E0	3.1E-6
☐	UP_KEYWORDS	Proteasome	RT	8	8.7E-6	7.6E0	1.5E-4
☐	UP_KEYWORDS	Threonine protease	RT	8	8.7E-6	7.6E0	1.5E-4
☐	SMART	SM00948	RT	6	1.4E-4	8.2E0	1.9E-2
☐	INTERPRO	Proteasome, alpha-subunit, N-terminal domain	RT	6	2.0E-4	7.6E0	4.1E-2
☐	INTERPRO	Proteasome A-type subunit	RT	6	2.0E-4	7.6E0	4.1E-2
☐	GOTERM_CC_DIRECT	proteasome core complex	RT	6	2.7E-4	7.2E0	5.6E-3
☐	GOTERM_CC_DIRECT	proteasome core complex, alpha-subunit complex	RT	6	2.7E-4	7.2E0	5.6E-3
☐	UP_KEYWORDS	Protease	RT	21	2.9E-4	2.4E0	3.5E-3
☐	GOTERM_BP_DIRECT	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	RT	6	7.6E-4	5.8E0	3.0E-2
☐	INTERPRO	Proteasome B-type subunit	RT	5	3.5E-3	6.4E0	2.5E-1
☐	INTERPRO	Proteasome, beta-type subunit, conserved site	RT	4	1.8E-2	6.1E0	6.1E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	ubiquitin-dependent protein catabolic process	RT	12	4.1E-2	1.9E0	5.8E-1

Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

- Grupo REP vs grupo controle

Dentre as proteínas identificadas, 1895 apresentaram valores positivos de *Fold Change* (*up-regulated*) e 1190 proteínas com valores negativos de *Fold Change* (*down-regulated*). Após a submissão na ferramenta de anotação funcional do David:

O grupo *up-regulated*: tinha 1546 IDs em David, distribuídos em 91 clusters e 380 entradas não foram agrupadas. Os três primeiros agrupamentos (os mais representativos) são mostrados na Figura 46. O cluster onde encontramos o maior número de anotações diretamente relacionadas às funções do sistema nervoso (Cluster 74) é apresentado na Figura 47 e uma visão 2D deste cluster é mostrada na Figura 48.

Figura 46. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 5.76		Count	P_Value	Benjamini
☐	GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	RT	50	2.2E-9	8.9E-7
☐	GOTERM_BP_DIRECT	translation	RT	48	1.3E-6	2.2E-4
☐	GOTERM_CC_DIRECT	ribosome	RT	37	3.3E-6	4.3E-4
☐	UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	RT	21	4.8E-6	2.1E-4
☐	KEGG_PATHWAY	Ribosome	RT	52	1.6E-5	1.9E-3
☐	UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	RT	22	3.8E-5	1.4E-3
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 5.29		Count	P_Value	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	RT	29	7.2E-11	8.0E-9
☐	GOTERM_MF_DIRECT	translation initiation factor activity	RT	18	1.7E-7	3.3E-5
☐	UP_KEYWORDS	Initiation factor	RT	14	8.1E-7	6.0E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic 43S preinitiation complex	RT	10	9.5E-5	4.2E-3
☐	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic 48S preinitiation complex	RT	10	9.5E-5	4.2E-3
☐	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic translation initiation factor 3 complex	RT	10	9.5E-5	4.2E-3
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of translational initiation	RT	10	2.4E-4	1.9E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	formation of translation preinitiation complex	RT	10	2.4E-4	1.9E-2
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 3.91		Count	P_Value	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	RT	108	1.2E-6	6.7E-5
☐	UP_KEYWORDS	ATP-binding	RT	81	7.4E-5	2.3E-3
☐	GOTERM_MF_DIRECT	ATP binding	RT	127	2.0E-2	7.5E-1

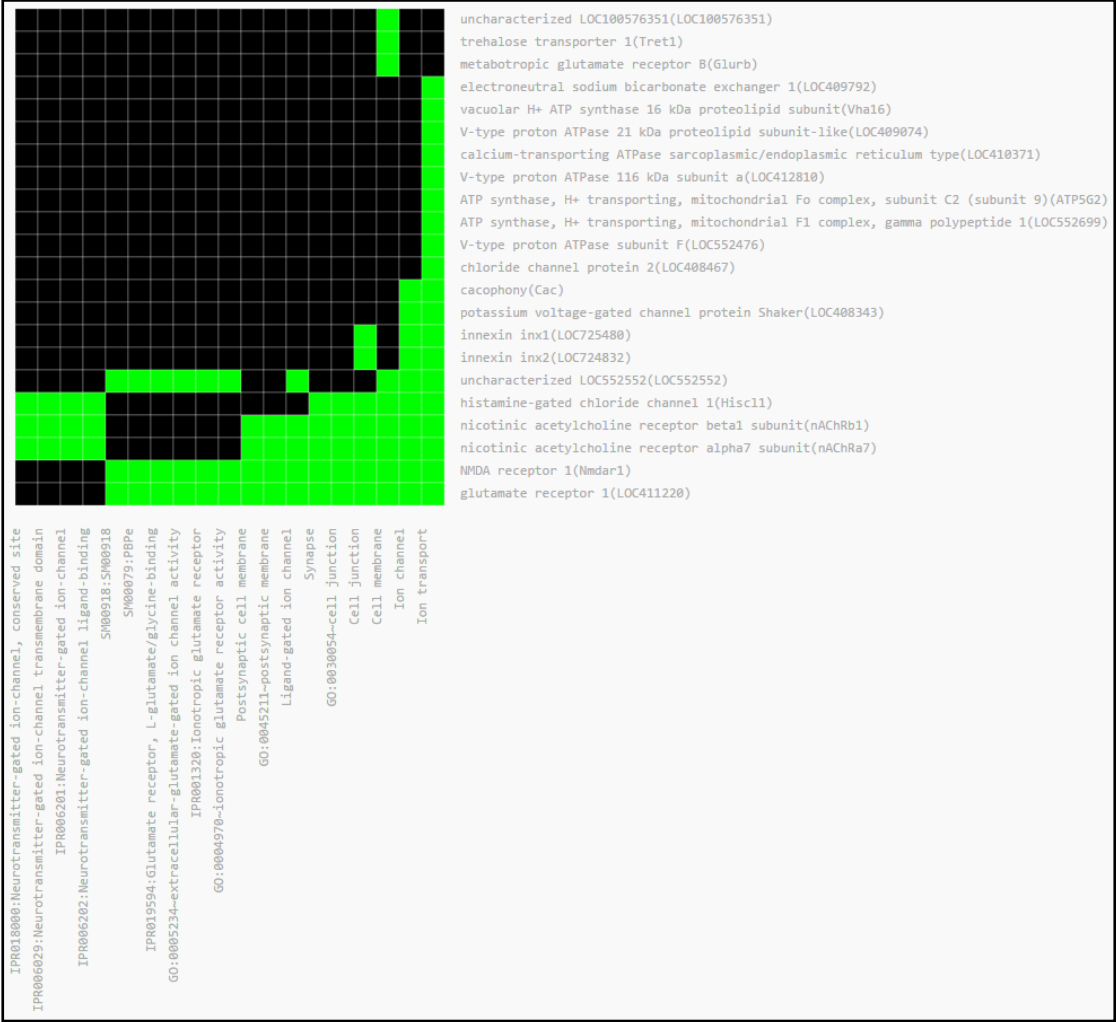
Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

Figura 47. Agrupamento de anotações funcionais para o Cluster 74 que foram consideradas *up-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle. Várias importantes anotações neurobiológicas são representadas no cluster.

Annotation Cluster 74		Enrichment Score: 0.16			Count	P_Value	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Ion transport	RT		19	2.8E-1	8.4E-1
☐	UP_KEYWORDS	Cell junction	RT		7	4.7E-1	9.3E-1
☐	SMART	SM00918	RT		3	5.1E-1	1.0E0
☐	UP_KEYWORDS	Ligand-gated ion channel	RT		5	5.1E-1	9.4E-1
☐	UP_KEYWORDS	Postsynaptic cell membrane	RT		4	5.8E-1	9.6E-1
☐	UP_KEYWORDS	Cell membrane	RT		9	5.9E-1	9.6E-1
☐	SMART	PBPe	RT		3	6.2E-1	1.0E0
☐	UP_KEYWORDS	Synapse	RT		5	6.6E-1	9.7E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	postsynaptic membrane	RT		4	6.9E-1	1.0E0
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cell junction	RT		5	7.8E-1	1.0E0
☐	UP_KEYWORDS	Ion channel	RT		10	7.9E-1	9.9E-1
☐	INTERPRO	Glutamate receptor, L-glutamate/glycine-binding	RT		3	8.0E-1	1.0E0
☐	GOTERM_MF_DIRECT	extracellular-glutamate-gated ion channel activity	RT		3	8.2E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Ionotropic glutamate receptor	RT		3	8.8E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel, conserved site	RT		3	9.0E-1	1.0E0
☐	GOTERM_MF_DIRECT	ionotropic glutamate receptor activity	RT		3	9.1E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel transmembrane domain	RT		3	9.3E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel	RT		3	9.4E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	Neurotransmitter-gated ion-channel ligand-binding	RT		3	9.4E-1	1.0E0

Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

Figura 48. Uma visão 2D das evidências dos dezenove termos / categoria dos membros presentes no Cluster 74. Verde - associação correspondente do gene-termo relatada positivamente; Preto - associação correspondente do gene-termo não relatada ainda.



Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

O grupo *down-regulated*: 1109 IDs em David, distribuídos em 72 clusters e 277 entradas não foram agrupadas. Os três primeiros clusters (os mais representativos) são mostrados na Figura 49. O cluster onde encontramos o maior número de anotações diretamente relacionadas às funções do sistema nervoso (Cluster 69) é apresentado na Figura 50 e uma visão 2D deste cluster é mostrada na Figura 51.

Figura 49. Agrupamento de anotação funcional para os três primeiros clusters que foram considerados *down-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 4.33		Count	P_Value	Benjamini
☐	GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	RT	37	7.4E-7	2.4E-4
☐	UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	RT	20	3.8E-6	7.3E-4
☐	GOTERM_BP_DIRECT	translation	RT	37	3.6E-5	9.7E-3
☐	GOTERM_CC_DIRECT	ribosome	RT	28	7.7E-5	9.8E-3
☐	UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	RT	16	8.4E-5	4.0E-3
☐	KEGG_PATHWAY	Ribosome	RT	33	1.6E-2	2.1E-1
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 3.32		Count	P_Value	Benjamini
☐	UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	RT	82	4.9E-6	4.7E-4
☐	UP_KEYWORDS	ATP-binding	RT	58	1.2E-3	2.9E-2
☐	GOTERM_MF_DIRECT	ATP binding	RT	96	1.9E-2	4.9E-1
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 3.12		Count	P_Value	Benjamini
☐	SMART	EFh	RT	16	1.1E-4	3.1E-2
☐	INTERPRO	EF-Hand 1, calcium-binding site	RT	20	2.3E-4	3.3E-1
☐	INTERPRO	EF-hand domain	RT	21	5.4E-4	2.7E-1
☐	GOTERM_MF_DIRECT	calcium ion binding	RT	30	2.7E-3	2.0E-1
☐	INTERPRO	EF-hand-like domain	RT	21	6.9E-3	6.3E-1

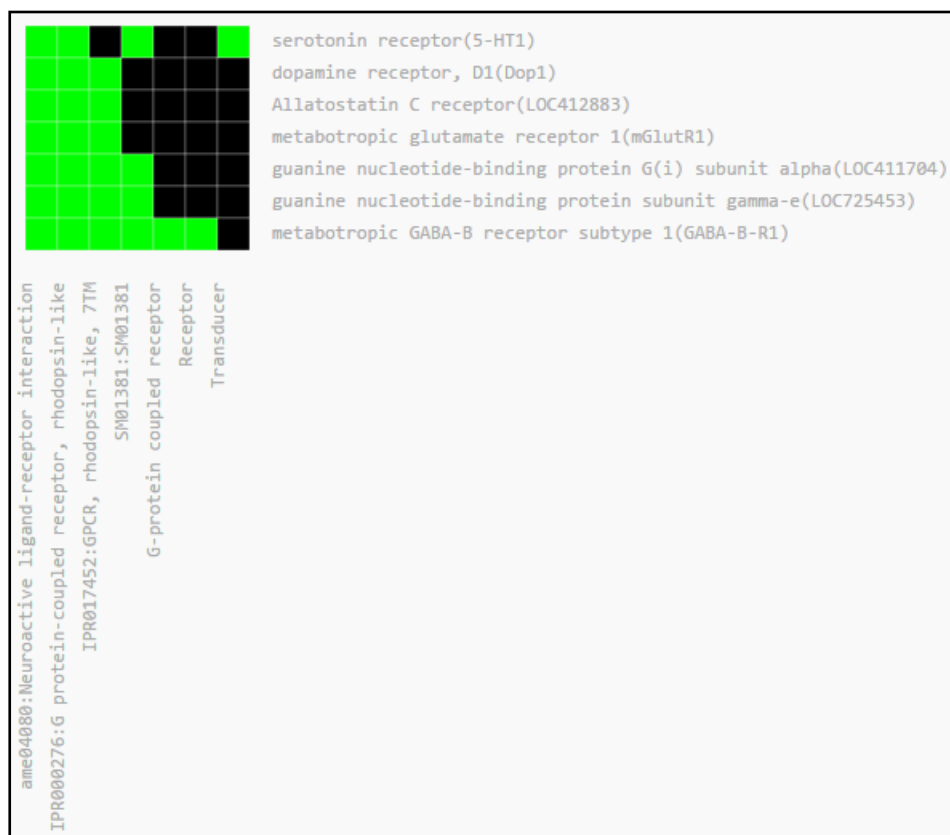
Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

Figura 50. Agrupamento de anotação funcional para o Cluster 69 para as proteínas que foram consideradas *down-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle.

Annotation Cluster 69		Enrichment Score: 0.01		Count	P_Value	Benjamini
☐	SMART	SM01381	RT	3	9.2E-1	1.0E0
☐	KEGG_PATHWAY	Neuroactive ligand-receptor interaction	RT	4	9.6E-1	9.9E-1
☐	UP_KEYWORDS	G-protein coupled receptor	RT	4	9.7E-1	1.0E0
☐	INTERPRO	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like	RT	3	1.0E0	1.0E0
☐	INTERPRO	GPCR, rhodopsin-like, 7TM	RT	3	1.0E0	1.0E0
☐	UP_KEYWORDS	Transducer	RT	6	1.0E0	1.0E0
☐	UP_KEYWORDS	Receptor	RT	4	1.0E0	1.0E0

Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

Figura 51. Uma visão 2D das evidências dos sete termos / categoria dos membros presentes no Cluster 69. Verde - associação correspondente do gene-termo relatada positivamente; Preto - associação correspondente do gene-termo não relatada ainda.



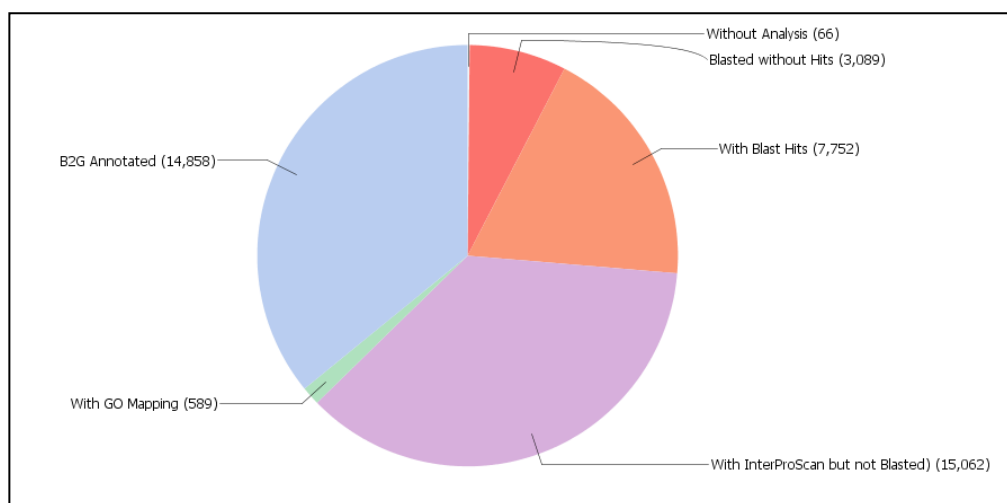
Fonte: David tools; criado pelo autor, 2017.

9.2.1.2 Blast2GO

Como citado na Parte I, Blast2GO é uma ferramenta de bioinformática para a anotação funcional automática e de alto rendimento dados de sequência. O software faz uso do algoritmo Blast para identificar seqüências semelhantes e depois transfere a anotação funcional existente das seqüências já caracterizadas. A ferramenta foi de extrema ajuda na interpretação dos resultados obtidos na análise do proteoma citosólico de cérebros de abelhas. Entretanto, quando aplicado à análise do proteoma de membrana os resultados não foram satisfatórios. Mesmo com a criação de um banco de dados específico para o estudo em questão, baseado tanto no Uniprot, quanto em RefSeq (NCBI) como também nos dados gerados pela análise transcriptômica, o número de anotações funcionais para *Apis mellifera* e, principalmente, para proteínas de membrana/receptores é escasso e limitante.

Para demonstrar o grau desta problemática, analisou-se o banco de dados completo utilizado nas buscas por identificação de proteínas como arquivo de entrada no Blast2GO. Os resultados gerais, em termos de anotações funcionais podem ser visualizados na Figura 52.

Figura 52. Análise pelo software Blast2GO do banco de dados utilizado nas análises do proteoma de membrana.



Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

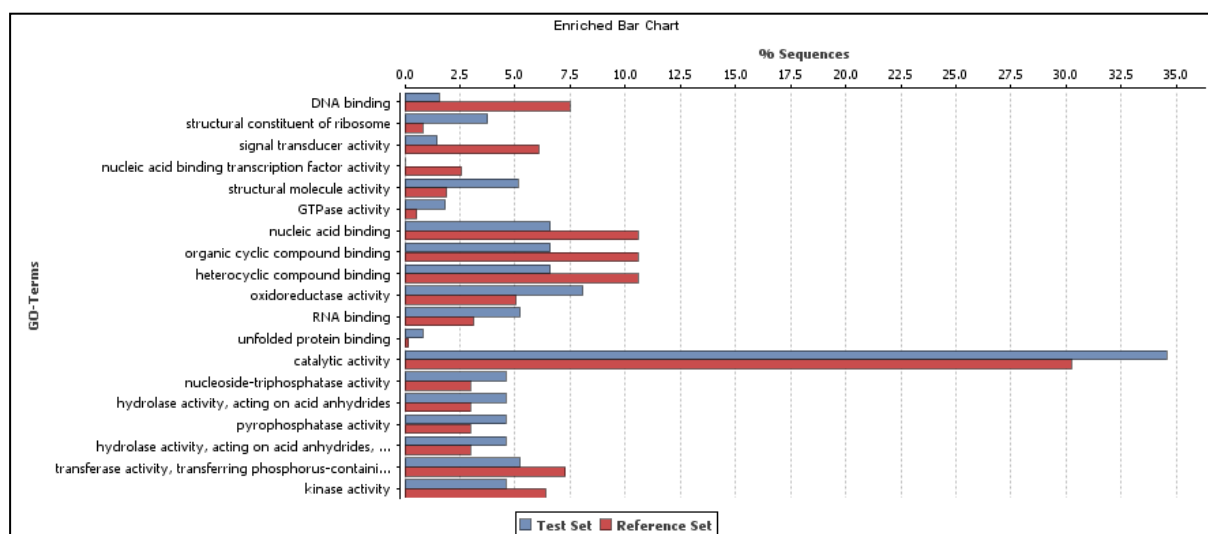
Embora o banco de dados possua mais de 42.000 sequências de proteínas, apenas 14.858 proteínas possuem alguma anotação funcional descrita em literatura. Mesmo após análise de Blast, 3.089 proteínas possuem hit e apenas 589 proteínas possuem mapeamento GO. A escassez em termos de informação funcional não permitiu que as análises realizadas neste software, incluindo o enriquecimento de termos de GO, nos fornecessem dados suficientes para a compreensão do papel das proteínas de membrana no mecanismo de memória e aprendizagem em abelhas.

Os resultados obtidos descrevem processos generalistas. Alguns dos resultados obtidos (após o enriquecimento dos termos de GO) podem ser visualizados nas figuras que seguem abaixo. Os resultados completos podem ser visualizados nos Anexos VII, VIII, IX e X.

A. Proteínas *down-regulated* – grupo REP vs grupo controle

Na Figura 53 pode-se visualizar os 20 termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) quando comparados os termos do grupo amostral (proteínas *down-regulated* em REP quando comparadas ao grupo controle) e o banco de dados de proteínas para *Apis mellifera*. Já na Figura 54 pode-se visualizar a análise de enriquecimento para as funções moleculares neste grupo.

Figura 53. Os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência). Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas *down-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle.

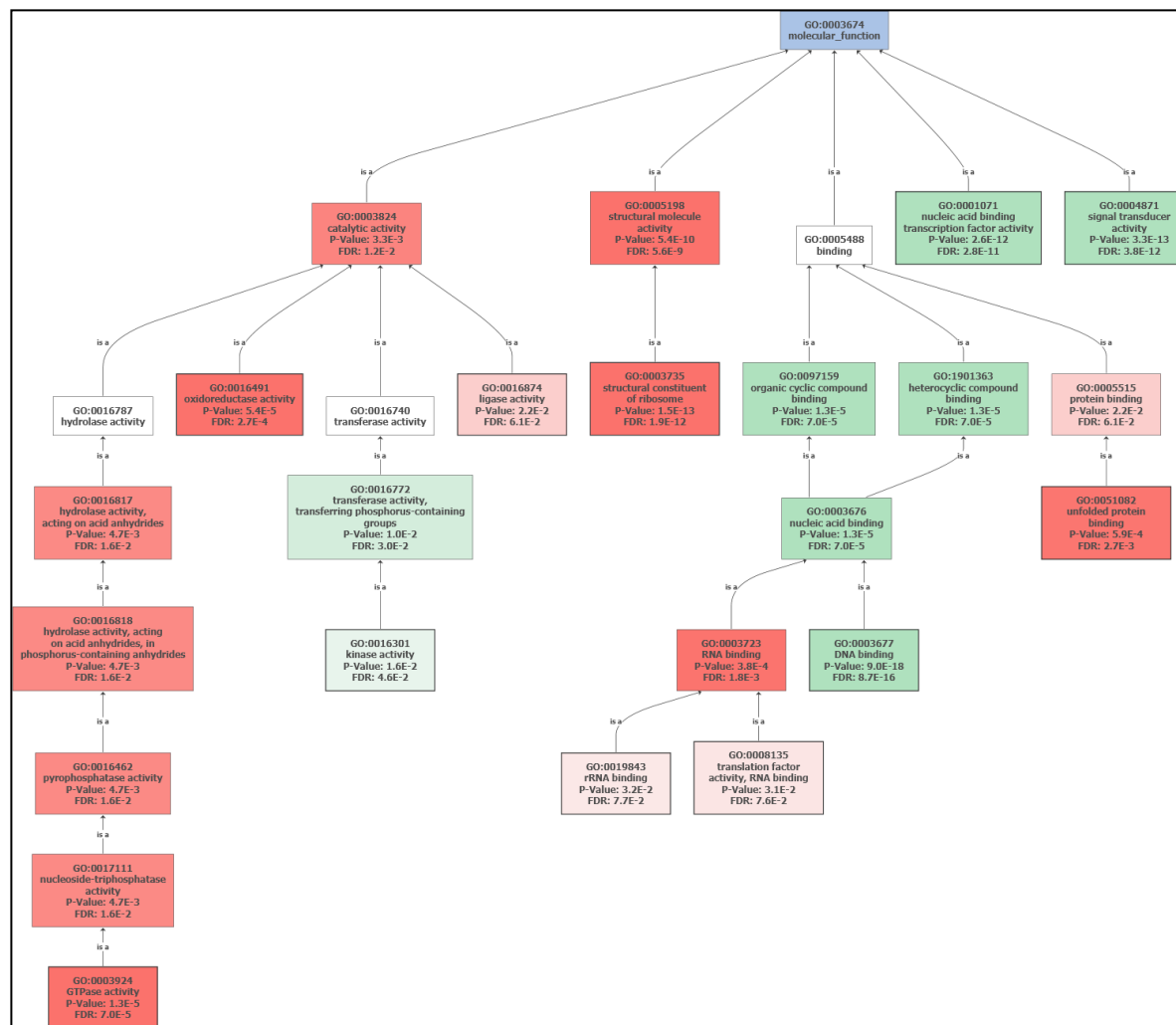


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

Os termos de GO mais representativos para este grupo de proteínas quando comparados ao banco de dados foram atividade catalítica, constituinte estrutural de ribossomos e atividade de oxidoreductase.

Já para funções moleculares (Figura 54), as mais *over-representated* foram atividade de GTPase, ligação a RNA e ligação a proteínas unfolded. Os termos *under-representated* foram atividade de transdução de sinal, atividade de quinase e ligação à DNA.

Figura 54. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas *down-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle. Vermelho - termos de GO *over-representated*; Verde – termos de GO *under-representated*. A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.

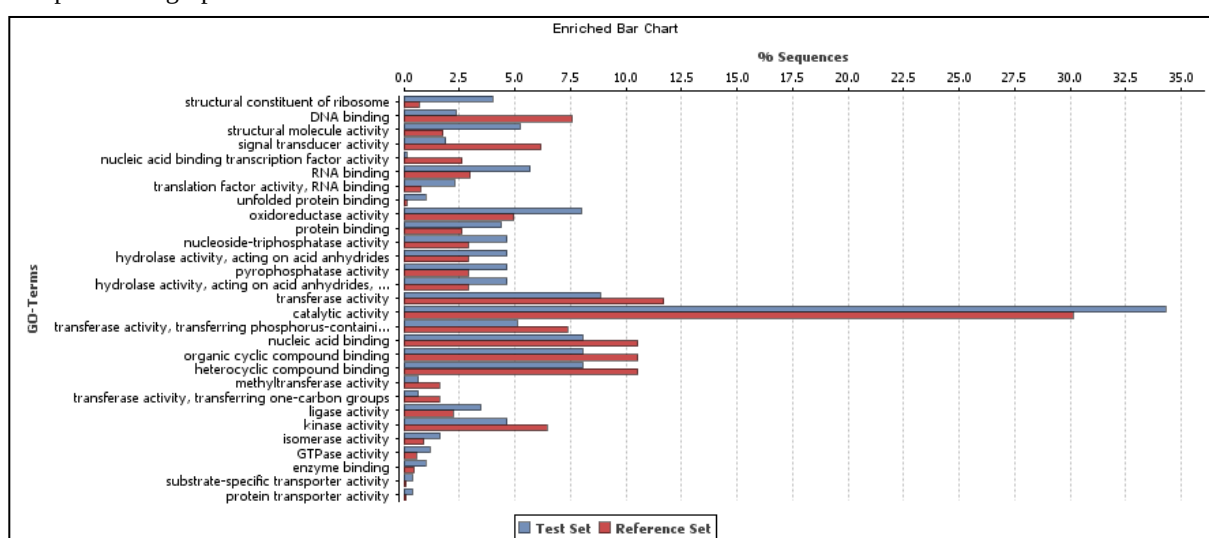


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

B. Proteínas *up-regulated* – grupo REP vs grupo controle

Na Figura 55 pode-se visualizar os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) quando comparados os termos do grupo amostral (proteínas *down-regulated* em REP quando comparadas ao grupo controle) e o banco de dados de proteínas para *Apis mellifera*. Já na Figura 56 pode-se visualizar a análise de enriquecimento para as funções moleculares neste grupo.

Figura 55. Os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) para as proteínas *up-regulated*. Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas *up-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle.

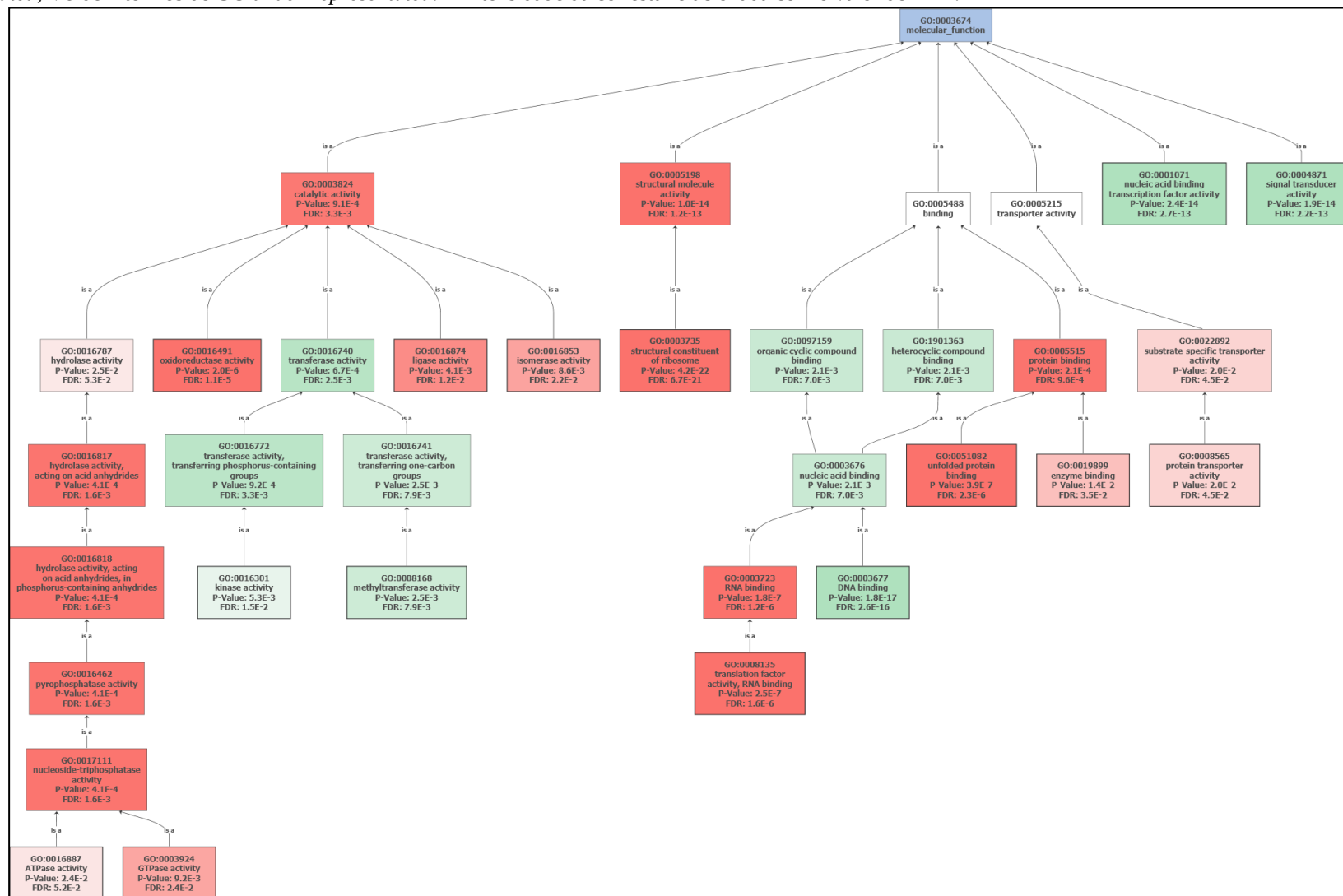


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

Os termos de GO mais representativos para este grupo de proteínas quando comparados ao banco de dados foram atividade catalítica, constituinte estrutural de ribossomos e atividade de oxidoreductase. As mesmas que para o grupo *down-regulated*.

Já para funções moleculares (Figura 55), as mais *over-representated* foram atividade de GTPase, ligação a RNA e ligação a proteínas unfolded. Os termos *under-representated* foram atividade de transdução de sinal, atividade de quinase, atividade de metiltransferase e ligação à DNA. Praticamente as mesmas descritas para o grupo *down-regulated*.

Figura 56. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas *up-regulated* no grupo REP quando comparado ao grupo controle. Vermelho - termos de GO *over-representated*; Verde – termos de GO *under-representated*. A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.

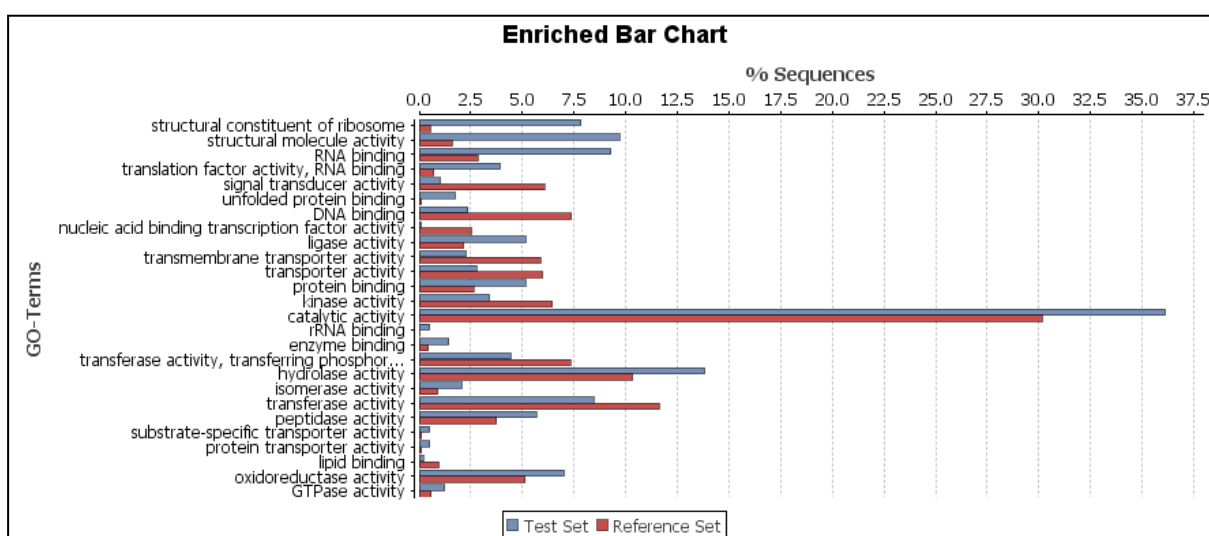


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

C. Proteínas *down-regulated* – grupo REP-condicionado vs grupo REP

Na Figura 57 pode-se visualizar os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) quando comparados os termos do grupo amostral (proteínas *down-regulated* em REP-condicionado quando comparadas ao grupo REP) e o banco de dados de proteínas para *Apis mellifera*. Já na Figura 58 pode-se visualizar a análise de enriquecimento para as funções moleculares neste grupo.

Figura 57. Os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) para as proteínas *down-regulated*. Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas *down-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.

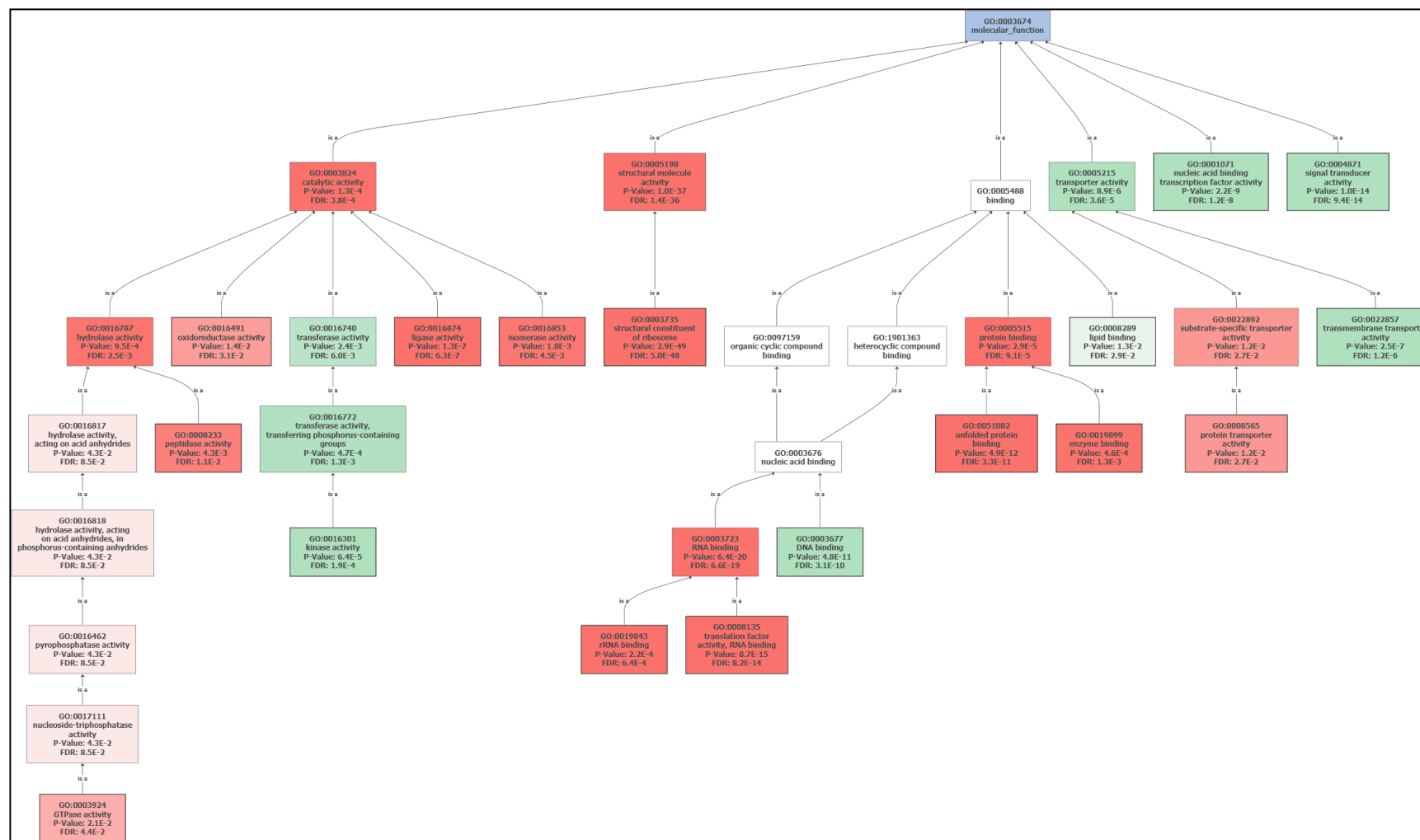


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

Os termos de GO mais representativos para este grupo de proteínas quando comparados ao banco de dados foram atividade catalítica, constituinte estrutural de ribossomos e atividade de oxidoreductase, atividade estrutural de moléculas, ligação ao RNA e atividade de hidrolase.

Já para funções moleculares (Figura 58), as mais *over-representated* foram atividade de GTPase, ligação a RNA, atividade de peptidase, ligação a enzima, atividade de proteína transportadora e ligação a proteínas unfolded. Os termos *under-representated* foram atividade de transdução de sinal, atividade de quinase e atividade de transporte transmembranar.

Figura 58. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas *down-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP. Vermelho - termos de GO *over-representated*; Verde – termos de GO *under-representated*. A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.

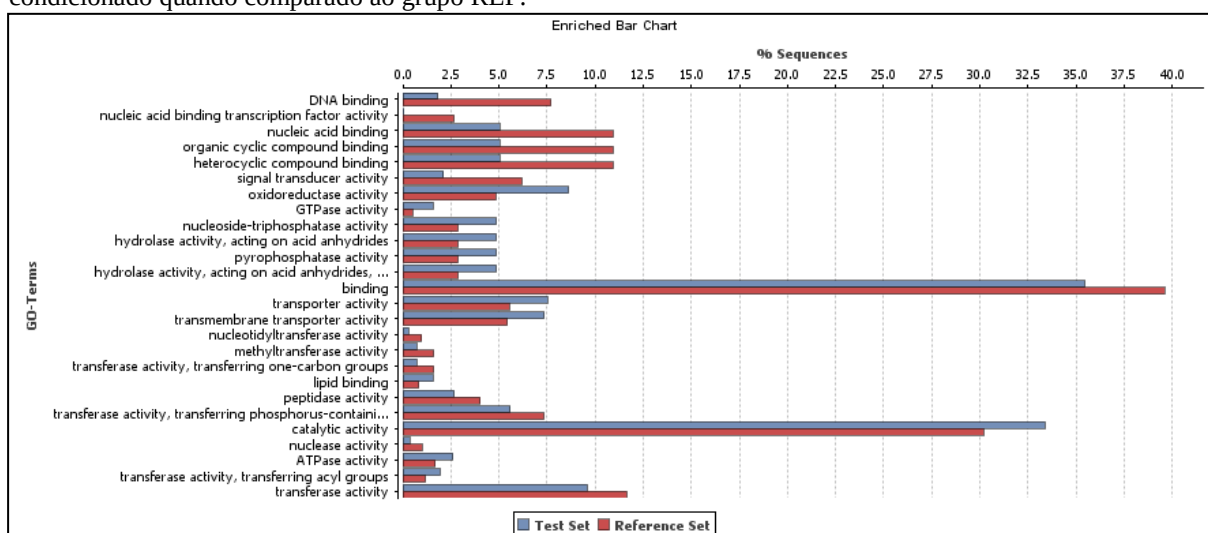


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

D. Proteínas *up-regulated* – grupo REP-condicionado vs grupo REP

Na Figura 59 pode-se visualizar os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) quando comparados os termos do grupo amostral (proteínas *up-regulated* em REP-condicionado quando comparadas ao grupo REP) e o banco de dados de proteínas para *Apis mellifera*. Já na Figura 60 pode-se visualizar a análise de enriquecimento para as funções moleculares neste grupo.

Figura 59. Os termos de GO mais representativos (em termos de porcentagem de sequência) para as proteínas *down-regulated*. Azul – banco de dados de proteínas; Vermelho – proteínas *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP.

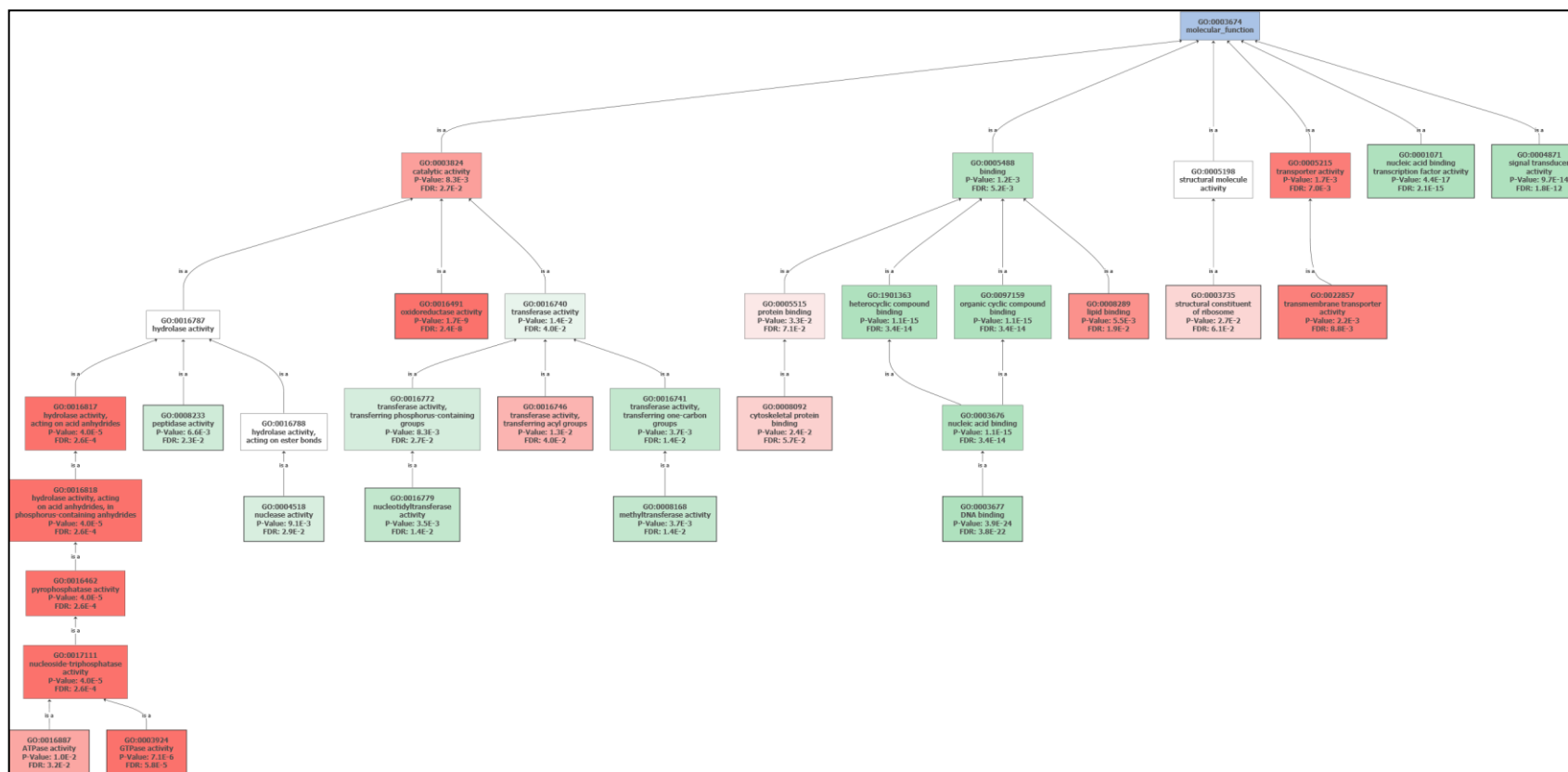


Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

Os termos de GO mais representativos para este grupo de proteínas quando comparados ao banco de dados foram atividade catalítica, ligação ao RNA e atividade de transporte transmembranar.

Já para funções moleculares (Figura 60), as mais *over-representated* foram atividade de GTPase, atividade de ATPase, atividade de transferase, ligação de proteína ao citoesqueleto, ligação a lipídeos, atividade de transporte transmembranar. Os termos *under-representated* foram atividade de transdução de sinal, atividade de nuclease e atividade de peptidase e atividade metiltransferase.

Figura 60. Análise de enriquecimento (funções moleculares) de proteínas *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado ao grupo REP. Vermelho - termos de GO *over-representated*; Verde – termos de GO *under-representated*. A intensidade da cor está relacionada com o valor de FDR.



Fonte: Blast2GO; criado pelo autor, 2017.

9.2.1.3 BlastKOALA

BlastKOALA (*KEGG Orthology And Links Annotation*), é uma ferramenta de anotação interna do KEGG. Funciona baseada na atribuição de um número K após a pesquisa BLAST contra um conjunto de dados não redundantes de sequências de pangenome, que é gerado a partir da base de dados KEGG GENES, mantendo o valor de KO de cada categoria taxonômica. A anotação do genoma no KEGG é simplesmente atribuir identificadores KO (números K) ao invés de reescrever definições de texto de genes no banco de dados GENES. Em geral, o agrupamento de KO de ortólogos funcionais é definido no contexto das vias KEGG e outras redes moleculares, que de fato são representadas como redes de nós identificados por números K. Portanto, uma vez que os genes no genoma recebem números K, as vias KEGG e outras redes moleculares podem ser automaticamente reconstruídas.

A submissão dos dados adquiridos (proteínas identificadas como sendo diferencilmente expressa entre os grupos de estudo) a esta ferramenta possibilitou uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos com o estímulo não-condicionado e, principalmente, com o estímulo condicionado (memória de curto-prazo). Com o intuito de facilitar a visualização e o entendimento dos resultados obtidos com esta ferramenta, as rotas metabólicas serão apresentadas por categoria, comparando-se sempre a rota obtida para o grupo REP comparado ao grupo controle e a rota obtida para o grupo REP-condicionado comparado ao grupo REP. Em cada rota foram assinaladas em vermelho as proteínas *down-regulated* e em verde as proteínas *up-regulated*. As proteínas que não apresentam coloração fazem parte da rota metabólica em questão, mas não foram identificadas neste estudo.

Embora a ferramenta tenha sido extremamente útil para a compreensão dos dados obtidos, o algoritmo realiza uma espécie de Blast com os códigos de acesso fornecidos (códigos do Uniprot) e contrasta essas sequências com um banco pangenômico em eucariotos (setado no momento da análise). Quando as rotas metabólicas são criadas, as proteínas nelas apresentadas são genéricas. Sendo assim, por exemplo, o GABA_B visualizado na rota metabólica da sinapse GABAérgica corresponde a diferentes códigos de acesso depositados em diferentes bancos de dados (12 diferentes entradas considerando Uniprot, RefSeq e Swiss-Prot) que podem corresponder a sequências similares e/ou isoformas protéicas. Desta forma, GABA_B possui um número de KO que na verdade corresponde a diversos tipos de GABA_B descritos em literatura (Figura 61 exemplifica esta situação).

Em suma, algumas proteínas foram assinaladas como sendo *down-regulated* e *up-regulated* para o mesmo processo biológico dentro de uma mesma comparação; no exemplo citado, GABA_B foi considerado *up-regulated* quando os códigos de acessos para as proteínas

up-regulated foram submetidas ao BLASTKoala, mas também foi considerada *down-regulated* quando os códigos de acessos das proteínas *down-regulated* foram submetidas a este mesmo software. Entende-se que na verdade diferentes isoformas desta proteína foram identificadas e que uma delas poderia estar *up-regulated* enquanto que a outra estava *down-regulated*, porém essa diferença não é apresentada pelo algoritmo em questão. Levando-se em conta que este tipo de resultado gerado é fruto de uma imprecisão do software utilizado, essas proteínas foram assinaladas em amarelo e não foram consideradas na discussão dos dados.

Figura 61. Lista dos códigos de acessos (12) para GABA_B encontrados na literatura e que representam apenas um número KO em KEGG.



LinkDB Search

Mode: Single Entry to Database
 From: KEGG HSA 2550
 To: Protein sequence
 Hits: 12 from 3 databases

UniProt

Q59HG8 Q9UBS5	[Q59HG8] SubName: Full=Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1 isoform c variant {ECO:0000313 EM [Q9UBS5] RecName: Full=Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1; Short=GABA-B receptor 1; S

SWISS-PROT

Q9UBS5	[Q9UBS5] RecName: Full=Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1; Short=GABA-B receptor 1; S

RefSeq(pep)

NP_001305982 NP_001461 NP_068703 NP_068704 XP_005249039 XP_006715110 XP_011512755 XP_011512757 XP_016866165	gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform k [Homo sapiens]. gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform a precursor [Homo sapiens]. gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform b precursor [Homo sapiens]. gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform c precursor [Homo sapiens]. PREDICTED: gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform X1 [Homo sapiens]. PREDICTED: gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform X2 [Homo sapiens]. PREDICTED: gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform X3 [Homo sapiens]. PREDICTED: gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform X5 [Homo sapiens]. PREDICTED: gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 isoform X4 [Homo sapiens].

Fonte: BlastKOALA; criado pelo autor, 2017.

Vale ressaltar que diversas rotas metabólicas foram criadas, porém iremos enfatizar as rotas contidas na classificação de Sistema Nervoso fornecidas como resultado pelo KEGG. Os resultados completos gerados por BlastKOALA podem ser visualizados nos Anexos XI, XII XIII e XIV

A. Transdução Olfativa

Estruturas quimiossensoriais em insetos são capazes de detectar uma ampla gama de produtos químicos voláteis, solúveis - sinais. Esses sinais são muito importantes para

encontrar e avaliar a qualidade da fonte de alimento (DAHANUKAR et al., 2006). Os sistemas olfativos de Apis e mamíferos são excepcionalmente semelhantes. Eles envolvem os mesmos receptores em neurônios receptores olfatórios (ORNs), que transmitem sinais de um único glomérulo (*Apis*) ou o bulbo olfatório (mamíferos) para os centros cerebrais superiores - corpo cogumelo e o cálice lateral (*Apis*), ou para o Córtex olfatório (mamíferos) (STOCKER et al., 1994).

Os neurônios receptores olfativos (ORNs) são células especializadas que podem transformar a presença de moléculas de odor em seu ambiente em potenciais de ação enviados para o cérebro. Eles fornecem ao cérebro informações sobre o mundo exterior, a partir da qual os animais podem localizar presas e alimentos, se comunicar uns com os outros e evitar predadores (ROSPARS et al., 2010).

Os ORNs expressam diferentes tipos de famílias de receptores (quimiosensores) que foram denominados receptores ionotrópicos (IRs), receptores gustativos (GRs) ou receptores odoríferos (ORs) (BENTON et al., 2009; GETAHUN et al., 2012; ABUIN et al., 2011; ZHANG et al., 2000; CROSET et al. 2010, ISONO E MORITA, 2010).

Quaisquer que sejam os odorantes e o grupo de animais, o evento central de transdução olfativa em ORNs é a interação de moléculas odoríferas com proteínas de membrana - os receptores olfatórios (ORs). As ORs formam a interface entre reações externas que ocorrem no ambiente aquoso de ORNs e reações internas envolvendo várias proteínas de membrana e íons cuja função principal é amplificar o sinal inicial fraco proporcionado pela ligação odorante os ORs. Os insetos sentem odores com receptores odoríferos especializados (ORs) (ROSPARS et al., 2010).

Enquanto as OR clássicas são proteínas de 7 domínios transmembranares extremamente divergentes, o co-receptor partilha até 94% de identidade de sequência com ortólogos entre espécies de insetos (JONES et al.; 2005, PATCH et al., 2009; KRIEGER et al., 2003; OLAFSON, 2013). Vosshall e colaboradores (1999) nomearam o primeiro gene para este receptor A45 conservado e o descreveram como um grande (486 aminoácidos), membro mais divergente da família de genes OR de *Drosophila* com apenas 24% de identidade de sequência com os receptores odorantes clássicos. Na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* a proteína codificada por A45 foi denominada Or83b. Em diferentes espécies de insetos, diferentes nomes foram atribuídos aos respectivos ortólogos. Para simplificar as questões e enfatizar a importância de Or83b como co-receptor foi finalmente chamado receptor olfativo co-receptor: Orco (VOSSHALL E HANSSON 2011). Os autores sugeriram que os seguintes requisitos devem ser cumpridos para nomear um gene orco: A identidade de

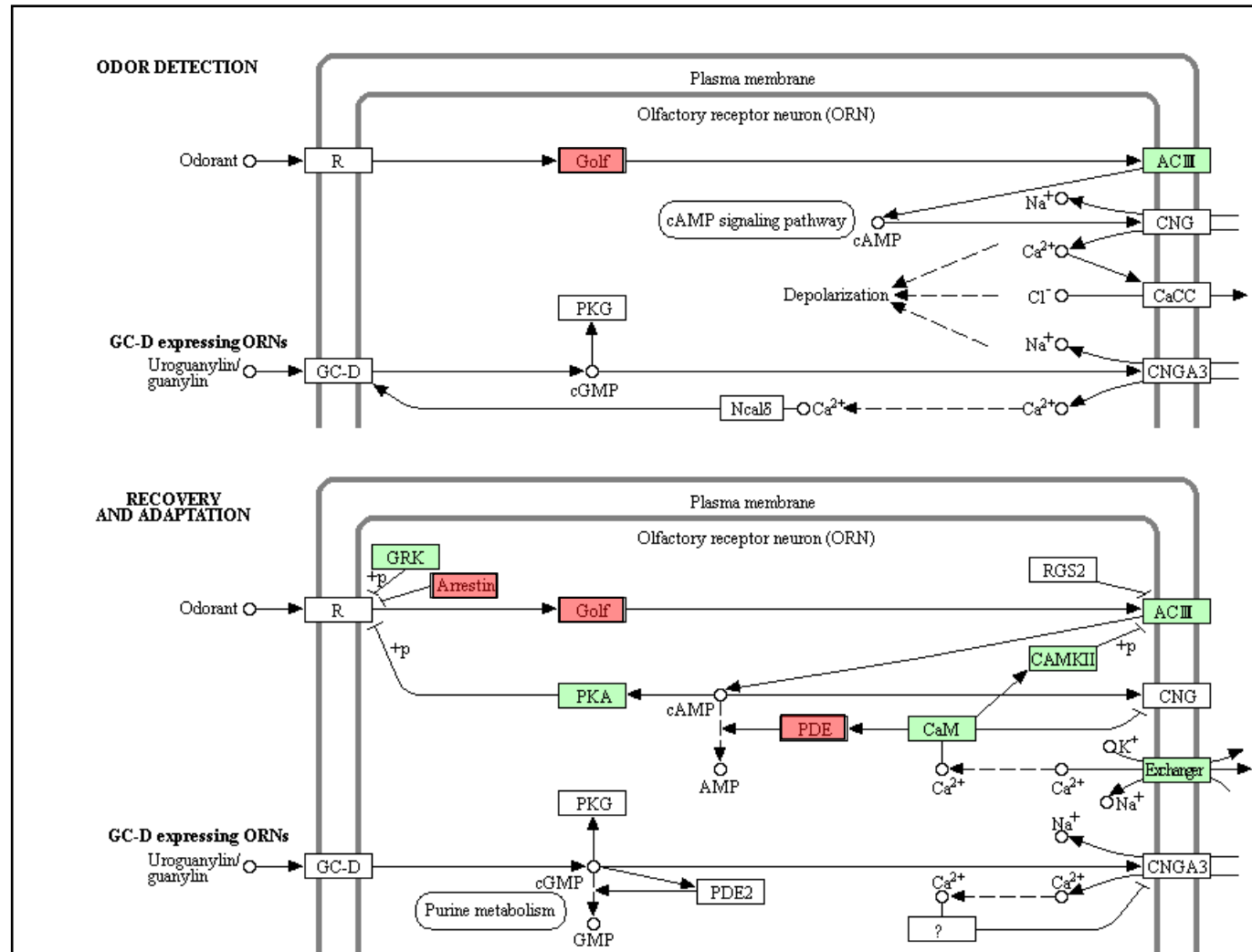
seqüência para ortólogos de outras espécies de insetos é de pelo menos 50%, mRNA e proteína é expressa na maioria dos sensilla quimiossensorial e o tamanho da proteína prevista é maior do que o tamanho de ORs convencionais, devido a uma inserção no segundo ciclo intracelular. Na maioria das ORNs em diferentes espécies de insetos, Orco é expresso (VOSSHALL et al., 1999; JONES et al., 2005; NAKAGAWA et al., 2005; LARSSON et al., 2004).

Em insetos, aleloquímicos e feromônios são detectados por ORNs localizados em diferentes tipos de sensila antenal que se projetam para diferentes partes dos lobos antenais (HANSON et al., 2000). Cada neurônio antenal de receptor olfativo expressa um OR com um sítio de ligação de odor em conjunto com um co-receptor conservado chamado Orco que não se liga a odores. O Orco é necessário para a localização de ORs em membranas dendríticas e, portanto, é essencial para a detecção de odores (STENGL et al., 2013). Em várias ordens de insetos, os ORNs feromonasensíveis projetam para um grupo de glomérulos de grande porte, o complexo macroglomerular (MGC), enquanto os outros ORNs projetam para os glomérulos comuns mais numerosos (HANSON et al., 2000). Em ORNs de insetos, a repolarização depende do Ca^{2+} extracelular e provavelmente envolve uma corrente de K^+ dependente de Ca^{2+} e tensão (78). São conhecidos mecanismos de feedback dependentes de Ca^{2+} que atuam sobre canais catiônicos através de CaCaM (LUCAS et al., 2006) e sobre PLC β através da proteína quinase C (MAIDA et al., 2000 e CHOUGET et al., 2010). Os mecanismos de extrusão de Ca^{2+} ainda não foram elucidados. Porém, sabe-se que se forma um canal catiônico de abertura espontânea, ativado por fosforilação pela proteína quinase C. Depois, Orco também é ativado através de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (STENGL et al., 2013). Orco forma homo e heterômeros com ORs com estequiometria desconhecida.

As semelhanças entre o sistema olfativo de *Apis* e mamíferos fazem *Apis* um grande modelo para a investigação médica, e a detecção de receptores a nível de proteína utilizando métodos livres de gel combinado com espectrometria de massa abre novas perspectivas na biologia molecular.

Levando-se em conta a importância do sistema de reconhecimento de odor em insetos, as Figuras 62 e 63 apresentam as proteínas envolvidas com a transdução olfativa em *Apis* e os resultados obtidos a partir da ferramenta BlastKOALA.

Figura 62. Transdução olfativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated* e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

Para ambas as comparações a detecção do odor ocorreu através de receptor de odor (diversos receptores de odor foram identificados nas análises aqui relatadas). Para a proteína Golf (*guanine nucleotide-binding protein*), observou-se *down-regulation* quando se comparou o grupo REP ao grupo controle e o oposto foi observado quando se comparou o grupo REP-condicionado ao grupo REP (*up-regulation*). Em ambas as comparações, observou-se *up-regulation* da proteína ACIII (*adenylate-ciclase III*). Na fase de recuperação e adaptação do odor detectado, observou-se que o processo biológico se seguiu através da expressão de proteínas relacionadas com troca de íons (*calmodulin* – CaM e *exchanger*). Porém, na comparação dos grupos REP vs controle as proteínas *arrestin*, *Golf* e *PDE* tenham sido consideradas *down-regulated*. Tanto golf, quanto arrestin estão relacionadas com processos que envolvem a sinalização por meio de proteína-G; já PDE está envolvida na regulação da transdução de sinais mediada por mensageiros secundários. Sendo assim, o processamento do odor oriundo da solução de sacarose (no grupo REP) parece desencadear a expressão/síntese de proteínas envolvidas na transdução olfativa, com exceção de proteínas envolvidas com proteínas-G e mensageiros secundários. Sugere-se que o reconhecimento de um odor, que é de conhecimento prévio, não exige a síntese de proteínas relacionadas com o sistema de proteínas-G.

A partir dos dados obtidos neste projeto, quase todas as *odorant binding proteins* (OBPs) apresentaram-se *up-regulated* no grupo REP-condicionado quando comparado com o grupo REP de acordo com valores de *Fold Change*. A rota metabólica de transdução olfativa confirma o fato de que dentre as proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre o grupo REP-condicionado, todas apresentaram-se *up-regulated* quando comparadas ao grupo REP. A detecção/reconhecimento de um odor (2-octanona) associado à solução de sacarose (aprendizado associativo) requer a síntese de proteínas da rota metabólica de transdução olfativa, para que o processo de memória e aprendizagem seja consolidado.

B. Transdução Gustativa

O sentido do paladar é um sistema quimiosensor especializado dedicado à avaliação de alimentos e bebidas. Apesar do fato de que vertebrados e insetos evoluíram independentemente distintas vias anatômicas e moleculares para a sensação de gosto, existem claros paralelos na organização e lógica de codificação entre os dois sistemas. Existem agora evidências convincentes de que a qualidade do sabor é mediada por linhas marcadas, e que populações distintas e estritamente segregadas de células receptoras gustativas codificam cada uma das qualidades gustativas (YARMOLINSKY et al., 2009).

A probóscide é normalmente armazenada na base da cabeça, mas a estimulação dos neurônios do paladar labial ou com um sabor atraente como o açúcar provoca a extensão da tromba, a abertura do labelo e a iniciação do programa de alimentação. Espera-se que a adição de substâncias desagradáveis à fonte alimentar suprima o reflexo de extensão da probóscide (REP) e provoque a retração da trombose; extensão / retração da probóscide são comportamentos inatos robustos e são comumente usados como ensaios comportamentais para estudos da função do sistema gustativo (YARMOLINSKY et al., 2009).

Os receptores gustativos de insetos (GRs) são membros de uma grande família de receptores acoplados à proteína G, relacionados com os receptores olfativos. Eles são filogeneticamente diferentes dos receptores de sabor da maioria dos outros animais. Estudos moleculares recentes em *Drosophila* revelaram que o sistema do receptor gustativo do inseto não cobre somente um amplo espectro de açúcares, substâncias amargas ou sais que são comuns aos mamíferos mas inclui também a recepção de feromônio e de estimulantes somato-sensoriais (ISONO e MORITA, 2010). No entanto, o mecanismo central para perceber e discriminar a informação do sabor ainda não foi elucidado. A análise da projeção primária dos neurônios do paladar para o cérebro mostra que os perfis de projeção dependem basicamente das localizações periféricas dos neurônios, bem como dos GRs que estão expressos. Estes resultados sugerem que os princípios de design periférico e central da percepção gustativa do inseto são diferentes dos da percepção olfativa (ISONO e MORITA, 2010).

Os órgãos de gosto dos insetos foram descritos pela primeira vez no início do século XX como estruturas semelhantes a pêlos nas pernas distais que induzem a reação de reflexão de alimentação para estimulações de açúcar em borboletas (MINNICH, 1921). A simplicidade dos órgãos gustativos dos insetos inervados por apenas alguns neurônios foi ideal para estudos fisiológicos. Os potenciais de ação de unidade única, a sensibilidade aos ligantes de sabor e outras propriedades fisiológicas foram estudados intensamente durante os anos 1950-70 usando várias moscas (DETHIER, 1976). Estudos morfológicos ou de desenvolvimento

também foram realizados em moscas nos anos 80 e 90 (POLLACK E BALAKRISHNAN, 1997, SINGH, 1997).

Estudos moleculares de receptores gustativos de insetos começaram em torno da década de 2000. A pesquisa do genoma de *Drosophila* conduziu com sucesso às primeiras descobertas de uma grande família de genes de receptores gustativos (GR) e caracterização de neurônios receptores de sabor que expressam GRs divergentes (CLYNE et al., 2000).

Os primeiros estudos que utilizaram esta abordagem identificaram várias classes funcionais de GRNs. As cerdas gustativas curtas e longas contêm um neurônio que responde ao açúcar (S), um à água (W), um ao sal (L1) e um quarto que responde a compostos amargos e concentrações mais elevadas de sal (L2; MEUNIER et al., 2003, SIDDIQI E RODRIGUES, 1980, THORNE et al., 2005). As cerdas intermediárias contêm apenas duas células quimiosensoras (HIROI et al., 2004), uma sintonizada tanto com sal baixo como com açúcares (i.e., atraentes) e uma com sal e amidos elevados (i.e., aversivos). Como esperado, diferentes gostos que são detectados pela mesma célula (como sal, cafeína e quinina) estimulam uma resposta comportamental comum. Este arranjo é fortemente remanescente da situação em mamíferos, em que a seletividade para qualidades gustativas diferentes é segregada entre um número limitado de tipos de células (YARMOLINSKY et al., 2009).

Os receptores GR para o CO₂ (Gr21a e Gr63a) e para os açúcares (Gr5a, Gr61a e seis gr64 de Gr64a a Gr64f) são mais conservados do que outros GRs incluindo GRs para substâncias amargas. Em insetos tais como mosquito, traça, besouro, vespa, abelha, pulgão e piolho são mostrados para transportar tanto genes GR e OR no genoma (FlyBase, <http://flybase.org/>). A abelha *Apis mellifera* possui 163 genes OR intactos, mas apenas 10 GR intactos (ROBERTSON E WANNER, 2006). Um inseto díptero o mosquito do vetor da malária *Anopheles gambiae* transporta 79 e 76 genes OR e GR, respectivamente (HILL et al., 2002). Os números de genes GR são, portanto, semelhantes entre os dois insetos díptero, mas os seus GRs são tão distintos que muitas vezes é difícil encontrar ortólogos comum entre os dois insetos.

Para muitos insetos, incluindo moscas, borboletas e abelhas, a estimulação de órgãos do paladar com uma solução de açúcar não só induz a resposta neuronal, mas também um robusto reflexo de alimentação chamado extensão da probóscide resposta e vários comportamentos apetitivos. Estudos eletrofisiológicos e morfológicos mostram que a resposta do açúcar de um gosto sensillum deriva de um único neurônio sensível ao açúcar enquanto outros neurônios respondem a outras estimulações do sabor (DETHIER, 1976).

Os neurônios gustativos dos insetos são neurônios quemosensoriais que expressam não somente GRs do receptor gustativo, mas também outros tipos de receptores sensoriais. Uma vez que múltiplos subgrupos diferentes de GRs são expressos em diferentes tipos de neurônios do paladar, os perfis globais da expressão do receptor no sistema gustativo do inseto são complexos em contraste com um receptor - um perfil de expressão dos neurônios no sistema olfativo. Ao permitir a expressão de múltiplos receptores diferentes em neurônios de sabor único, os insetos podem ser capazes de expandir o espectro do ligante. Entretanto, o projeto sacrificaria o desempenho na discriminação. Estudos futuros sobre o mecanismo central do paladar no cérebro do inseto são necessários para entender como os neurônios ligados ao paladar dos insetos processam informações químicas e controlam os resultados comportamentais.

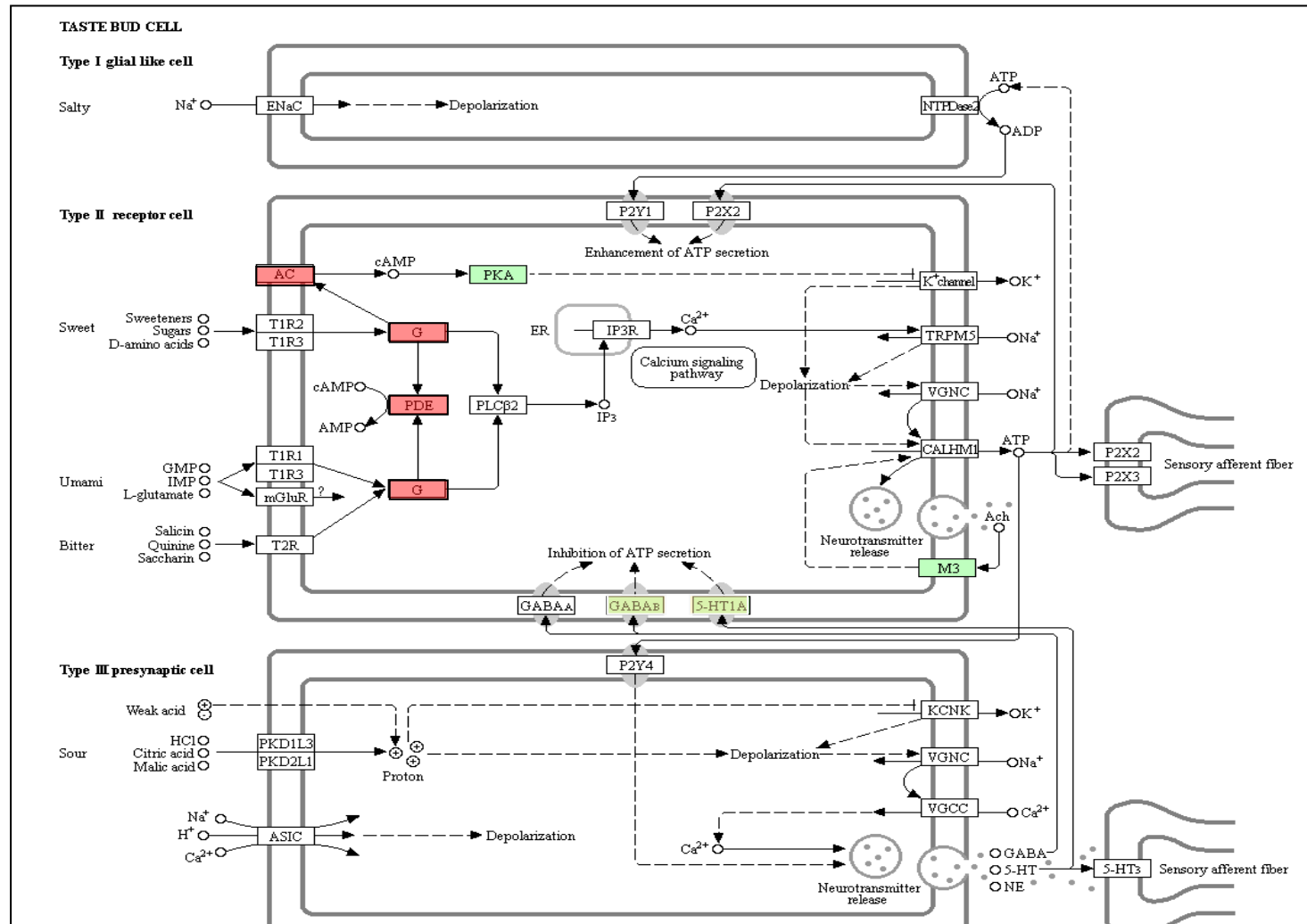
Os resultados obtidos neste estudo podem ser visualizados nas Figuras 64 (grupo REP vs controle) e 65 (REP-condicionado vs REP). Em ambas as comparações, o estímulo gustativo (solução de sacarose) foi processado por meio das células receptoras do tipo II, expressando a proteína *adenylate cyclase* (AC) e receptores do complexo de proteínas-G (G - guanine nucleotide-binding protein G e PDE - calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase). A rota segue pela expressão dos receptores GABA_B e 5-HT1A (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor) e/ou pela expressão de PKA (*protein kinase A*). Já na parte final da transdução gustativa, a proteína M3 (*muscarinic acetylcholine receptor*) foi detectada.

Com relação à regulação da expressão de proteínas, observou-se na comparação REP vs controle que AC, G e PDE estavam *down-regulated*, enquanto que PKA e M3 estavam *up-regulated*. Como nos resultados obtidos para a transdução olfativa, observou-se que as proteínas de transdução ligadas ou relacionadas com proteínas-G tiveram uma regulação descendente no grupo REP em relação ao grupo controle. Já as proteínas PKA e M3, que tiveram regulação ascendente, parecem estar envolvidas com o metabolismo energético (consumo de ATP) e recuperação de memória previamente adquirida já que PKA é conhecida por desempenhar diversas funções várias funções na célula, incluindo a regulação do glicogênio, açúcar e metabolismo lipídico e M3 é descrita em literatura por estimular a secreção, por exemplo, nas glândulas salivares e órgãos gustativos.

Já na comparação do grupo REP-condicionado vs grupo REP, todas as proteínas identificadas na rota de transdução gustativa estavam com regulação ascendente, com exceção do receptor M3. Em função de o processo principal neste grupo ser associação do odor com recompensa, e M3 já ter sido associada com estímulo de secreção de órgãos gustativos, pode

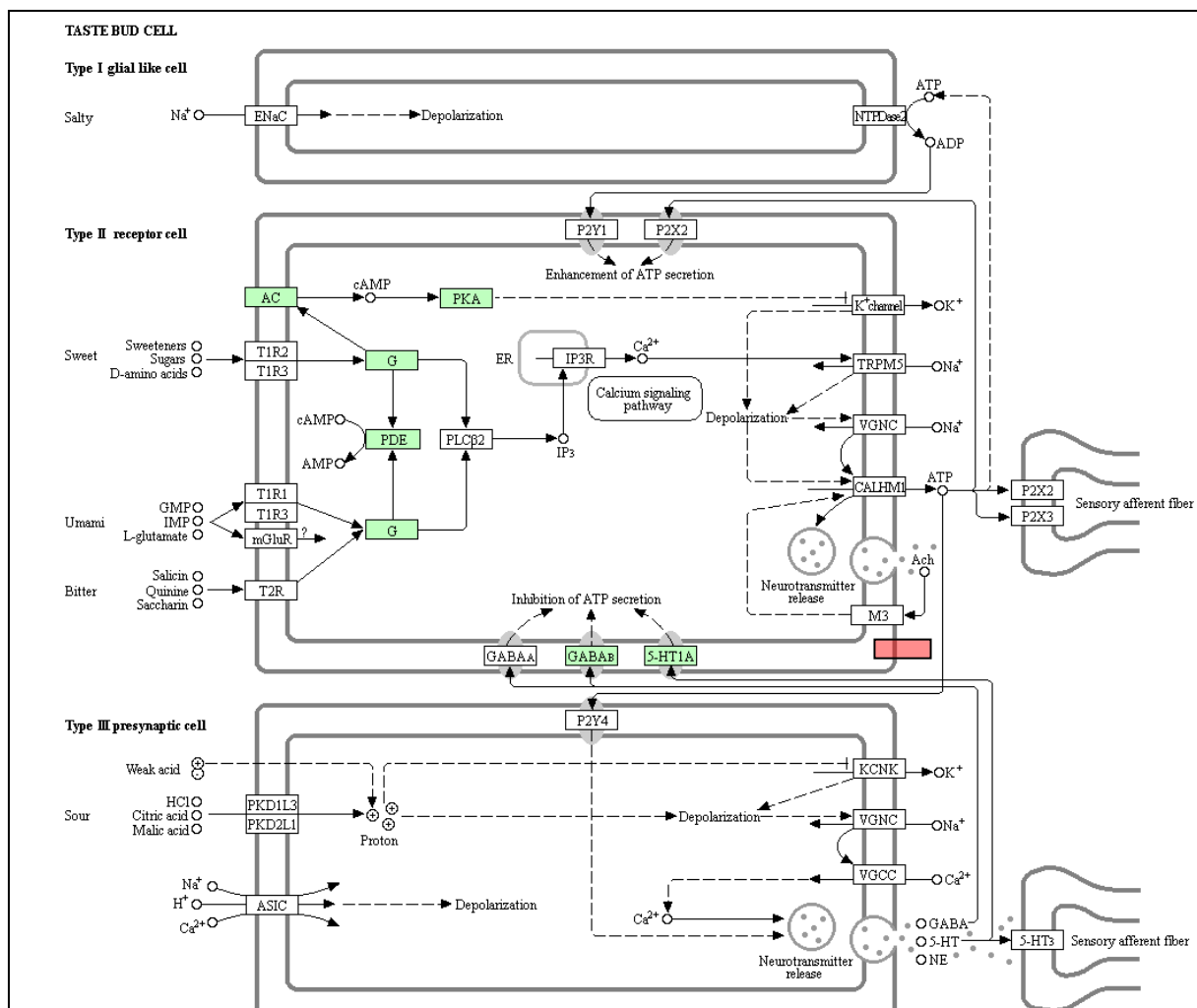
ter sido *down-regulated* quando em comparação com receptores associados a aprendizagem e não recuperação de memória prévia.

Figura 64. Transdução gustativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

Figura 65. Transdução gustativa para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated* e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

C. Vesículas Sinápticas

Os componentes dos complexos pré-sinápticos bem como as proteínas que participam na biogênese das organelas são fortemente coordenados. A maioria das proteínas sinápticas estão envolvidas em ricas redes de interação de proteínas. Yanay e colaboradores (2008) compilaram uma lista de 120 genes que compõem o núcleo de estruturas pré-sinápticas em insetos. A análise desta lista revelou que 50% das proteínas são bem conservados e têm uma similaridade de sequências superior a 65%. Entre elas, 60% estão em um nível de similaridade superior a 75%. Assim, a maioria das proteínas que participam em estruturas pré-sinápticas humanas são extremamente bem conservadas.

Os insetos carecem de várias proteínas *scaffold* na zona ativa, como *bassoon* e *piccollo*, e a proteína mais abundante na vesícula sináptica de mamíferos, a saber, a *synaptophysin*. Globalmente, o número de proteínas que interagem e os graus de conservação de sequências entre humanos e insetos estão intimamente correlacionados. Tal correlação é válida para proteínas exocitóticas, mas não para endocitóticas.

Em todos os neurônios, a comunicação através da sinapse é mediada pela liberação de neurotransmissores de vesículas sinápticas. Como todo o processo pode levar apenas uma fração de milissegundo (em sinapses de liberação rápida), processos adicionais asseguram a iniciação, direcionamento e encaixe de vesículas sinápticas na zona ativa (JAHN, 2004).

O papel sináptico de muitas proteínas já foi estabelecido, baseado principalmente na genética de organismos modelo como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (BROADIE et al., 2002). Em 2006, a composição e a estequiometria de proteínas e lipídios de vesículas sináptica de cérebro de ratos foram apresentados (TAKAMORI et al., 2006). Com base na tecnologia de proteômica com base em espectrometria de massa (MS), foram identificadas cerca de 80 proteínas. Esquematicamente, as proteínas das vesículas sinápticas estão associadas com os seguintes grupos funcionais: organizadores e proteínas do citoesqueleto; transportadores e canais; sensores e proteínas de transdução de sinal; *priming*, *docking*, e de fusão (MARTIN, 2002; SCHWEIZER e RYAN, 2006); máquinas endocitóticas e de reciclagem (RYAN, 2006; HARRIS et al., 2001; CREMONA e CAMILLI, 1997); e ligantes entre as membranas pré-sinápticas e pós-sinápticas (BROADIE et al., 2002). Além disso, as proteínas de ancoragem são criticamente importantes durante o desenvolvimento e formação de novas sinapses (AKINS e BIEDERER, 2006). Estas proteínas são uma combinação de aderência, citoesqueleto e proteínas de sinalização. A especificidade dos neurônios no sistema nervoso central (SNC) é definida principalmente pela composição de receptores, transportadores e canais iônicos nas estruturas de densidade pré-sináptica e pós-

sináptica (PSD) (ATAMAN et al., 2006). Além de seu papel na transmissão neuronal através de canais iônicos, proteínas PSD são essenciais para o estabelecimento de uma rede de proteínas que liga o citoesqueleto à matriz extracelular (BROADIE et al., 2002).

A vesícula sináptica associada a proteínas de membrana (VAMP, também chamada sinaptobrevina) atua como v-SNARE, enquanto que as proteínas de membrana pré-sináptica syntaxina e SNAP-25 são t-SNAREs. A ATPase multimérica NSF (ATPase de fusão sensível a N-etilmaleimida) é posteriormente recrutada para o complexo SNARE por SNAPs (MONTECUCCO et al., 2005) e atua para quebrar o complexo SNARE extremamente estável, reativando os SNAREs individuais para futuros eventos de fusão. A fusão de vesículas sinápticas na estrutura pré-sináptica requer um grande corpo de reguladores para garantir a resolução espacial e temporal da liberação de neurotransmissores. Os reguladores dos SNAREs são numerosos, e muitos deles são conservados ao longo da evolução. Exemplos são os Rabs e seus reguladores diretos (FISCHER et al., 1994). Especificamente, Rab3, Rab5, Rab27 e Rab11 regulam o transporte de vesículas, acoplamento e exocitose de vesículas sinápticas (IZUMI et al., 2003). Muitos dos outros Rabs funcionam no tráfego de membrana em geral e são fortemente conservados.

Apesar da sua abundância em vesículas sinápticas de mamífero, a *synaptophysin* e os outros membros do conjunto de proteínas devem ser dispensáveis para a funcionalidade de vesículas sinápticas. Isto está de acordo com os resultados de um estudo recente em *C. elegans* (ABRAHAM et al., 2006), em que a remoção completa da família de genes *synaptophysin* resultou em propriedades sinápticas normais, sinaptogênese e arquitetura neuronal. Em mamíferos, a *synaptotagmin* pertence a uma grande família de genes de 16 genes. Entre eles, as *synaptotagmins* 1 e 2 são exclusivamente funcionais no ciclo de vida das vesículas sinápticas. No genoma da mosca, existem seis representantes (homólogos próximos de Syt1, Syt4, Syt5, Syt7, Syt9 e Syt12), quatro no mosquito (*A. aegypti* e *A. gambiae*) e quatro em abelha (homólogos próximos de mamíferos Syt1, Syt4, Syt5 e Syt7).

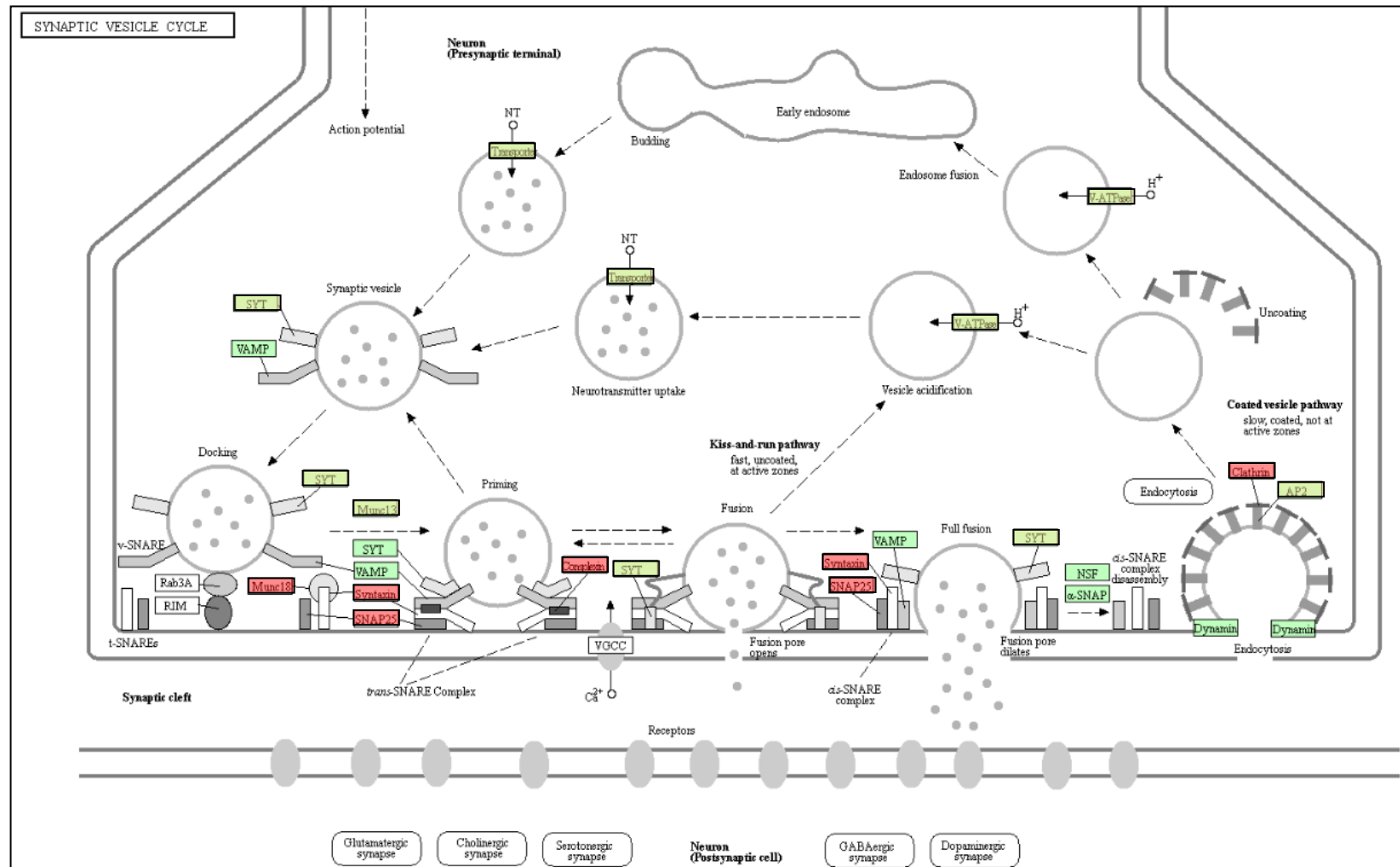
Através dos resultados obtidos pode-se visualizar na Figura 66 as proteínas diferencialmente expressas quando comparados os grupos REP vs grupo Controle e na Figura 67 a comparação do grupo REP-condicionado vs grupo REP.

Na Figura 66 (REP vs controle), observa-se que a proteína relacionada com a endocitose/empacotamento de vesículas sinápticas estava up-regulated (*Dynamin*); o mesmo aconteceu para as proteínas NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fator*) e α -SNAP que estão envolvidas com a transferência de vesículas de membrana de um compartimento de membrana para outro. Além disso, a proteína VAMP (*Vesicle-associated membrane protein 1*), uma

proteína envolvida no acoplamento e / ou fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica também estava com regulação ascendente.

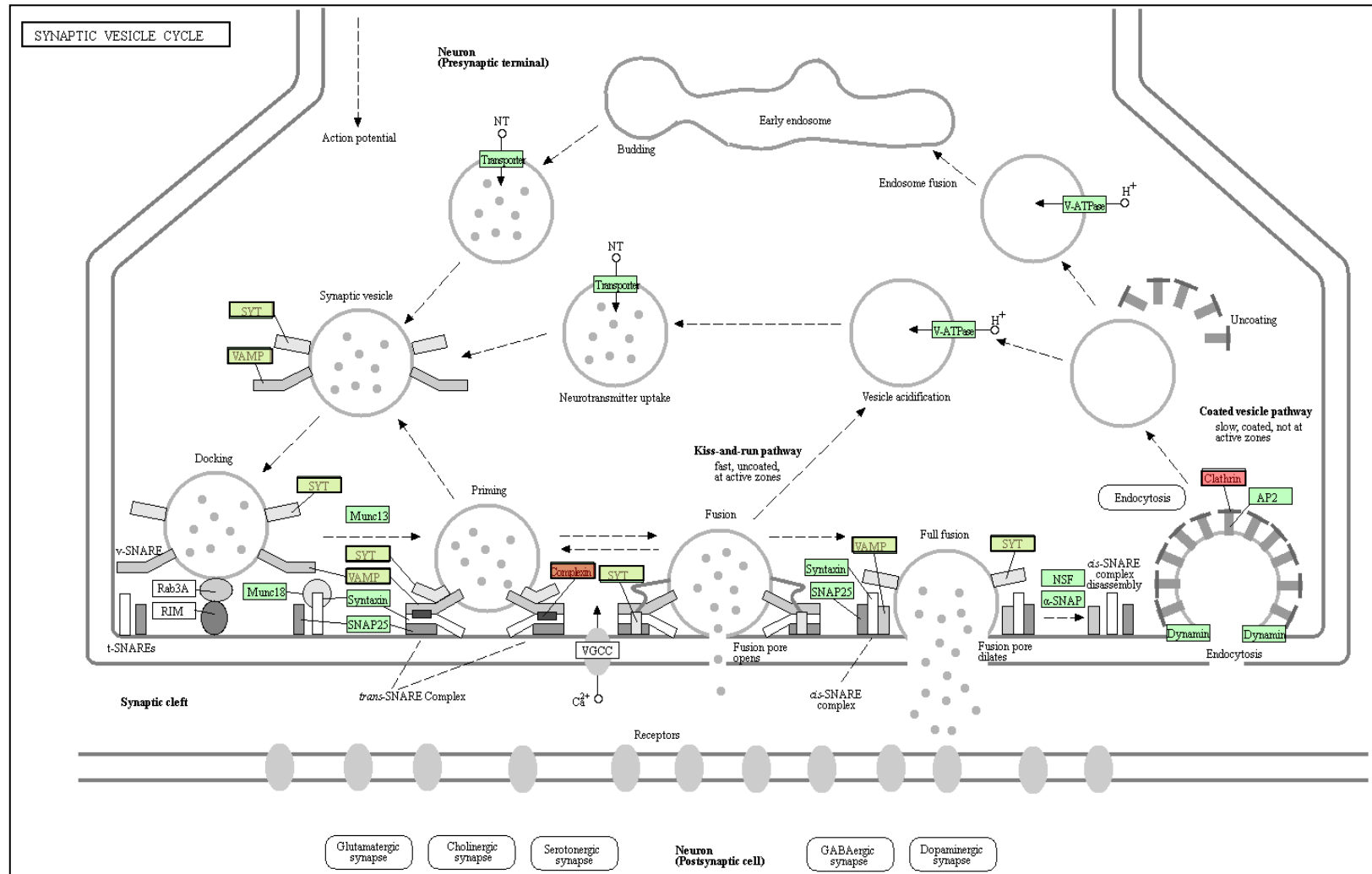
Já na comparação do grupo REP-condicionado com o grupo REP, todas as proteínas identificadas sofreram *up-regulation*, com exceção da proteína *Clathrin*. Levando-se em conta que o o cérebro destes indivíduos estava sob situação de condicionamento olfativo (memória e aprendizagem associativa), acredita-se que uma série de rotas metabólicas foram ativadas (como está sendo mostrado ao longo do texto) exigindo que um grande número de neurotransmissores (transportados por vesículas sinápticas) fossem liberados.

Figura 66. Vesícula sináptica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

Figura 67. Vesícula sináptica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

D. Sinapse Serotonérgica

A serotonina é especialmente famosa por suas contribuições aos sentimentos de bem-estar e felicidade. Mais especificamente, está envolvido nos processos de aprendizagem e memória e, portanto, é crucial para certos comportamentos em todo o reino animal (VLEUGELS et al., 2015). O sistema serotonérgico em vertebrados e invertebrados tem sido foco de estudo há mais de 50 anos. Recentemente, a análise genômica e a descoberta de *splicing* alternativo e expressão diferencial em tecidos aumentaram o conhecimento dos tipos de receptores de serotonina (5-HT). Estudos comparativos podem fornecer *insights* úteis para a ampla variedade de ações mecanicistas de 5-HT responsável por comportamentos regulados ou modificados por 5-HT (WU e COOPER, 2012). No entanto, há poucos estudos em insetos provavelmente devido ao foco na modulação dentro do SNC e falta de evidência de ação substancial de 5-HT em *Drosophila*. Serotonina desempenha um papel crítico na regulação de muitos comportamentos que dependem de olfação e, recentemente, tem havido grande esforço na determinação de como esta molécula funciona *in vivo*.

Recentemente, tem havido grande interesse em como este transmissor influencia o processamento olfativo em organismos modelo incluindo vertebrados e invertebrados (Liu et al., 2012; Petzold et al., 2009; Ranade e Mainen, 2009; Kapoor et al., 2016) Kloppenburg e Mercer, 2008, Gatellier et al., 2004, Dacks et al., 2008, 2009). No entanto, permanece desconhecido como os neurônios serotoninérgicos que inervam o primeiro revezamento olfativo respondem à estimulação de odor e como eles se integram sinapticamente em circuitos locais (ZHANG e GAUDRY, 2016). Wu e Cooper (2012) destacaram algumas das principais descobertas de ações de 5-HT e tipos de receptores associados em NMJs em uma variedade de preparações de invertebrados na esperança de que futuros estudos se baseiem nessa base de conhecimento.

A 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) é uma amina biogênica comum encontrada em vertebrados e invertebrados, bem como em plantas (BLENAU e BAUMANN, 2001; PFUGER e STEVENSON, 2005). O precursor do 5-HT, o triptofano, é muito importante na evolução inicial da vida e talvez a presença precoce do triptofano seja uma razão para que o 5-HT seja potencialmente o primeiro neurotransmissor observado com o desenvolvimento de um sistema nervoso (WU e COOPER, 2012). 5-HT atua como neurotransmissor e neuro-hormônio e como um potente modulador de neurônios e vários tecidos em muitas espécies animais (ROBERTSON e JUORIO, 1976). Geralmente as ações de 5-HT são provocadas por receptores acoplados à proteína G transmembranar (GPCRs), os quais então ativam ou inibem cascatas de mensageiros secundários intracelulares diferentes. Os receptores 5-HT de alguns

organismos foram classificados com base na sequência ou farmacologia (ROEDER et al., 1995; JUORIO e ROBERTSON, 1977); por exemplo, nos vertebrados, 7 famílias (5-HT₁₋₇), 14 subtipos foram identificados, enquanto que em *Drosophila* quatro receptores 5-HT denominados 5-HT_{1Adro}, 5-HT_{1Bdro}, 5-HT_{2dro} e 5-HT_{7dro} foram classificados (PREMONT et al., 2001; ROBERTS e FITZPATRICK, 2013; FITZPATRICK, 1999). Os receptores 5-HT parecem estar presentes nos terminais nervosos pré-sinápticos de invertebrados e nas membranas musculares (WU e COOPER, 2012).

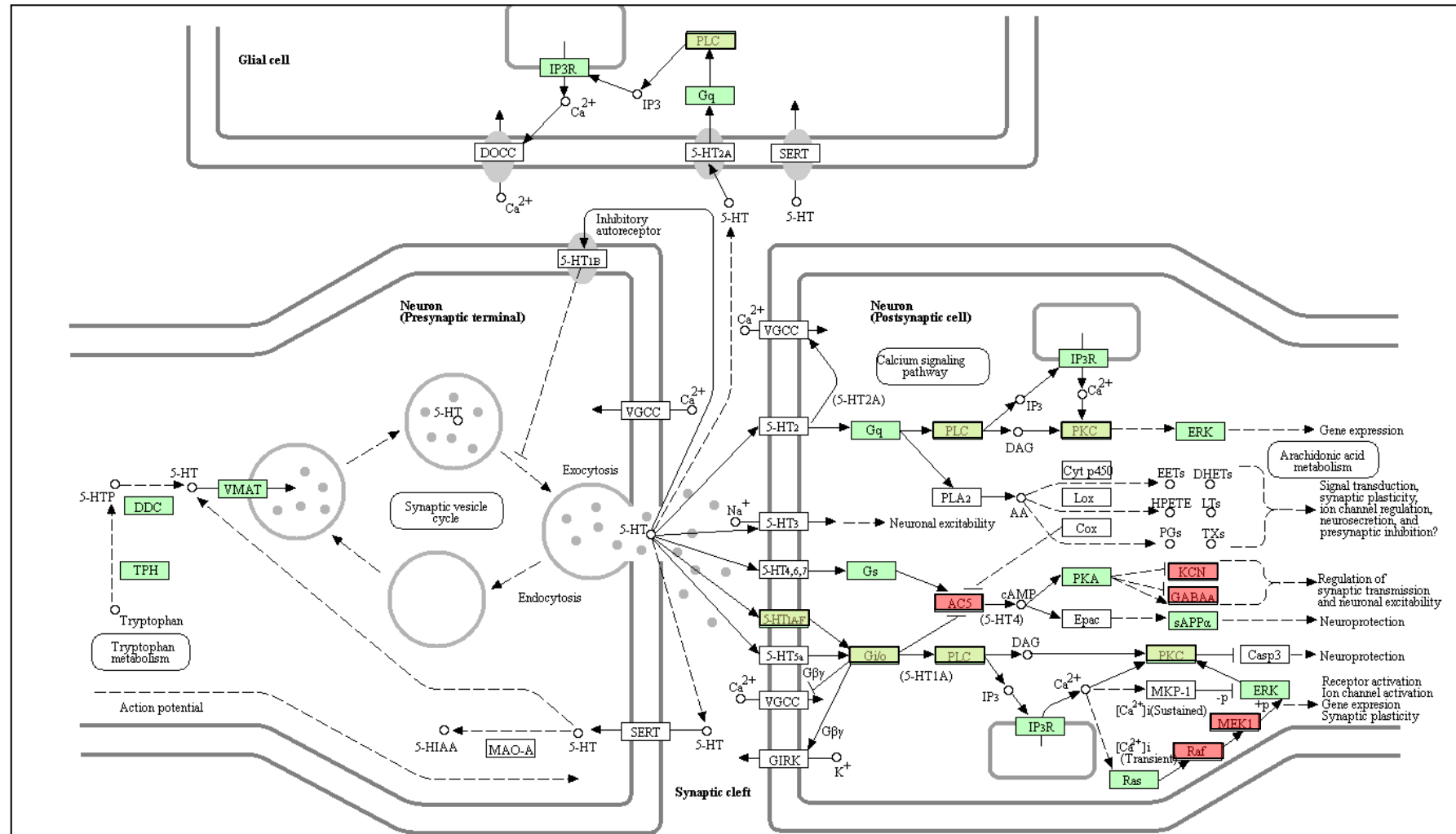
Os receptores 5-HT de insetos são classificados com base em semelhanças de sequência com os seus homólogos em vertebrados. Dentro da mesma classe de receptor, as propriedades de sinalização parecem muito bem mantidas entre insetos e vertebrados, mas suas características farmacológicas variam significativamente. Comparados com os seus homólogos de mamíferos (e outros vertebrados), estão disponíveis relativamente poucos dados sobre as propriedades farmacológicas dos receptores de 5-HT de insetos.

Nas abelhas, o 5-HT aumenta a motilidade do intestino; no entanto, diminui o comportamento de alimentação no SNC (NICHOLS e NICHOLS, 2008). Isto indica que 5-HT altera diferencialmente o comportamento alimentar. Além disso, tem sido demonstrado que se o subtipo do receptor 5-HT_{2A} é bloqueado, há uma diminuição no comportamento alimentar em *D. melanogaster* (ROBERTS e FITZPATRICK, 2013). Além disso, provou-se que tanto o armazenamento quanto a recuperação da memória foram reduzidos quando o 5-HT foi injetado antes do condicionamento (BICKER e MENZEL, 1989; MENZEL et al., 1999; MERCER e MENZEL, 1982).

O resultado das análises no BlastKOALA para este tipo de sinapse pode ser visualizado nas Figura 68 (REP vs controle) e na Figura 69 (REP-condicionado vs REP). Observa-se que dentre as proteínas identificadas na sinapse serotoninérgica poucas são as diferenças entre as comparações dos grupos biológicos, ou seja, a maioria das proteínas estavam up-regulated tanto na comparação do grupo REP vs controle quanto na comparação do grupo REP-condicionado vs grupo REP. Dentre as proteínas *down-regulated* na Figura 67 estavam KCN (*potassium voltage gated channel*), GABA_A, AC5 (*adenylate cyclase 5*) e MEK1 e RAF. MEK1 (*mitogen activated protein kinase 1*) e Raf (*A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), regulam as funções celulares incluindo proliferação, expressão gênica, diferenciação, mitose, sobrevivência celular e apoptose. Já na comparação entre os grupos Rep-condicionado e REP, as proteínas ERK (*mitogen activated protein kinase*) e Raf sofreram regulação descendente; essas proteínas também regulam funções celulares como expressão gênica, sobrevivência celular e apoptose. Vale ressaltar que a sinapse serotoninérgica

se deu através da expressão da proteína 5-HT, previamente descrita como importante para recuperação da memória e a também aprendizado condicionado (BICKER e MENZEL, 1989; MENZEL et al., 1999; MERCER e MENZEL, 1982).

Figura 68. Sinapse serotoninérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.



E. Sinapse Dopaminérgica

A dopamina (DA) é um neurotransmissor de catecolaminas altamente conservado ao longo da evolução (YAMAMOTO e VERNIER, 2011). Em mamíferos, DA desempenha papéis fundamentais na coordenação motora, bem como motivação, recompensa, dependência, aprendizagem e memória. A má regulação da sinalização DA tem sido implicada em uma variedade de distúrbios humanos (FAHR et al., 2011). Mais notavelmente, a perda de neurônios dopaminérgicos (DArgic) é o principal defeito na doença de Parkinson. Insuficiência na sinalização de DA também tem sido implicada em distonias hereditárias, hipersonia, síndrome de movimento periódico dos membros / síndrome das pernas inquietas e distúrbios do humor. Além disso, descobrir os circuitos neuronais precisos no cérebro que são modulados pela DA nos permitirá aprofundar nossa compreensão de como os desequilíbrios desta pequena molécula podem afetar tantas funções neurológicas diferentes (YAMAMOTO e SETO, 2014). Da mesma forma, defeitos na sinalização DA na mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, também têm sido associados a vários defeitos comportamentais. Como a maioria dos genes envolvidos na síntese DA, transporte, secreção e sinalização são conservadas entre as espécies, insetos são um poderoso modelo genético para estudar a regulação da DA sinalização in vivo (YAMAMOTO e SETO, 2014).

Dopamina é sinônimo de recompensa e motivação em mamíferos. No entanto, só recentemente a dopamina tem sido associada ao comportamento associativo em moscas. Burke e colaboradores (2012) mostraram que usando o controle temporal da função neural em *Drosophila*, que apenas a memória apetitiva de curto prazo é reforçada pela octopamina. Além disso, a formação de memória dependente da octopamina requer sinalização através dos neurônios da dopamina. Parte do sinal de octopamina requer o receptor de OAMB tipo alfa-adrenérgico num subconjunto identificado de neurônios de dopamina direcionados para o corpo cogumelar. A octopamina desencadeia um aumento do cálcio intracelular nesses neurônios da dopamina, e sua ativação direta pode substituir o açúcar para formar memória apetitiva, mesmo em moscas que não têm octopamina. A análise do receptor beta-adrenérgico OCTbeta2R revelou que o reforço dependente da octopamina também requer uma interação com os neurônios da dopamina que controlam a motivação apetitiva. Estes dados indicam que o sabor doce envolve um sinal de octopamina distribuído que reforça a memória através de subconjuntos discretos de neurônios de dopamina orientados para o corpo cogumelar. Além disso, conciliam achados anteriores com octopamina e dopamina e sugerem que os sistemas de reforço em moscas são mais semelhantes aos mamíferos do que se pensava anteriormente (BURKE et al., 2012).

Além disso, sabe-se que existem 5 tipos de receptores de dopamina (D1, D2, D3, D4 e D5), todos os quais são receptores acoplados à proteína G. Estes subtipos são divididos em 2 classes: D1R e D2R. D1R são pós-sinápticas e são geralmente consideradas excitatórias. D2R são pré-sinápticos e pós-sinápticos e são inibitórios (MAKOTO et al., 2014).

A conversão de tirosina em L-Dopa é mediada por tirosina hidroxilase (TH), que é codificada pelo gene *pálido* em *Drosophila* (JURGENS et al., 1984), e requer tetrahydrobiopterin (BH4) como um cofator. BH4 é sintetizado a partir de GTP através de três reações químicas, cujo passo de limitação de velocidade é mediado por GTP ciclodrolase I (GTPCH) (THONY et al., 2000). Vários mutantes de GTPCH foram isolados com base na despigmentação cutânea e foram denominados não pigmentados (agora o gene é conhecido como *Punch*) (NUSSLEIN-VOLHARD et al., 1984). O segundo passo da síntese de DA, conversão de L-Dopa em DA, é mediado por dopa decarboxilase (Ddc).

Após DA ser sintetizado no citoplasma, é empacotado em vesículas exocíticas tais como vesículas sinápticas e vesículas de núcleo denso. O transporte de DA através da membrana é mediado por transportadores de monoamina vesicular (VMATs) (GREER et al., 2005). Enquanto os mamíferos têm dois genes codificadores de VMAT expressos de uma forma específica (VMAT1 em células neuroendócrinas, VMAT2 em neurônios), nas moscas têm apenas um gene VMAT. Nos neurônios, a despolarização conduz à secreção de DA principalmente através da exocitose de vesículas contendo DA em sítios pré-sinápticos.

Após a secreção, DA liga-se aos seus receptores na célula pós-sináptica. Semelhante aos seres humanos, os receptores semelhantes a D1 atuam através da ativação da via de AMPc, enquanto que os receptores de tipo D2 inibem esta via. Portanto, o efeito da DA em um neurônio pós-sináptico específico depende do tipo de receptor DA que é expresso. Após a sinalização, a DA precisa ser eliminada da fenda sináptica para manter os níveis adequados de sinalização no cérebro. Um mecanismo é retomar DA em neurônios pré-sinápticos através do transportador DAT (PORZGEN et al., 2001). Além da reabsorção direta de DA por neurônio DArgic, a *Drosophila* também pode reciclar DA através de células gliais (SUH e JACKSON et al., 2007).

Aprendizagem e memória por meio de DA também foi mostrado para desempenhar vários papéis fundamentais na aprendizagem e memória em *Drosophila* (WADELL, 2010). As moscas podem ser treinadas para aprender e lembrar-se de sinais aversivos e apetitosos. Enquanto a maioria dos estudos concorda que a DA é necessária para a aquisição da memória aversiva, o papel da DA na aquisição da memória apetitiva tem sido debatido (TEMPEL et al., 1984; SELCHO et al., 2009; SCHWAERZEL et al., 2003 e HONJO et al., 2009). Ambos

os níveis aumentados e reduzidos de DA têm demonstrado afetar negativamente a retenção de memória, sugerindo que a dosagem ótima ou a regulação espacial temporária da DA é crítica (ZHANG et al., 2008). Além disso, a sinalização DA é necessária para a remoção de memórias antigas (isto é, o esquecimento) (BERRY et al., 2012). Apesar da complexidade dos efeitos da DA sobre a formação, manutenção e depuração da memória, estudos anatômicos funcionais recentes começaram a revelar populações celulares específicas e redes neuronais que desempenham papéis fundamentais na aprendizagem e na memória (ASO et al., 2010; BERRY et al., 2012).

Segundo Makoto e colaboradores (2014), a dopamina em insetos afeta o reforço e recompensa aprendizagem em conjunto com octopamina. Há evidências que sugerem que os neurônios aminérgicos transmitem sinais de reforço no condicionamento clássico em insetos (HAMMER, 1993; HAMMER e MENZEL, 1998; SCHWAERZEL et al., 2003; UNOKI et al., 2005; UNOKI et al., 2006; NAKATANI et al., 2009; FAROOQUI et al., 2003; RIEMENSPERGER et al., 1960; SCHROLL et al., 2006; VERGOZ et al., 2007) e tem sido sugerido que os neurônios octopaminérgicos e dopaminérgicos transmitem sinais de recompensa e punição, respectivamente. Em abelhas, por exemplo, Hammer e colaboradores (1993) sugeriram que um neurônio putativo OA-érgico, neurônio VUMmx1 (neurônio mediano desacoplado ventral do neuromero maxilar no gânglio subesofágico), medeia as propriedades de reforço do estímulo não-condicionado de sacarose (US) em olfato apetitivo condicionado. No grilo *Gryllus bimaculatus*, demonstrou-se que o bloqueio farmacológico de receptores de octopamina (OA) prejudica o condicionamento de estímulos olfativos, padrões visuais ou cor com recompensa de água, enquanto o bloqueio de receptores de dopamina (DA) prejudica especificamente o condicionamento desses estímulos com penalidade por cloreto de sódio (UNOKI et al., 2005; UNOKI et al., 2006; NAKATANI et al., 2009).

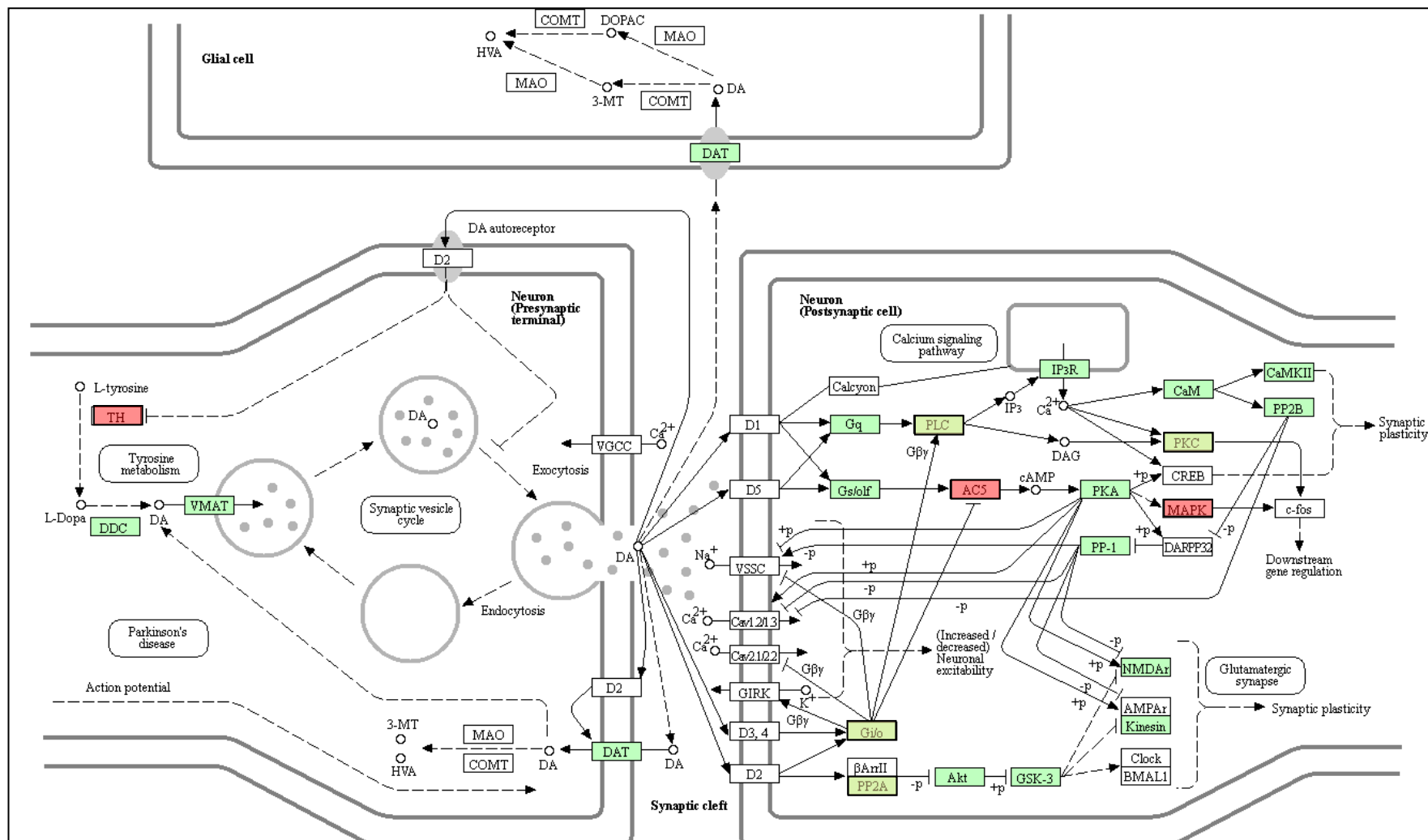
Makoto e colaboradores (2014) mostraram que os antagonistas dos receptores OA e DA prejudicam a recordação da memória apetitiva e aversiva, respectivamente, no condicionamento olfatório e visual do padrão em grilos. Para explicar esse achado, propuseram um novo modelo de condicionamento clássico de insetos que assume o envolvimento de dois traços de memória, um caracterizado como "conexão estímulo-estímulo" (conexão SS) e o outro caracterizado como "conexão estímulo-resposta" (conexão SR) seguindo a terminologia de teóricos que estudam condicionamento clássico em vertebrados superiores, em contraste com modelos anteriores de condicionamento clássico de insetos (SCHWAERZEL et al., 2003) que são caracterizados como modelos de conexão SR. Pela primeira vez, sugeriram que a formação da conexão SS pelo condicionamento e sua

ativação para o *recall* da memória, que têm sido frequentemente referidos como processos cognitivos em relatos de condicionamento clássico em vertebrados, com prioridade sobre o condicionamento clássico em insetos.

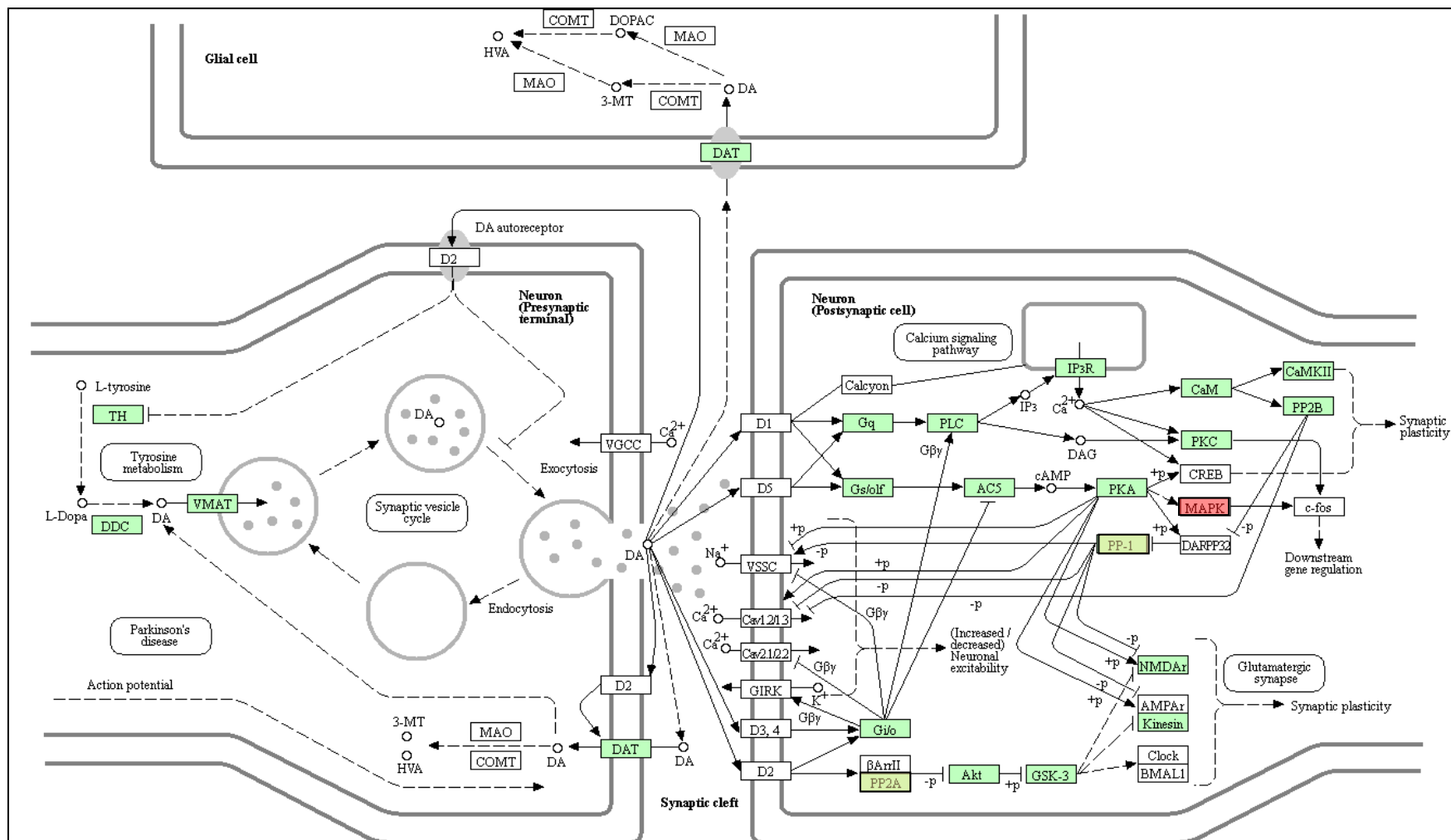
No estudo mais recente sobre essa temática, Awata e colaboradores (2016) desenvolveram um estudo em que grilos foram silenciados para OA1 e apresentaram comprometimento no aprendizado apetitivo com água, mas não no aprendizado aversivo com solução de cloreto de sódio, enquanto que os grilos silenciados com Dop1 apresentaram comprometimento na aprendizagem aversiva, mas não na aprendizagem apetitiva. Grilos Dop2-silenciados mostraram escores normais tanto no aprendizado apetitivo como no aprendizado aversivo. Os resultados indicam que os neurônios de octopamina medeiam o reforço apetitivo via OA1 e que os neurônios de dopamina medeiam o reforço aversivo via Dop1 em grilos, fornecendo evidência decisiva de que os neurotransmissores e receptores que medeiam o reforço apetitivo diferem entre diferentes espécies de insetos (AWATA et al., 2016).

Embora o papel da dopamina seja controverso no grupo de insetos (os receptores que medeiam reforço apetitivo diferem entre espécies), ela certamente desempenha papel-chave nos circuitos neuronais. Os resultados obtidos para a sinapse dopaminérgica podem ser visualizados nas Figuras 70 (REP vs controle) e 71 (REP-condicionado vs REP). Embora nenhum receptor dopaminérgico tenha sido diretamente identificado, nota-se que as proteínas identificadas (diferencialmente) fazem parte das rotas de todas os tipos de dopamina (D1-D5). Para a primeira comparação (REP vs controle) todas as proteínas estavam em regulação ascendente com exceção de TH (*tyrosine hydroxylase*), AC5 e MAPK (*mitogen activated protein kinase 5*). Já para a segunda comparação (REP-condicionado vs REP) apenas a proteína MAPK estava em regulação descendente. NMDAr previamente descrito em literatura como sendo importantes para memória e aprendizagem foi identificado (MILNER et al., 1998; TRAYNELIS et al., 2010) como estando *up-regulated* em ambas as comparações.

Figura 70. Sinapse dopaminérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

F. Sinapse Glutamatérgica

O papel do aminoácido L-glutamato no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos está bem estabelecido. O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no cérebro, mas também desempenha papéis cruciais no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo a diferenciação celular e a formação de sinapses (Danbolt, 2001). Os receptores de glutamato são numerosos e altamente complexos. Mais de 20 receptores de glutamato foram identificados no sistema nervoso central de mamíferos. Eles se dividem em duas categorias principais: ionotrópicos (voltagem sensível) e metabotrópicos (ligante sensível) (SI et al., 2004). Cada receptor ionotrópico ou metabotrópico tem três tipos, dependendo da especificidade de ligação, permeabilidade iônica, propriedades de condutância e outros fatores. Cada tipo tem também vários subtipos (KEGG).

Os receptores ionotrópicos são de ação rápida e, uma vez abertos, podem produzir grandes alterações no fluxo de corrente mesmo se a diferença de tensão através da membrana for pequena. Depois de o glutamato se ligar a um receptor ionotrópico, o canal do receptor sofre uma alteração conformacional para permitir um influxo imediato de sódio extracelular entre outros íons e um efluxo de íons de potássio. Isto desencadeia a despolarização da membrana na célula pós-sináptica suficiente para induzir a transmissão do sinal. Um dos principais receptores ionotrópicos de glutamato, o N-metil D-aspartato (NMDA), é permeável aos íons de cálcio mais do que para íons sódio e potássio; o cálcio têm efeitos benéficos e tóxicos. O receptor NMDA é incomum porque é um detector de coincidência; para que o canal se abra, o glutamato deve ligar-se ao receptor e a célula pós-sináptica deve ser despolarizada porque o canal é bloqueado pelo magnésio a níveis fisiológicos e só se abre quando a célula é despolarizada (MITRI et al., 2004).

Os receptores metabotrópicos de glutamato são de ação mais lenta. Eles exercem os seus efeitos indiretamente, tipicamente através da expressão de genes e da síntese de proteínas. Esses efeitos são muitas vezes para aumentar a excitabilidade das células de glutamato, para regular o grau de neurotransmissão e para contribuir para a plasticidade sináptica (Lesage e Steckler, 2010). Uma vez que o glutamato se liga a um receptor metabotrópico, a ligação ativa uma proteína G ligada à membrana pós-sináptica, a qual, por sua vez, ativa um segundo sistema de mensageiros que abre um canal de membrana para a transmissão de sinal. A ativação da proteína também desencadeia alterações funcionais no citoplasma, culminando na expressão gênica e na síntese protéica. Existem três grandes grupos de receptores metabotrópicos de glutamato, distinguidos pelas suas propriedades farmacológicas e de transdução de sinal (MITRI et al., 2004).

Os receptores metabotrópicos do Grupo I são amplamente expressos na membrana pós-sináptica. Eles têm sido implicados em problemas com aprendizagem e memória, dependência, regulação motora e síndrome do X Frágil (NISWENDER e CONN, 2010). Os receptores metabotrópicos do Grupo II estão situados não apenas em células pós-sinápticas, mas também em células pré-sinápticas, possivelmente para suprimir a transmissão de glutamato (SWANSON et al., 2005). Sua localização dual pode permitir que eles exerçam um maior grau de modulação da sinalização do glutamato (LESAGE e STECKLER, 2010). Os receptores metabotrópicos do Grupo III, como o grupo II, são pré-sinápticos e inibem a liberação de neurotransmissores (SWANSON et al., 2005).

O glutamato é embalado em vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico. Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato atua sobre os receptores de glutamato ionotrópicos pós-sinápticos (iGluRs) para mediar a transmissão sináptica excitatória rápida. O glutamato também pode atuar sobre os receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) e exercer uma variedade de efeitos moduladores através do seu acoplamento às proteínas G, como citado anteriormente (KEGG). Após sua ação nesses receptores, o glutamato pode ser removido da fenda sináptica por EAATs localizados no terminal pré-sináptico, células gliais vizinhas ou o neurônio pós-sináptico. Na glia, o glutamato é convertido em glutamina, que é então transportada de volta para o terminal pré-sináptico e convertida de volta para glutamato (KEGG).

Sabe-se que a força da sinapse glutamatérgica é controlada, em grande medida, pelo número de receptores de glutamato pós-sináptico. Eles são como um acelerador para o fluxo de informações. Se houver mais receptores, a sinapse é mais forte. Se houver menos receptores, a sinapse é mais fraca. A abundância do receptor de glutamato controla o fluxo de informação no cérebro.

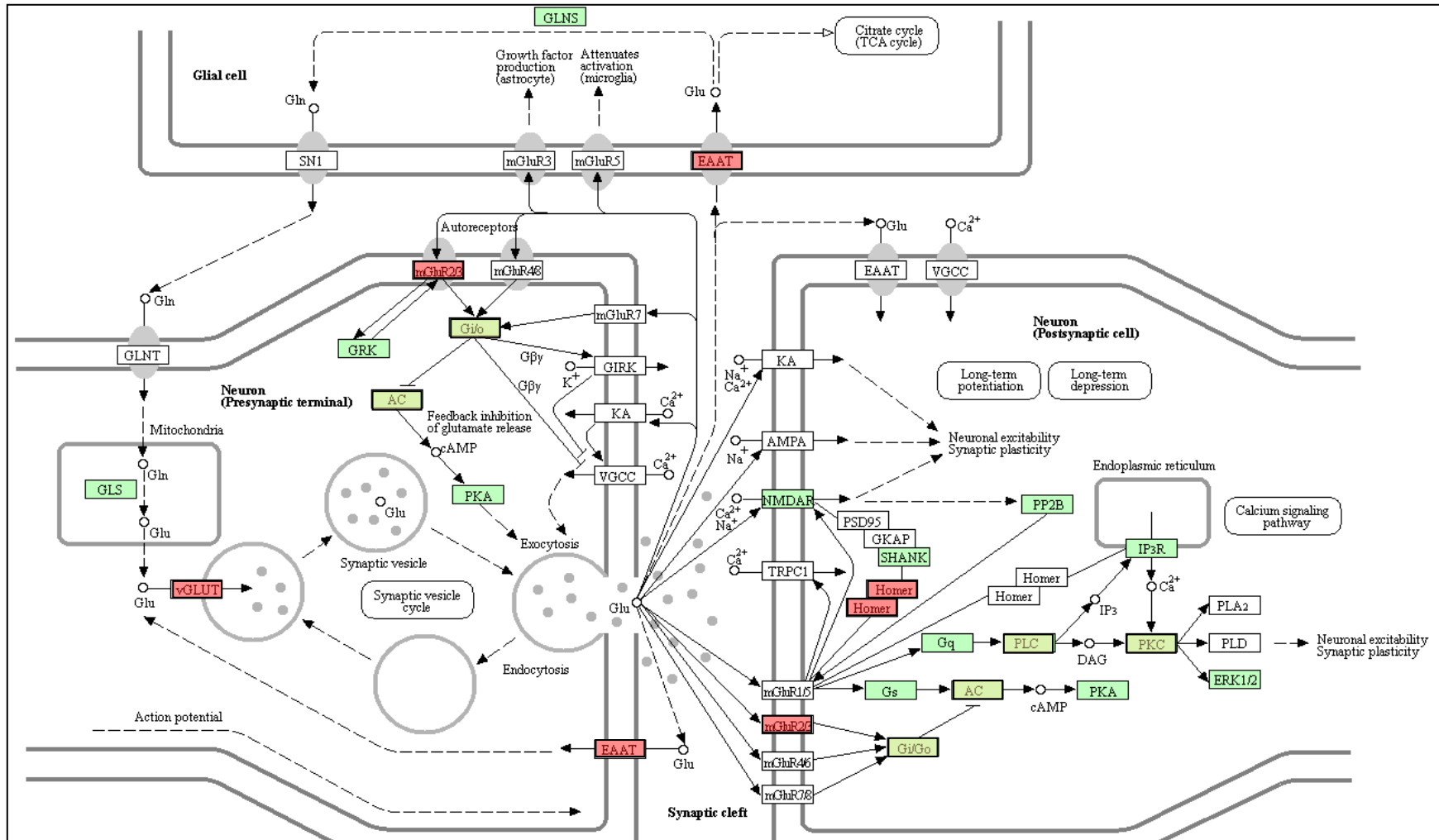
Agindo através de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), o glutamato está integralmente envolvido na obtenção de alterações persistentes na função sináptica resultando em aprendizagem e memória (MILNER et al., 1998). Por outro lado, o envolvimento do glutamato em funções específicas do cérebro em insetos e outros invertebrados é pouco compreendido e controverso (KUCHARSKI et al., 2000; MALESZKA et al., 2000). Porém, concentrações elevadas de glutamato, que aumentam e diminuem com a idade, foram encontradas nos cérebros das abelhas (FUCHS et al., 1989). Verificou-se também que as injeções durante pré-treinamento de um inibidor transportador de glutamato L-trans-2,4-PDC (dicarboxilato de Ltrans-2,4-pirrolidina) prejudicam a memória olfativa associativa a longo prazo (24 h) em abelhas (MALESZKA et al., 2000).

Si e colaboradores (2004) induziram o déficit de memória injetando indivíduos com um inibidor de transportador de glutamato, L-trans-2,4-PDC (L-trans-2,4-pirrolidina dicarboxilato), que prejudica a memória de longo prazo (24 h), mas não de curto-prazo (1 h) em abelhas. Mostrou-se também que a amnésia induzida por L-trans-2,4-PDC é "resgatada" pela *memantin* injetada antes do treinamento, ou antes do teste, sugerindo que a *memantin* restabelece a memória ao invés da formação ou do armazenamento da memória. Quando injetado sozinho, a *memantin* tem um leve efeito facilitador na memória. Já em Mitri e colaboradores (2004) foi relatado a identificação de um novo receptor homólogo a mGluRs encontrados em genomas de *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* e *Drosophila melanogaster* e chamados AmXR, HBmXR e DmXR, respectivamente (grupo mXRs).

Os resultados obtidos para a sinapse glutamatérgica podem ser visualizados na Figura 72 (REP vs controle) e na Figura 73 (REP-condicionado vs REP).

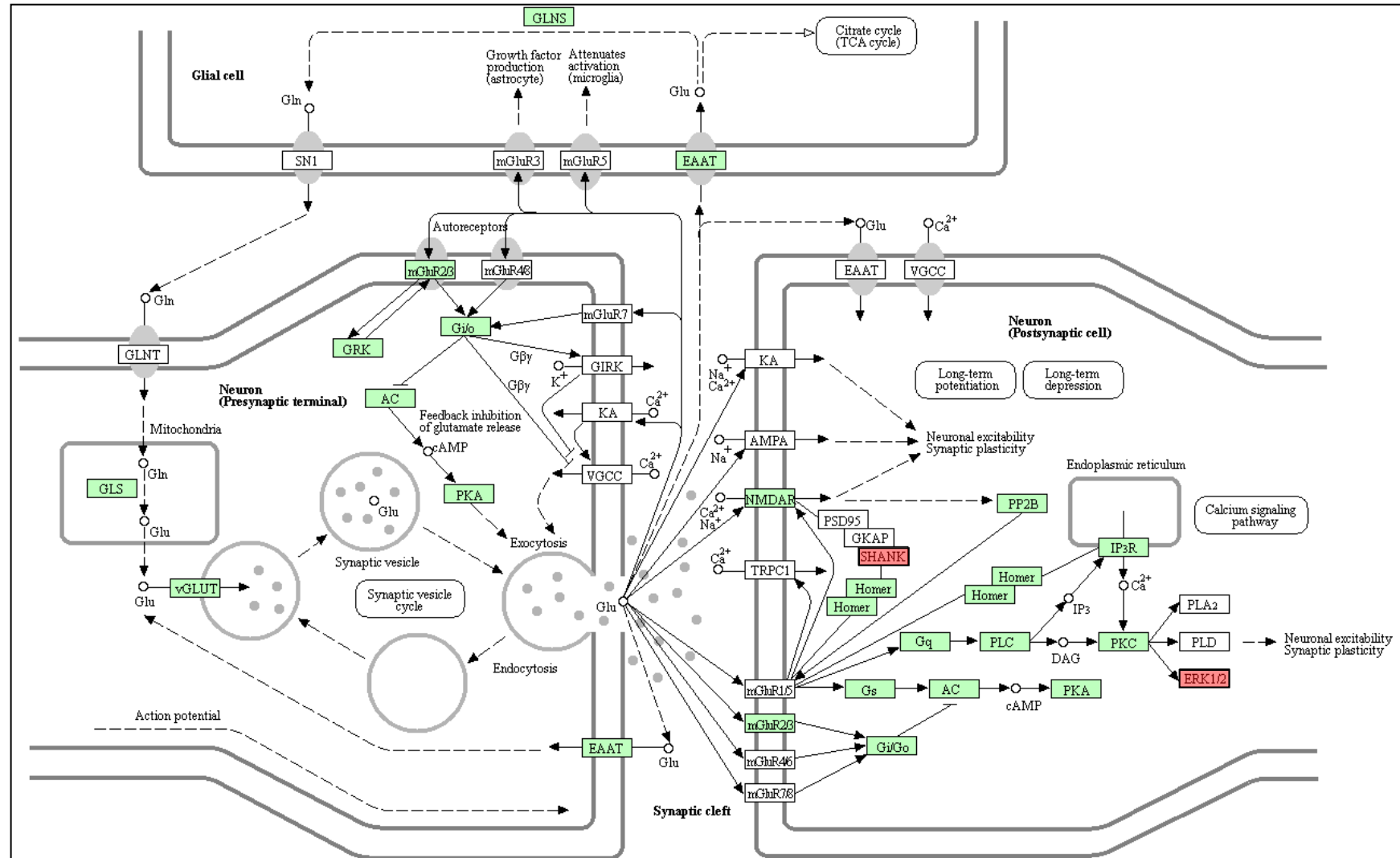
Na comparação do grupo REP vs controle, apenas as proteínas EAAT (*glial glutamate transporter*), mGluR2/3 (*metabotropic glutamate receptor 2/3*), vGLUT (*solute carrier*) e Homer (*scaffolding protein*) foram *down-regulated*. Sendo assim, dois transportadores de glutamato e um receptor sofreram regulação descendente. A sinapse glutamatérgica parece ocorrer através de NMDAR neste grupo. Já para a comparação REP-condicionado e REP, apenas as proteínas SHANK (*SH3 ankyrin domain*) e ERK 1/2 (*mitogen activated protein kinase1/2*) estavam *down-regulated*. Neste grupo, a sinapse glutamatérgica parece ocorrer tanto por NMDAR quanto por mGluR 2/3. Pensa-se que SHANK pode desempenhar um papel na sinaptogênese ligando receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) a um pool existente de receptores NMDA (NMDAR), ligando-se ao NMDAR através do PSD-95 e aos mGluR através de Homer (BOECKERS et al., 2002).

Figura 72. Sinapse glutamatérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

Figura 73. Sinapse glutamatérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated* e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

G. Sinapse GABAérgica

Ácido gamma-aminobutírico (geralmente abreviado como GABA) com fórmula química $C_4H_9NO_2$, e Massa Molar 103,12 g / mol é um neurotransmissor inibitório encontrado no sistema nervoso de espécies amplamente divergentes. É o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central e também na retina. GABA é um aminoácido, mas não é encontrado em proteínas. Embora alguns GABA podem ser encontrados em células de ilhotas pancreáticas e rim, não há quantidades significativas de GABA em tecidos de mamíferos que não nos tecidos do sistema nervoso.

Receptores para o ácido 4-aminobutírico (GABA) foram identificados em sistemas nervoso central e periférico de vários filos de invertebrados. Grande parte da informação derivada de estudos fisiológicos e bioquímicos em receptores de GABA de insetos relaciona-se com canais de cloreto GABA-gated que mostram algumas semelhanças com receptores de $GABA_A$ em vertebrados. A ativação agonista de tais receptores de GABA de insetos conduz a um aumento rápido, sensível à *picrotoxin* na condutância do íon cloreto através da membrana celular. Em insetos, as respostas ao GABA podem ser moduladas por certos benzodiazepínicos e barbitúricos. No entanto, estudos recentes detectaram uma série de diferenças farmacológicas notáveis entre os canais de cloreto GABA-gated de insetos e vertebrados (ANTHONY et al., 1993).

Se o GABA é excitatório ou inibitório depende da direção (dentro ou fora da célula) e da magnitude das correntes iônicas controladas pelo receptor $GABA_A$. Quando a corrente iônica positiva líquida é dirigida para a célula, o GABA é excitatório, quando a corrente positiva líquida é dirigida para fora da célula, o GABA é inibitório. Um interruptor de desenvolvimento na maquinaria molecular que controla a polaridade desta corrente é responsável pelas mudanças no papel funcional de GABA entre os estágios neonatal e adulto (HOSIE et al., 1997).

Estudos de ligação a receptores também demonstraram diferenças entre os locais de ligação de receptores de insetos e vertebrados. As moléculas de receptor de GABA de inseto são locais alvo importantes para várias classes quimicamente distintas de moléculas com caráter inseticida. Caracterizando-se estas propriedades farmacológicas, pode ser possível explorar as diferenças entre os receptores de GABA dos vertebrados e dos insetos no desenho racional de novos agentes de controle de pragas que sejam mais seletivos (ANTHONY et al., 1993).

A recente aplicação das poderosas técnicas de biologia molecular revelou uma diversidade de subunidades de receptores de $GABA_A$ em vertebrados e as respectivas

isoformas que podem montar *in vivo* para formar uma multiplicidade de subtipos de receptores. A clonagem molecular de subunidades de receptor de GABA de inseto não só melhorará a nossa compreensão da diversidade de receptores de neurotransmissores de invertebrados como também permitirá a identificação precisa dos locais de ação de agentes de controle de pragas (HOSIE et al., 1997).

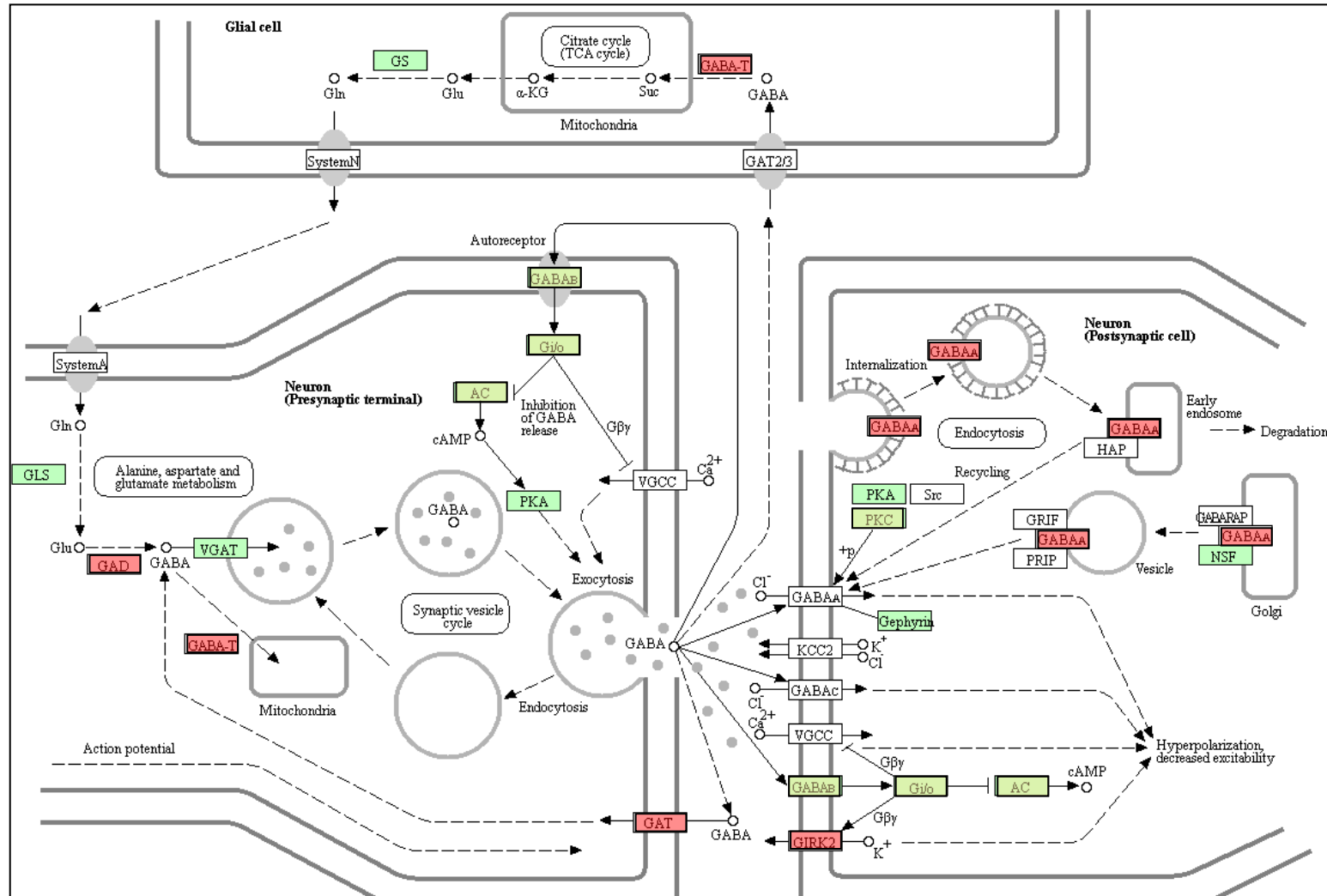
Embora os receptores GABA de insetos e vertebrados compartilhem uma série de semelhanças estruturais e funcionais, a sua farmacologia difere em vários aspectos. GABA exibe ações excitatórias em insetos, mediação da ativação muscular em sinapses entre os nervos e células musculares, bem como a estimulação de certas glândulas. Pensa-se que a inibição sináptica GABAérgica desempenha um papel crítico no processamento olfatório no lóbulo antenal e no bulbo olfatório. Os receptores GABA_A formam respostas de odor PN durante a fase inicial de respostas ao odor, os receptores GABA_B mediam a inibição evocada por odor em escalas de tempo mais longas. Os padrões de inibição mediada por GABA_B, induzida por odor, diferem entre os glomérulos e entre os odores (ANTHONY et al., 1993).

Um relato interessante, evolutivamente, é feito em Zhiheng e colaboradores (2012) a respeito da evolução e receptores GABA e glutamato. GABA e glutamato atuam como neurotransmissores inibitórios e excitatórios, respectivamente, embora exibam funções opostas em algumas espécies especiais ou em alguns tecidos especiais, como o GABA em nematóides e glutamato na mosca da fruta e nematoides (ANTHONY et al., 1993). Verificou-se que os casos excepcionais apareciam principalmente em invertebrados. Suas diversas funções dependem da evolução refinada de seus receptores, que se tornam multiformes e mais elaborados. Ao contrário dos vertebrados nos quais existe um sistema de equilíbrio de GABA/glutamato mediado por GABA e proteínas de transporte de glutamato, em invertebrados o equilíbrio pode ser regulado pelos receptores especializados. No entanto, o mecanismo regulatório e seu destino evolutivo permanecem uma questão em aberto. Um exemplo particularmente interessante é o receptor GluCl específico para invertebrados, que evoluiu a partir do receptor GABA e funciona como um receptor de glutamato excepcionalmente inibitório (ZHIHENG et al., 2012).

Os resultados obtidos para a sinapse GABAérgica podem ser visualizados na Figura 74 (REP vs controle) e na Figura 75 (REP-condicionado vs REP). Para este tipo de sinapse, observou-se que na comparação REP vs controle todas as proteínas, com exceção de NSF, PKA, gephyrin, GLS e VGAT, todas foram *down-regulated*. Sugere-se que a sinapse GABAérgica não seja importante para o reconhecimento da solução de sacarose. De forma completamente oposta, todas as proteínas diferencialmente expressas na comparação REP-

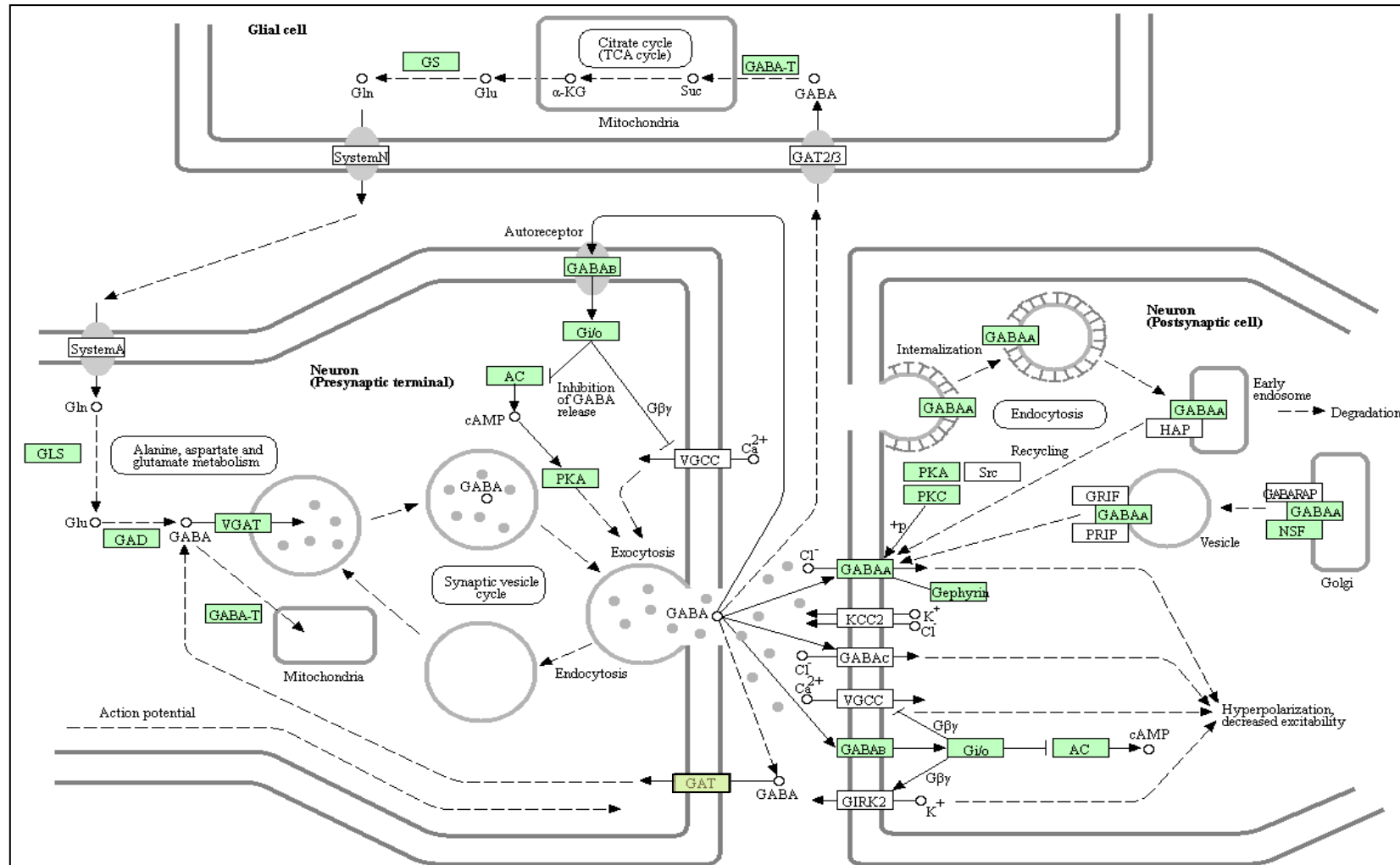
condicionado vs REP apresentaram *up-regulation*. Receptores GABA e proteínas envolvidas com seu processamento biológico parecem estar diretamente ligadas à memória associativa.

Figura 74. Sinapse GABAérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

Figura 75. Sinapse GABAérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

H. Sinapse Colinérgica

Um receptor colinérgico (AChR) é uma proteína integral de membrana que gera uma resposta a partir de uma molécula de acetilcolina. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso central (e também periférico, autônomo e entérico). No CNS, ACh facilita muitas funções, tais como aprendizagem, memória, atenção e controle motor. Quando liberado na fenda sináptica, a ACh liga-se a dois tipos distintos de receptores: receptores de acetilcolina nicotínicos iononotrópicos (nAChR) e receptores metabotrópicos de acetilcolina muscarínicos (mAChRs). A ativação do nAChR pela ACh leva ao rápido influxo de Na^+ e Ca^{2+} e subsequente despolarização celular. A ativação de mAChRs é relativamente lenta (milisegundos a segundos) e, dependendo dos subtipos presentes (M1-M5), eles alteram diretamente a homeostase celular da fosfolipase C, inositol trisfosfato, cAMP e cálcio livre. Na fenda, a ACh também pode ser hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato. A colina derivada da hidrólise de ACh é recuperada por um transportador de colina de alta afinidade pré-sináptica (CHT) (KEGG).

Os nAChRs estão envolvidos em uma ampla gama de processos fisiopatológicos, como epilepsia, dor e uma ampla gama de distúrbios neurodegenerativos e psiquiátricos. Além disso, são os locais alvo de inseticidas neonicotinóides que são conhecidos por atuarem como agonistas nicotínicos, causando envenenamento grave em insetos e em mamíferos (STEEVE e TRICOIRE, 2011).

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) dos mamíferos possuem pelo menos duas subfamílias, ocorrendo nas fibras musculares nas sinapses neuromusculares e nos neurônios nos gânglios periféricos e no cérebro. Em mamíferos, estudos anteriores indicam que os receptores nicotínicos neuronais podem ser pré-sinápticos ou pós-sinápticos (BROWN et al., 1984; HAMILL et al., 1986). Esta hipótese foi confirmada por vários estudos que mostram que ao nível sináptico, os receptores nicotínicos estavam associados com excitação pós-sináptica e despolarização da membrana, enquanto no sítio pré-sináptico, a ativação de nAChRs poderia produzir excitação ou inibição indiretamente através da liberação de transmissores ou moduladores endógenos (STEEVE e TRICOIRE, 2011). A disponibilidade de sequências de cDNA que codificam para as subunidades nAChR neuronais tornou possível a realização de estudos sobre a distribuição, a composição de sua subunidade (SIMMONS e MORLEY, 1998; ARROYO et al., 1999 e BITNER e NIKKEL, 2002) e o perfil farmacológico dos subtipos nAChR de vertebrados (PAPKE et al., 2007; BUISSON e BERTRAD, 2001; VIRGINIO et al., 2002). Dez subunidades de nAChR foram identificadas

em insetos (*Drosophila melanogaster*) (D α 1-D α 7 e D β 1-D β 3) e um número similar foi identificado em outras espécies de insetos (MILLER, 2007; JONES, 2007).

Apesar de compartilharem muitas propriedades farmacológicas e fisiológicas com os nAChRs neuronais de mamíferos, os nAChRs de insetos têm diferenças acentuadas na sua sensibilidade a inseticidas, distribuição sináptica e propriedades funcionais. Além dos receptores pós-sinápticos clássicos para ACh, nada se sabe sobre os nAChRs pré-sinápticos exceto que esses receptores poderiam mediar a liberação de ACh ou modular sua liberação (STEEVE e TRICOIRE, 2011).

Estudos sobre a farmacologia da transmissão sináptica colinérgica em insetos centraram-se em grande parte nas conexões entre neurônios sensoriais aferentes com interneurônios ou com motoneurônios em vários insetos, como a barata *Periplaneta americana* (CALLEC et al., 1966; CALLEC et al., 1969; CALLEC, 1974 e SATTELLE et al., 1983)]. Demonstrou-se que os neurônios pós-sinápticos possuem receptores com uma farmacologia essencialmente nicotínica: o efeito mais proeminente da ACh é mediado por receptores nicotínicos que geram potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos.

Como a acetilcolinesterase (AChE) hidroliza a acetilcolina, um importante neurotransmissor associado à aprendizagem no cérebro do inseto, passou-se a buscar mudanças na expressão da AChE no cérebro durante o desenvolvimento comportamental da abelha. Aspectos bioquímicos da AChE foram semelhantes em forrageiras e e cuidadoras. Contudo, a atividade catalítica da AChE foi significativamente menor nas forrageiras. A clonagem de DNAC de AChE permitiu a análise de RNAm, o que demonstrou que a diminuição relacionada com o forrageiro na actividade de AChE estava associada com diminuição de mRNA de AChE. Isto foi particularmente evidente nos corpos cogumelares, uma região do cérebro conhecida por estar envolvida com aprendizagem olfativa e visual e memória. Além disso, o tratamento com o metrifonato (inibidor de colinesterase) melhorou o desempenho das abelhas em ensaio de aprendizagem olfativa. Estas descobertas demonstram haver *down-regulation* de AChE no cérebro da abelha, e sugerem que esta plasticidade genômica pode contribuir para a capacidade de aprendizado em abelhas forrageiras (SHAPIRA et al., 2001).

Enquanto a plasticidade-chave ocorre em sinapses glutamatérgicas em mamíferos, a neuroquímica do corpo de cogumelo armazenador de memória em células de Kenyon é desconhecida. Barsted e colaboradores (2016) demonstraram que a acetilcolina (ACh) em *Drosophila* tem um importante papel no sistema nervoso. As células de Kenyon expressam as proteínas ACh, ChAT e VAcHT, e a redução da expressão dessas proteínas prejudica o

comportamento olfativo. A aplicação de ACh local, ou ativação direta de células de Kenyon, evoca atividade em neurônios *output* do corpo de cogumelo (MBONs). A ativação de MBON depende da expressão de VACHT em células de Kenyon e é bloqueada pelo receptor de ACh. Além disso, a redução da expressão da subunidade do receptor ACh nicotínico em MBONs compromete a ativação por odor e redireciona o comportamento de odor. Por fim, a corelease peptidérgica aumenta as respostas evocadas por ACh em MBONs, sugerindo uma interação entre os transmissores de ação rápida e retardada. Portanto, memórias olfativas em *Drosophila* são provavelmente armazenadas como plasticidade das sinapses colinérgicas (BARNSTEDT et al., 2016).

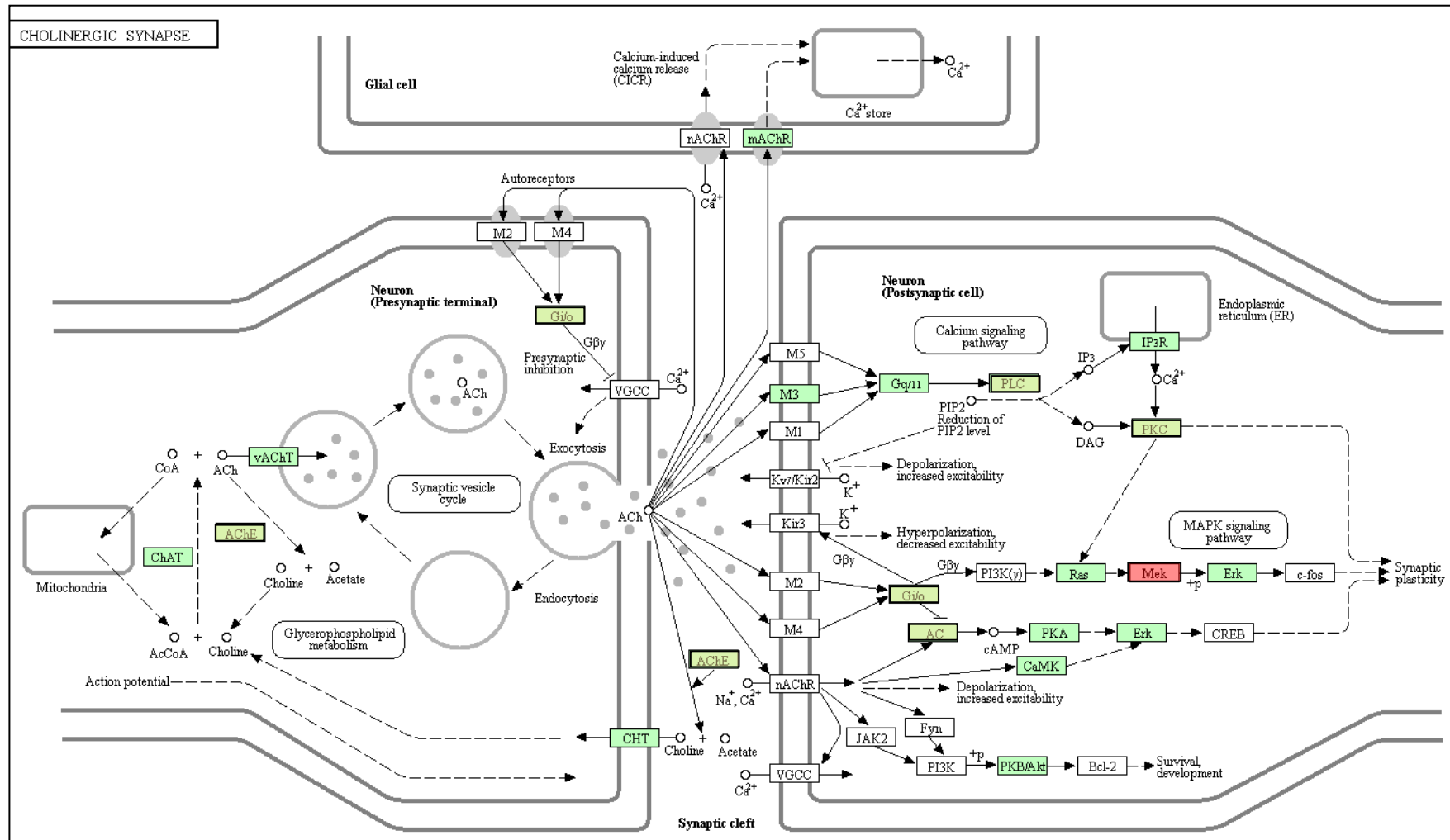
Apesar das décadas de trabalho na aprendizagem e na memória e em outras funções do MB, a identidade do neurotransmissor de ação rápida que é liberado dos KCs permaneceu desconhecida. Muito do cérebro do inseto foi considerado ser colinérgico, mas acreditava-se que o MB era diferente. Estudos histológicos concluíram que o MB não expressava ChAT, mas que subconjuntos de KCs continham glutamato, aspartato ou taurina. Contudo, evidências conclusivas de que essas moléculas são liberadas como neurotransmissores não se materializaram (BARNSTEDT et al., 2016).

Barnstedt e colaboradores (2016) mostraram que (i) As KCs expressam as proteínas ChAT e VACHT que sintetizam e empacotam ACh em vesículas sinápticas, e a expressão destes genes é necessária para o comportamento aprendido dependente de MB; (ii) a estimulação de KC desencadeia respostas em MBONs que são semelhantes às evocadas por aplicação ACh direta; (iii) a redução do processamento de ACh em KCs prejudica as respostas evocadas por KC em MBONs; (iv) as respostas evocadas por ACh e KC em MBONs são ambas sensíveis ao antagonismo de receptores de ACh nicotínicos e (v) as respostas evocadas por odor em MBONs são atenuadas pela redução da expressão de várias subunidades de receptores de ACh nicotínicos. Tomados em conjunto, estes dados fornecem apoio convincente de que ACh é um neurotransmissor importante liberado por KCs em *Drosophila* (BARNSTEDT et al., 2016).

Os resultados obtidos para a sinapse colinérgica podem ser visualizados na Figura 76 (REP vs controle) e na Figura 77 (REP-condicionado vs REP). Todas as proteínas identificadas em ambas as comparações foram *up-regulated* com exceção de Mek para REP vs controle e com exceção de mAChR, M3 e Erk para REP-condicionado vs REP. Levando-se em conta todas as rotas metabólicas e processos neuronais discutidos até o momento esta é a rota em que um maior número de proteínas está *up-regulated* em REP vs controle, tendo apenas uma única proteína *down-regulated*. Embora apenas os receptores M3 e mAChR

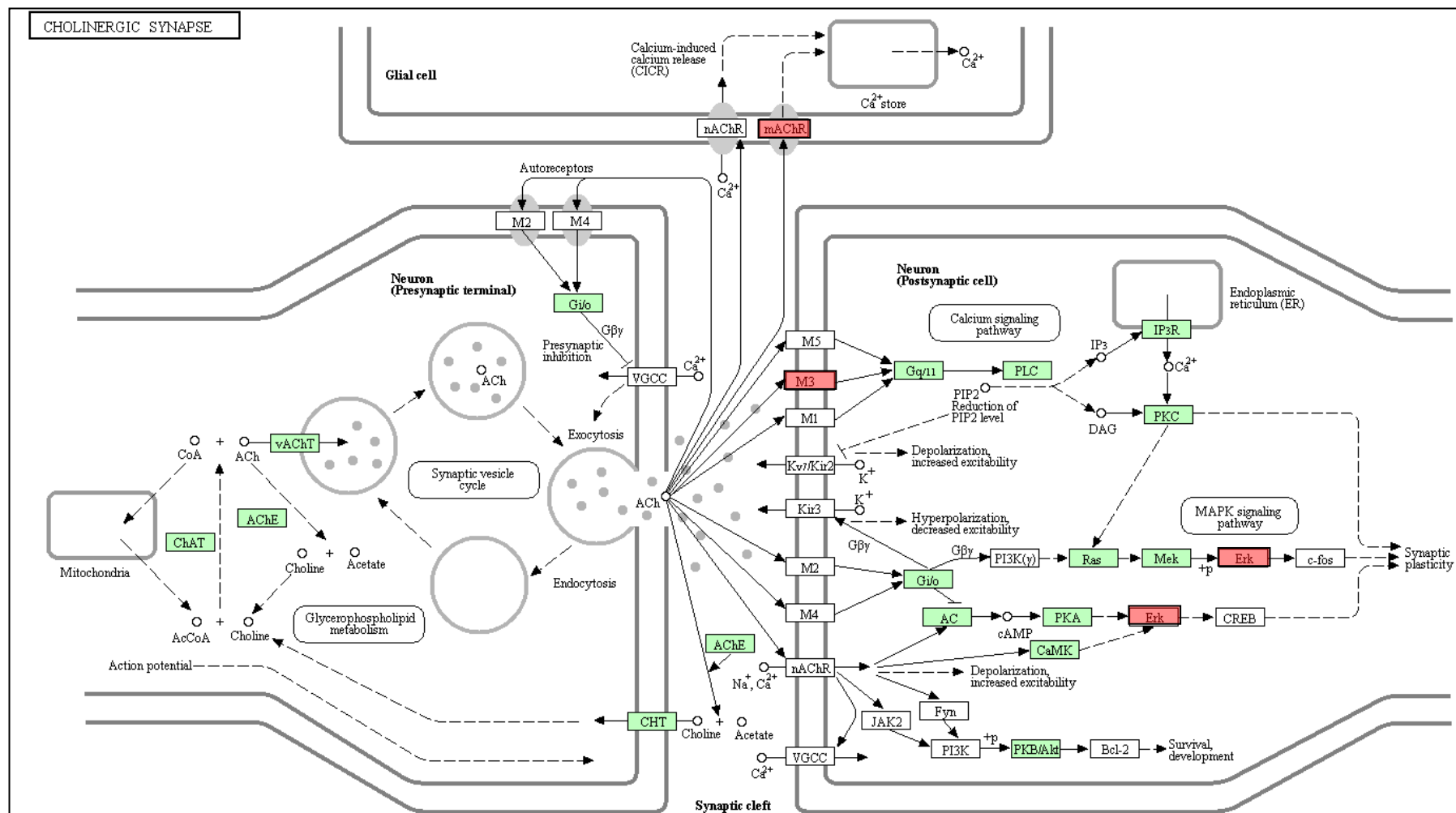
tenham sido identificados e apresentem-se (ambos) *down-regulated* em REP-condicionado vs REP e *up-regulated* em REP vs controle, diferentes fluxos foram identificados, sugerindo-se a participação dos receptores M5, M2, M4 e nAChR no processamento da informação olfativa durante a sinapse colinérgica. Sugere-se que a sinapse colinérgica seja um processo importante na recuperação de uma memória previamente adquirida, mas que também é fundamental para que o processo de memória e aprendizagem se estabeleça, mas não por meio da expressão dos receptores M3 e mAChR.

Figura 76. Sinapse colinérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP ao grupo controle. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated*; Amarelo – proteínas identificadas, mas não classificadas quanto ao padrão de expressão e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

Figura 77. Sinapse colinérgica para as proteínas diferencialmente expressas comparando-se o grupo REP-condicionado ao grupo REP. Vermelho – proteínas *down-regulated*; em Verde – proteínas *up-regulated* e sem coloração – proteínas não identificadas neste estudo.



Fonte: BlastKOALA; adaptado pelo autor, 2017.

10. Conclusões gerais

A comunicação sináptica entre neurônios e células-alvo depende da anatomia especializada e fisiologia das sinapses. A regulação e modulação da liberação do neurotransmissor é a base da transmissão sináptica química. Para que os sistemas nervosos funcionem adequadamente, a eficácia das sinapses é finamente regulada e ajustável para responder às mudanças e exigências (SUDHOF, 2012). Tanto fatores pré e pós-sinápticos podem influenciar a força sináptica. A quantidade de neurotransmissor liberado e a sensibilidade da membrana pós-sináptica são importantes para medir a força sináptica. Cada passo no processo de transmissão sináptica pode ser o alvo de muitos fatores que levam à alteração da força sináptica. Por exemplo, o estado de fosforilação das proteínas SNARE que estão envolvidas no acoplamento das vesículas ou a densidade das zonas ativas onde o transmissor é liberado pode influenciar o número de unidades quânticas liberadas por impulso (mecanismo pré-sináptico) (ANTONUCCI et al., 2016). De forma pós-sináptica, o número de receptores ativos, a resistência pós-sináptica de entrada, a área e a ultraestrutura do retículo sub-sináptico, podem alterar a eficácia da liberação e assim influenciar a força sináptica (SUDHOF, 2012). Todos os processos mencionados acima deixam claro que o funcionamento do sistema nervoso se baseia em uma série de processos altamente complexos, sendo dependente de diversos passos que devem ocorrer em milissegundos.

Analisando as rotas citadas acima, observou-se que tanto o processamento do estímulo olfativo recebido, somente do odor da sacarose, como a associação de um estímulo odorífero (2-octanona) a uma recompensa (solução de sacarose) que leva à formação de memória associativa, dependem não apenas de só uma rota, mas de diversas rotas. Fica claro que se trata de um processo multicomplexo que exige a expressão/síntese de proteínas e a transdução de diferentes sinais.

Correlacionando os processos neuronais descritos em literatura com os resultados aqui observados, diferentes neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato, ácido aminogababútrico (GABA) e serotonina são descritos por se ligarem a proteínas de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, gerando respostas diretas ou indiretas. As catecolaminas (neste caso, dopamina), por sua vez, são conhecidas, entretanto, somente por respostas diretas. Sabe-se que ainda que neurotransmissores devem ser reconhecidos por receptores específicos, que norteiam suas ações nas células pós-sinápticas, mas que também podem ser encontrados receptores pré-sinápticos, com função principal de regular a secreção do neurotransmissor. Nos resultados obtidos observou-se que embora haja atividade das vesículas sinápticas e diferenças na expressão de proteínas relacionadas à vesícula sináptica, parece haver o

processamento/percepção de sinais e não a emissão de sinais por si só, já que em todas as rotas analisadas a expressão das proteínas concentra-se em neurônios pós-sinápticos e não em neurônios pré-sinápticos.

Sabe-se ainda que a ligação entre os neurotransmissores e o sinal intracelular é realizado através da associação com proteínas-G (pequenas proteínas que se ligam e hidrolisam a GTP) ou com as proteínas quinases, ou ainda com o próprio receptor na forma de um canal iônico controlado pelo ligante (por exemplo, o receptor de acetilcolina) (GOODMAN e GILMAN, 1996). Nos resultados obtidos observou-se que, na comparação entre o grupo controle e o grupo REP, que muitas proteínas-G, além de proteínas relacionadas a este complexo (por exemplo, ACIII, G, AC e Golf) apresentaram *down-regulation*. O processamento da informação (neste caso reconhecimento da solução de sacarose) parece não se passar por meio do complexo de proteínas-G. Em contrapartida, na comparação entre o grupo REP-condicionado e o grupo REP, todas as proteínas-G, bem como aquelas relacionadas a este complexo apresentaram-se *up-regulated*, nos permitindo concluir que certamente são importantes para a consolidação da memória olfativa associativa. Nesta comparação observou-se também que as proteínas quinases (por exemplo, PKA, PKC, Akt) apresentaram-se *up-regulated* também, sendo que em diversas rotas este parece o fluxo a ser seguido (por exemplo, sinapse glutamatérgica e sinapse GABAérgica). A fosforilação de proteínas e a ação de proteínas quinases é necessária para a indução de diferentes formas de plasticidade sináptica, incluindo memória em curto e em longo prazo. Neste contexto, várias proteínas quinases desempenham papéis importantes no regulamento da liberação de neurotransmissores (TAKAHASHI et al., 2003).

Outro ponto a se atentar é que inicialmente, existe uma mudança na atividade elétrica de regiões específicas do cérebro como resultado da experiência da aprendizagem (MARTINEZ e DERRICK, 1996). Nesse estágio os neurotransmissores ou neuromoduladores (tais como a acetilcolina, serotonina, glutamato, dentre outros) desempenham funções importantes (HOLSCHER e ROSE, 1992; MARTINEZ e DERRICK, 1996; RICKARD, RIBBS e NG, 1999; WILSON, FLETCHER e SULLIVAN, 2004). Nos resultados obtidos, a sinapse colinérgica (acetilcolina) parece ser de fundamental importância para a recuperação de uma memória previamente adquirida (grupo REP) e neste patamar de comparação, menos importante para o grupo REP-condicionado, em função da *down-regulation* dos receptores M3 e mAChR, embora diversas proteínas tenham sido identificadas em ambas as comparações. Com relação à sinapse serotoninérgica, poucas diferenças foram observadas e elas se limitam, aparentemente, à (i) expressão gênica, já que ERK (*extracellular-signal*

regulated kinase) apresentou-se *down-regulated* na comparação REP-condicionado vs REP e *up-regulated* na comparação REP vs controle; (ii) regulação da transmissão sináptica e excitabilidade neuronal, já que KCN (*potassium voltage gated channel*) e GABA_A apresentaram-se *down-regulated* na comparação Rep vs controle e *up-regulated* na comparação REP-condicionado vs REP. Já para a sinapse glutamatérgica, diferenças interessantes foram observadas. Na comparação entre o grupo REP-condicionado vs grupo REP, todas as proteínas identificadas apresentaram-se *up-regulated*, com exceção de SHANK (*SH3 ankyrin domain*) e ERK 1/2. Já na comparação REP vs controle, observou-se que importantes transportador (EAAT) e seu receptor (mGlu2/3) deste tipo de sinapse apresentaram-se *down-regulated*. Além disso, vGLUT (*solute carrier*) que está diretamente associado à liberação de neurotransmissores através da exocitose em vesículas sinápticas apresentou-se, também, *down-regulated*. Os receptores ionotrópicos de glutamato são divididos em 4 grupos: AMPA, 1 kainato, NMDA e receptores δ , e eles desempenham um papel central na aprendizagem, memória e numerosas doenças neurológicas (TRAYNELIS et al., 2010). Nos resultados obtidos, AMPA não foi identificado e diferenças em termos de expressão não foram observadas para NMDAr, já que em ambos os casos este receptor mostrou-se *up-regulated*.

A ligação dos neurotransmissores com seus respectivos receptores e/ou canais iônicos associados, ativa eventos pré- e pós-sináptico que resultam em modificações nas proteínas na sinapse por processos como a fosforilação via cascata MAPK e através da rota PKA dependente de cAMP (PERUMAL e TAN, 2007). Embora MAPK tenha se apresentado *down-regulated* em ambas as comparações, a rota PKA dependente de cAMP parece ser de fundamental importância em ambas as comparações. Destaca-se que na comparação entre REP-condicionado vs REP, esta rota parece ser especialmente importante na expressão de GABA_A; enquanto que na comparação REP vs controle, esta rota parece ser importante para o fluxo no sentido de Erk. Essas mudanças temporárias na sinapse se tornam mais permanentes através da potenciação de longa duração (LTP) da resposta sináptica, que é o fortalecimento das sinapses com base no padrão de atividade recente dos neurônios. O estabelecimento da memória de longo prazo está associado com alterações mais permanentes na estrutura e no número de sinapses. Tais mudanças permanentes envolvem a síntese de novas proteínas e a montagem de novos circuitos de memória (PERUMAL e TAN, 2007).

Durante décadas, o modelo predominante para memória de longo prazo tem sido mudanças na síntese de proteínas e a transcrição de genes dependente de estímulo (FLAVELL e GREENBERG 2008, MARTIN et al., 2000). Os processos de aprendizagem e memória

requererem uma alteração prolongada das sinapses. Tanto a síntese de macromoléculas quanto a atividade do proteossoma são necessários para a manutenção da memória (DONG et al., 2008, FONSECA et al., 2006, FREY et al., 1993), o que sugere um forte acoplamento da síntese e degradação de proteínas na plasticidade neuronal em relação ao processo de aprendizagem. Levando-se em conta estas afirmações, sugere-se que as rotas mais correlacionadas com o processo de memória associativa (REP-condicionado vs REP) em comparação à REP vs controle sejam a transdução olfativa (todas as proteínas identificadas apresentaram-se *up-regulated*), sinapse dopaminérgica, sinapse glutamatérgica e sinapse GABAérgica. A sinapse colinérgica apresentou resultados interessantes para REP vs controle. Quando comparamos todas as rotas, a síntese protéica é, certamente, mais proeminente na comparação REP-condicionado vs REP.

Embora as análises do BlastKOALA tenham sido utilizadas para a discussão dos resultados obtidos, sabe-se que métodos de validação dos dados de análise proteômica precisam e devem ser aplicados para a confirmação dos resultados obtidos bem como para a melhor compreensão dos mecanismos de processamento de informação e aquisição de memória. Alguns destes métodos, tais como eletroforese nativa de complexos membranares, imunohistoquímica e imunoblotting, estão sendo aplicados por nós ao estudo de proteínas de membrana e receptores neuronais (dados não mostrados), mas estão ainda em desenvolvimento/análise. A aplicação das técnicas de imunohistoquímica e imunoblotting é um desafio, já que existem, até o presente momento, apenas 13 anticorpos imuno-específicos para abelhas (apenas 3 deles são receptores e/ou proteínas de membrana); desta forma, vêm sendo utilizados anticorpos de taxas filogeneticamente próximos a abelhas (tais como *Drosophila*), mas que exigem testes detalhados de imunoespecificidade a fim de garantir resultados confiáveis.

Estão em fase de análise, também, dados de quantificação de espectrometria de massas *label-free* de proteínas de membrana, bem como a análise proteoma citosólico do grupo REP-condicionado.

PARTE IV
MALDI IMAGING

11. MATERIAIS E MÉTODOS

Para auxiliar a compreensão da neurobiologia do cérebro de *A. mellifera* a técnica de MALDI Imaging foi empregada no imageamento molecular das proteínas identificadas e de neuropeptídeos descritos na literatura (BROCKMANN et al., 2009 e BOERJAN et al., 2010).

Em função do grande volume de dados gerados, das diferentes técnicas aplicadas ao estudo do cérebro de abelhas e ao limite de tempo disponível para a defesa desta tese, serão mostrados apenas os dados referentes ao estudo de neuropeptídeos em cérebros de abelhas, comparando-se o grupo controle e o grupo REP.

Vale ressaltar que a técnica de MALDI Imaging foi aplicada ao estudo de proteínas (digestos trípticos) para todos os grupos em questão (controle, REP e REP-condicionado) e as imagens moleculares, bem como a interpretação destes dados será realizada em um futuro próximo. Os dados obtidos, tanto para neuropeptídeos quanto para proteínas, servem como uma biblioteca da distribuição espacial destas moléculas, podendo-se criar imagens para qualquer peptídeo/proteína futuramente identificados.

11.1 Obtenção de cortes de cérebro de *Apis mellifera*

Após o processo de congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer -80°C (por um período inferior a 24 horas), os tecidos frescos de cérebro de abelhas foram seccionados a -20 °C utilizando-se um micrótomo por congelamento (LEICA, CM1850), para a aquisição de cortes de 12 µm 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. Os cortes que foram utilizados para análise por MSI foram depositados em placa metálica (TO-487, Kratos) e então fixados em álcool 70% (v/v) e 90%(v/v), respectivamente, durante um minuto em cada solução.

Para os cortes submetidos à coloração por HE, as lâminas foram submersas em etanol 95%(v/v) por vinte minutos, lavadas com água corrente sem deixar que o material se solte da lâmina e, em seguida, foram submetidas em Hematoxilina por 20 segundos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água corrente deixando descansar em água destilada por aproximadamente 5 minutos. As mesmas foram então submetidas em Eosina por mais 20 segundos e lavadas com água destilada corrente. Ao final do processo, as lâminas

foram submetidas a uma bateria de etanol 95% (v/v) I, II, III, VI e V para a remoção do excesso de corante e em Xilol I, II e III para montagem das lâminas.

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.

Um esquema generalizado da estratégia aplicada pode ser visualizado na Figura 78.

11.2 MALDI Imaging dos neuropeptídeos

Para a análise dos peptídeos descritos em literatura (BROCKMANN et al., 2009 e BOERJAN et al., 2010) e sua correlação com o comportamento ensaiado (REP) foi utilizado a deposição automática da matriz contendo 10 mg/mL de ácido cinâmico em solução de acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v) por meio da impressora química ChIP-1000 (Shimadzu). O volume total de matriz depositada foi de 10 nL, depositado diretamente no tecido. Os espectros de MALDI MS foram obtidos no modo *reflectron* positivo por um MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu) equipado com um laser SmartBeam controlado pelo software Launchpad v2.8 (Shimadzu).

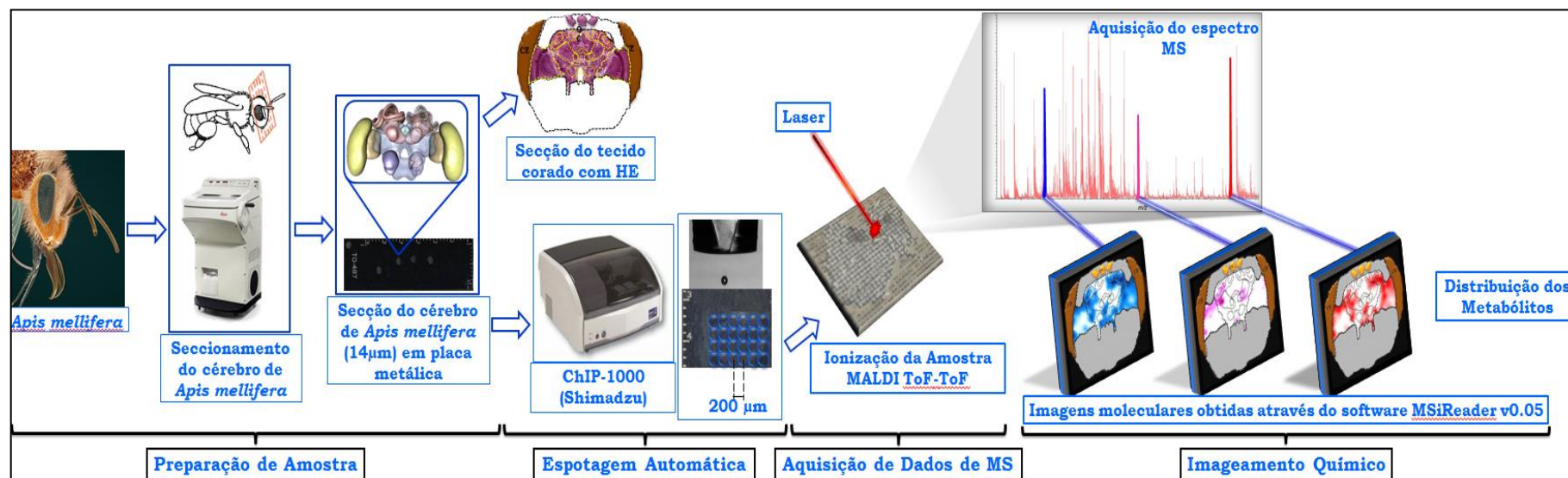
11.3 Processamento dos dados de imageamento químico e Análise das Imagens

Através da utilização do software Launchpad v2.8 (Shimadzu) os dados brutos (*.raw*) foram convertidos para o formato *.mzXML*. As imagens foram reconstruídas no software MSiReader v0.05 a partir dos dados no formato *.mzXML*, utilizando-se tolerância de massa de ± 0.3 Da e espaçamento de 200 μm . Nesse software os seguintes parâmetros foram configurados: O método utilizado para calcular a intensidade exibida nas imagens moleculares foi o **Max of Window (Max)**; subtração de ruído e *background*; correção da linha de base; normalização dos dados e interpolação cúbica de ordem 5 dos pixels das imagens.

Para correlacionar os neuropeptídeos com suas localizações no cérebro 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. 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 anatomia do cérebro na secção sagital, e facilitando o alinhamento das imagens moleculares obtidas por espectrometria de massa com as imagens histoquímicas. Após o desenvolvimento do mapa de contorno as estruturas foram

nomeadas de acordo com o atlas HSB (disponível em <http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/beebrain/>).

Figura 78. Estratégia geral adotada para imageamento químico dos neuropeptídeos em cérebro de *A. mellifera*.

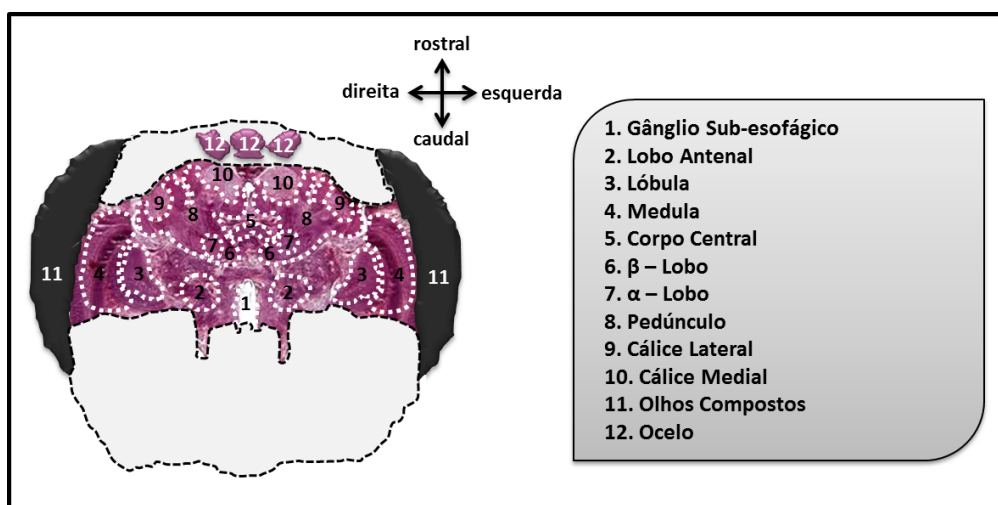


Fonte: criado pelo autor, 2014.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a compreensão da função biológica dos neuropeptídeos é muito importante entendermos a localização dos mesmos nas diversas estruturas do cérebro da abelha, uma vez que um mesmo neuropeptídeo, como por exemplo, peptídeos pertencentes à classe das allostatinas, podem desempenhar diferentes funções em áreas distintas do cérebro (STAY e TOBE, 2007). Desse modo, para estudarmos a localização específica dos neuropeptídeos no cérebro da abelha foi desenvolvido um mapa de contorno a partir de uma secção corada com H&E (Figura 18). Este mapa de contorno define os limites de cada região do cérebro visando melhorar a compreensão dos dados de MSI. Após o desenvolvimento do mapa de contorno, as estruturas foram nomeadas de acordo com o atlas digital 3D do cérebro de *A. mellifera* desenvolvido por Rybak e colaboradores (2010) (Figura 79).

Figura 79. Máscara adotada para os estudos de MSI. As estruturas foram nomeadas de acordo com Rybak e colaboradores (2010).



Fonte: Retirado de Pratavieira e colaboradores (2014).

IMAGENS MOLECULARES DE NEUROPEPTÍDEOS

No presente trabalho foram criados mapas de distribuição para alguns neuropeptídeos pertencentes à classe apidaecina, NPLP-1, SIFamide, allostatina e taquicinina. Na Figura 80 podemos observar o mapa de distribuição dos neuropeptídeos GNNRPVYIPQPRPPHP-NH₂ (apidaecina) – Figura 80 A e B, NVGSVAREHGLPY-NH₂ (NPLP-1) – Figura 80 C e D, e o neuropeptídeo RKPPFNGSIF-NH₂ (SIFamida) – Figura 80 E e F. Nessas imagens, o padrão

de coloração representa um método semi-quantitativo baseado em uma escala de cores que varia de 0% a 100 %. Dessa forma, regiões que apresentam maiores concentrações de neuropeptídeos estão representadas próximo da intensidade de 100%, e regiões com menores concentrações estão representadas por cores em gradiente decrescente em intensidade.

Nas imagens correspondentes à secção do cérebro do grupo controle (Figura 80 A, C e E), podemos observar um padrão de localização semelhante entre os neuropeptídeos apidaecina, NPLP-1 e SIFamida estudados. Nesse grupo observamos uma baixa detecção de neuropeptídeos maduros (coloração azul) em algumas regiões específicas do cérebro, tais como no gânglio sub-esofágico, lobos antenais e no corpo central. Nos corpos pedunculados (pendúnculo, cálices medial e lateral, e lobos alfa e beta) e na região dos lobos ópticos (lóbula e medula) observamos uma intensa concentração desses peptídeos (coloração verde, amarela e vermelha). A região dos corpos pedunculados (*Mushroom body* – MB) está envolvida no processamento de informações de alta ordem no sistema nervoso central dos insetos, tais como a integração sensorial, na aprendizagem, na memória e na orientação espacial; os MBs são descritos por atuarem na integração de todos os *inputs* sensoriais em abelhas. A região da medula e lóbula encontram-se no lobo óptico e auxiliam no processamento de informações oriundas dos olhos compostos. Desse modo, esses neuropeptídeos parecem agir nessas regiões particulares mediando diferentes processos fisiológicos.

No grupo REP – Figura 80 B, D e F – observamos, de maneira geral, uma baixa detecção de neuropeptídeos, que estão distribuídos por quase todas as regiões do cérebro. Uma marcação mais intensa pode ser observada nas lóbulas e medulas. Esses dados demonstram que os estímulos aos quais as abelhas foram submetidas (REP) teve efeito no comportamento e fisiologia desses insetos. A baixa detecção de neuropeptídeos sugere que eles foram rapidamente liberados e metabolizados durante os testes comportamentais, e que possam estar envolvidos com a aquisição de memória e aprendizagem em *A. mellifera*. É possível observarmos, também, ao compararmos a Figura 80 A, C e E com a Figura 80 B, D e F, que o consumo e utilização dos neuropeptídeos estudados ocorreram em maior intensidade na região dos corpos pedunculados, caracterizado por ser a principal região envolvida na memória e aprendizagem em diversos insetos, incluindo as abelhas (HEISENBERG et al., 1985; BELLE e HEISENBERG, 1994; HAMMER e MENZEL, 1998).

Estudos recentes tem demonstrado que a aquisição de memória e aprendizagem são influenciados por inúmeros neuropeptídeos e por moléculas não-peptídicas, tais como os

neurotransmissores – acetilcolina, GABA, dopamina, serotonina, octopamina, dentre outros – (GÜLPINAR e YEGEN, 2004). Os neuropeptídeos diferem dos neurotransmissores clássicos em vários aspectos importantes, tais como em relação à síntese, armazenamento e mecanismo de liberação dessas moléculas. Os neurotransmissores clássicos são moléculas pequenas, armazenadas em pequenas vesículas sinápticas citosólicas localizadas em terminações nervosas próximas aos sítios de liberação (GÜLPINAR e YEGEN, 2004; ÖGREN et al., 2010). São caracterizados por ter ação rápida, e normalmente provocam uma resposta no neurônio pós-sináptico dentro de poucos milissegundos ou menos (GÜLPINAR e YEGEN, 2004). Os neuropeptídeos, por sua vez, são peptídeos sintetizados no corpo celular de neurônio na forma de prepropeptídeos que, após o processamento no complexo de Golgi e empacotamento em grandes vesículas, chegam à região terminal dos neurônios através do transporte axonal rápido (GAINER, 1981; ÖGREN et al., 2010).

Normalmente a liberação de neuropeptídeos têm um alto limiar de influxo de íons cálcio na fenda sináptica, o que significa que ativações fracas dos neurônios vão liberar, via de regra, os neurotransmissores clássicos ao invés dos peptídeos; quando um grande número de *spikes* neurais chegam na região sináptica induzindo a entrada maciça de cálcio no neurônio, ocorre, normalmente, a liberação de neurotransmissores clássicos e de neuropeptídeos (ADAMS e O'SHEA, 1983; VILIM et al., 1996; TALLENT, 2008; ÖGREN et al., 2010). Desse modo, o aumento da atividade cerebral durante o processo de aprendizagem e formação da memória poderia acarretar na liberação de vários neuropeptídeos que atuariam na modulação desses processos biológicos extremamente complexos. Isso corrobora com a hipótese oriunda da comparação entre as imagens moleculares dos neuropeptídeos presentes no cérebro dos indivíduos controle e indivíduos submetidos ao teste de REP, que correlaciona à baixa detecção de peptídeos nos indivíduos de REP com a rápida liberação e utilização dessas biomoléculas na modulação dos processos biológicos estudados.

Após uma extensa atividade neuronal e liberação de alguns neuropeptídeos os níveis dessas moléculas podem ser esgotados, uma vez que a substituição após a liberação é dependente de nova síntese de prepropeptídeos específicos nos ribossomos e de transporte dos neuropeptídeos processados e empacotados através dos axônios; esse processo contrasta com a reutilização da maior parte dos neurotransmissores clássicos (ÖGREN et al., 2010). Após a liberação e atuação dos neuropeptídeos, eles são clivados por peptidases específicas e inativados (GALIZIA e KREISSL, 2012). Esses fatos também corroboram para a observação

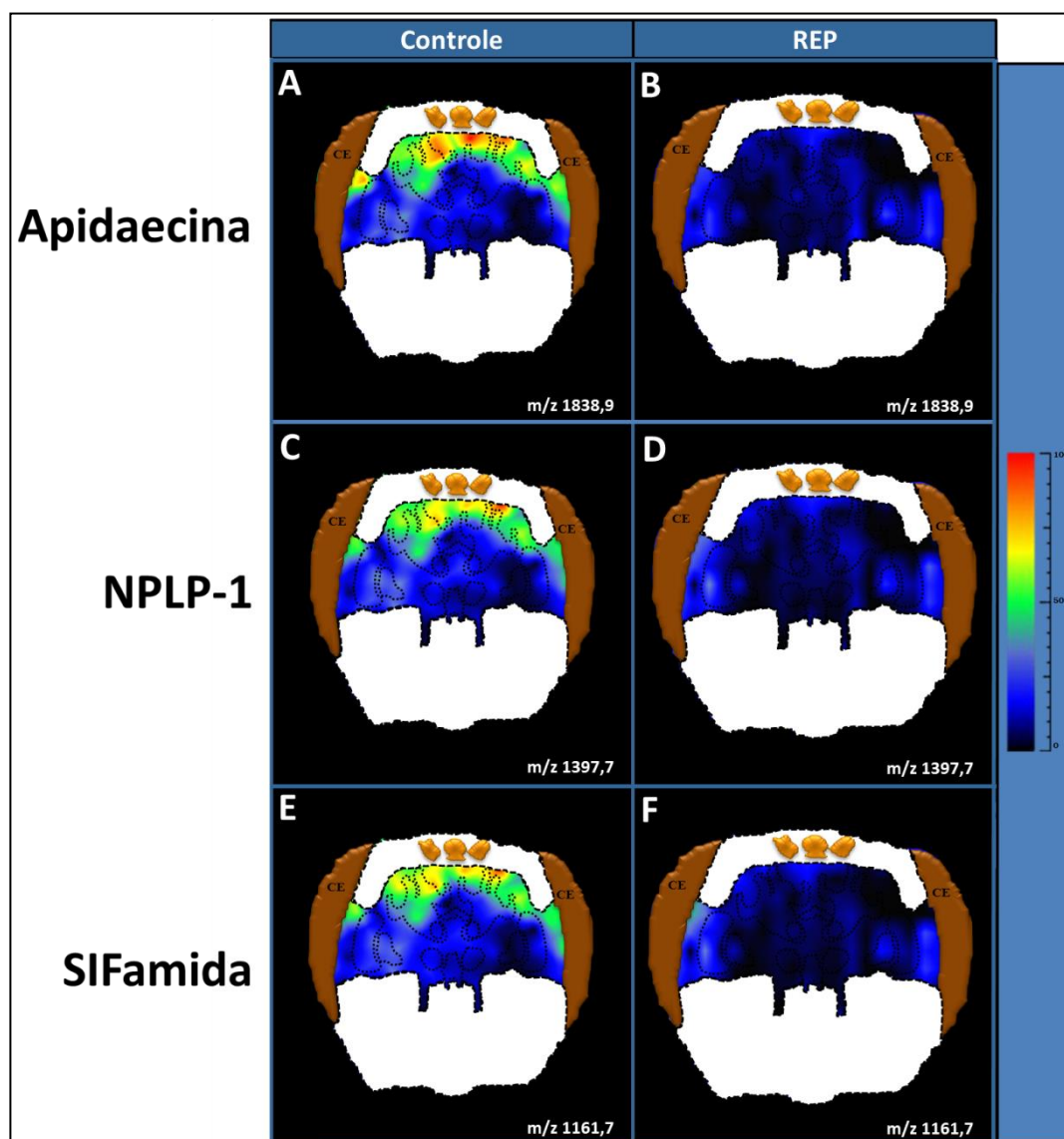
de que os neuropeptídeos nas abelhas submetidas ao ensaio de REP foram rapidamente liberados, desempenharam suas funções biológicas e sofreram uma rápida clivagem. Isso explicaria a baixa detecção de neuropeptídeos nesse grupo, quando comparados com os indivíduos do grupo controle.

Uma vez que os corpos pedunculados (MBs) têm sido implicados como estruturas cerebrais importantes para a aprendizagem olfativa (HEISENBERG et al., 1985; DAVIS, 1993; BELLE e HEISENBERG, 1994; NÄSSEL, 2002), é de extremo interesse determinar qual neurotransmissor e neuropeptídeo são utilizados pelos neurônios associados a essas estruturas (NÄSSEL, 2002). A expressão de neuropeptídeos em neurônios que inervam essa região do cérebro pode sugerir o envolvimento do peptídeo na modulação dos circuitos neurais envolvidos na aprendizagem (NÄSSEL, 2002). Nesse contexto, a aplicação da técnica de MALDI imaging têm se mostrado uma excelente ferramenta na investigação de biomoléculas que possam estar envolvidas na modulação de diversas funções nos circuitos neurais de insetos, como já demonstraram outros trabalhos (PRATAVIEIRA et al., 2014).

Embora muitos estudos tenham envolvido os corpos pedunculados com a memória e aprendizagem olfativa (HEISENBERG et al., 1985; DAVIS, 1993; BELLE e HEISENBERG, 1994), ainda não se sabe se as plasticidades neuronais são localizadas nas regiões de *inputs* de informação dos MBs (cálices lateral e medial) ou com as regiões de *outputs* (os lobos α - e β -), ou em ambos os locais (HAMMER e MENZEL, 1998). Diversos estudos indicam que a formação de memória associativa está mais intimamente relacionada com os cálices (ERBER, MASUHR e MENZEL, 1980; HAMMER e MENZEL, 1995). Ao correlacionar essas informações com as imagens moleculares da Figura 80, podemos observar claramente que os neuropeptídeos estudados encontram-se mais intensamente marcados nas regiões dos cálices nos indivíduos controle (Figura 80 A, C e E). Ao serem contrastadas com as imagens dos indivíduos submetidos ao teste de REP (Figura 80 B, D e F), podemos observar que os neuropeptídeos dessa região foram rapidamente consumidos, devido à diminuição drástica da concentração relativa dessas moléculas nessa região específica. Desse modo, os resultados obtidos sugerem que houve uma maior liberação e consumo desses neuropeptídeos nos cálices do que nos nas regiões de *outputs*, indicando possivelmente um maior envolvimento dessas moléculas com a região de *inputs*. Essas observações poderiam corroborar com a hipótese de que a memória e aprendizagem olfativa estão mais intimamente relacionadas com os cálices.

Todavia, para um melhor entendimento da atuação desses neuropeptídeos nas diferentes regiões dos MB seriam necessários estudos adicionais.

Figura 80. Imagens moleculares de alguns neuropeptídeos, comparando os cérebros de abelhas do grupo controle (coluna da esquerda) e experimental (coluna da direita). **A** e **B** – apidaecina (GNNRPVYIPQPRPPHP-NH₂); **C** e **D** – NPLP-1 (NVGSVAREHGLPY-NH₂); **E** e **F** – SIFamida (RKPPFNGSIF-NH₂).



Fonte: criado pelo autor, 2015.

Alatostatinas e Taquicininas

Existem três famílias de alatostatinas (ASTs), os peptídeos descobertos com base na sua habilidade de inibir o hormônio juvenil (JH) em insetos: (i) as alatostatinas do tipo A -

ASTAs, representando a família FGLa (sequência C-terminal comum para todos os membros da família), descoberta inicialmente em baratas (WOODHEAD et al., 1989; COAST e SCHOOLEY, 2011); (ii) as alatostatinas do tipo B – ASTBs, representando a família W(X)₆Wa (sequência C-terminal comum para todos os membros da família), descoberta inicialmente em grilos (LORENZ et al., 1995); e (iii) as alatostatinas do tipo C – ASTCs, representando a família PISCF (sequência C-terminal comum para todos os membros da família), descoberta em mariposa (KRAMER et al., 1991; COAST e SCHOOLEY, 2011).

As alatostatinas também são caracterizadas por estarem presentes através de toda a classe Insecta e em muitos outros organismos pertencentes ao filo dos invertebrados, atuando na regulação de diversas atividades biológicas, tais como a modulação da atividade miotrópica e da neurotransmissão, além da regulação do JH (STAY e TOBE, 2007). Enquanto algumas atividades biológicas das ASTAs são comuns a diferentes espécies, outras atividades parecem ser espécie e ordem específicas. A ação das ASTAs tem sido amplamente descritas em espécies individuais e, portanto, ainda é desconhecido se as ações biológicas podem ser inferidas através de toda a classe Insecta. Os neuropeptídeos ASTAs, por exemplo, são caracterizados por serem alostáticos (inibirem a síntese do JH) em baratas e, provavelmente, não desempenham a mesma função em dípteras e em abelhas (DUVE et al., 1993; BELLÉS et al., 1999; BOERJAN et al., 2010). Nestes, outro tipo de ASTs (ASTBs e/ou ASTCs) desempenham a função alostática, sugerindo que apenas um tipo de AST atue na inibição do JH em cada espécie (NÄSSEL, 2002).

No caso da família FGLa/AST, as diferentes atividades biológicas incluem: a inibição da produção de vitelogenina pelo corpo gorduroso em baratas; a inibição da atividade miotrópica particularmente em tecido intestinal de dípteras e ortópteros; na regulação da liberação de enzimas digestivas no intestino médio de baratas; na neurotransmissão em gânglios gastrointestinais em caranguejos e, possivelmente, no sistema nervoso central de baratas, exemplificando a ampla atuação das ASTAs na modulação de atividades biológicas diversas (KASTIN, 2013).

Os neuropeptídeos taquicininas (TRPs - *Tachykinin-related peptides*) formam um grande grupo de peptídeos dos invertebrados. Esse grupo é caracterizado por apresentar a seguinte sequência no lado C-terminal: -FX₁GX₂R-NH₂ (sendo o X₁ e o X₂ variáveis). As duas primeiras TRPs identificadas foram oriundos de *C. boreali*: o nonapeptídeo CabTRP-Ia (APSGFLGMR-NH₂) e o heptapeptídeo SGFLGMR-NH₂, o primeiro a ser identificado em

muitos outros decapodas. Posteriormente foi identificado um terceiro neuropeptídeo oriundo do decapoda *Cancer crabs*, seguidos da identificação três novos nonapeptídeos identificados de *Litopenaeus vannamei*, sendo caracterizados por apresentarem sequências N-terminais um pouco diferentes: APAGFLGMR-NH₂, APSGFNGMR-NH₂ e APSFGLDMR-NH₂ (KASTIN, 2013). Curiosamente, apenas três decapeptídeos de taquicininas foram identificados em *Daphnia pulex* (DIRCKSEN et al., 2011).

As taquicininas são caracterizadas por atuarem na regulação de diversas atividades biológicas, tais como os neuropeptídeos CabTRP-Ia e TPSGFLGMR-NH₂ que atuam na regulação da atividade pilórica e gástrica em decapodas. Esses neuropeptídeos quando testados a 10⁻⁶M, ambos os peptídeos estimulam um aumento significativo na frequência e amplitude das contrações do coração (SWENSEN e MARDER, 2001; CHRISTIE et al., 2010). Nas baratas *Leucophaea maderae* a TRP-4 (=Met6 – CabTRP-Ia) é responsável por modular a sensibilidade de fotorreceptores em combinação com o GABA (GLANTZ, MILLER e NÄSSEL, 2000). O peptídeo CabTRP-Ia liberado a partir de células do intestino médio parecem elevar os níveis circulantes do peptídeo em animais em jejum, podendo levar a ação miotrópica na musculatura do intestino anterior (CHRISTIE et al., 2010). Desse modo, podemos observar que as ações biológicas dos neuropeptídeos TRP parecem ser espécie específica, assim como ocorre com as taquicininas.

No presente trabalho foram criados, também, mapas de distribuição para alguns neuropeptídeos pertencentes à classe das alatostatinas A e das Taquicininas.

A imagem molecular do neuropeptídeo AmTRP-5 (Figura 80 E) apresenta um padrão de distribuição diferente do observado para os neuropeptídeos AmAST-1, AmAST-3 e AmTRP-2 no grupo controle. Esse peptídeo encontra-se concentrado apenas no cálice lateral direito, no lobo óptico direito, e em alguns pontos do lobo óptico e MB esquerdo. No indivíduo submetido ao ensaio REP, observamos que a concentração relativa do peptídeo AmTRP-5 aumenta e espalha-se por diversas regiões do cérebro, concentrando-se nos lobos ópticos direito e esquerdo, lobos antenais, e corpos pedunculados (em especial nas regiões dos cálices lateral e medial nos dois hemisférios cerebrais) – Figura 80 F. A intensa marcação desse neuropeptídeo nos indivíduos submetidos ao teste de REP, em relação aos indivíduos controle pode ser explicada devido à síntese de neuropeptídeos através da degradação enzimática de novos precursores proteicos presentes nessas regiões do cérebro.

De modo geral, comparando as imagens do grupo controle com as imagens do grupo REP observamos que houve uma alteração de todos os padrões de distribuição de neuropeptídeos, comprovando que o ensaio comportamental ao quais as abelhas foram submetidas teve efeito no comportamento e fisiologia desses insetos. As imagens moleculares do neuropeptídeos AmAST-1 e AmAST-3 nos indivíduos submetidos ao ensaio REP concentram-se nos lobos ópticos, corpos pedunculados (em especial nas regiões dos cálices lateral e medial) e nos lobos antenais (Figura 79 B e D). A comparação dessas imagens (Figura 81 B e D) com as imagens para esses mesmos peptídeos no grupo controle (Figura 81 A e C) sugerem que esses neuropeptídeos sofreram uma rápida redistribuição para diferentes regiões do cérebro, e que possam atuar na modulação da aquisição de memória e aprendizagem em *A. mellifera*. Teorias recentes corroboram com essa observação e dizem que, ao contrário do que acontecem para os neurotransmissores clássicos que se difundem poucos nanômetros e agem nas sinapses, alguns neuropeptídeos podem se difundir, após sua liberação, por longas distâncias para agir longe de seus sítios de liberação (POL, 2012).

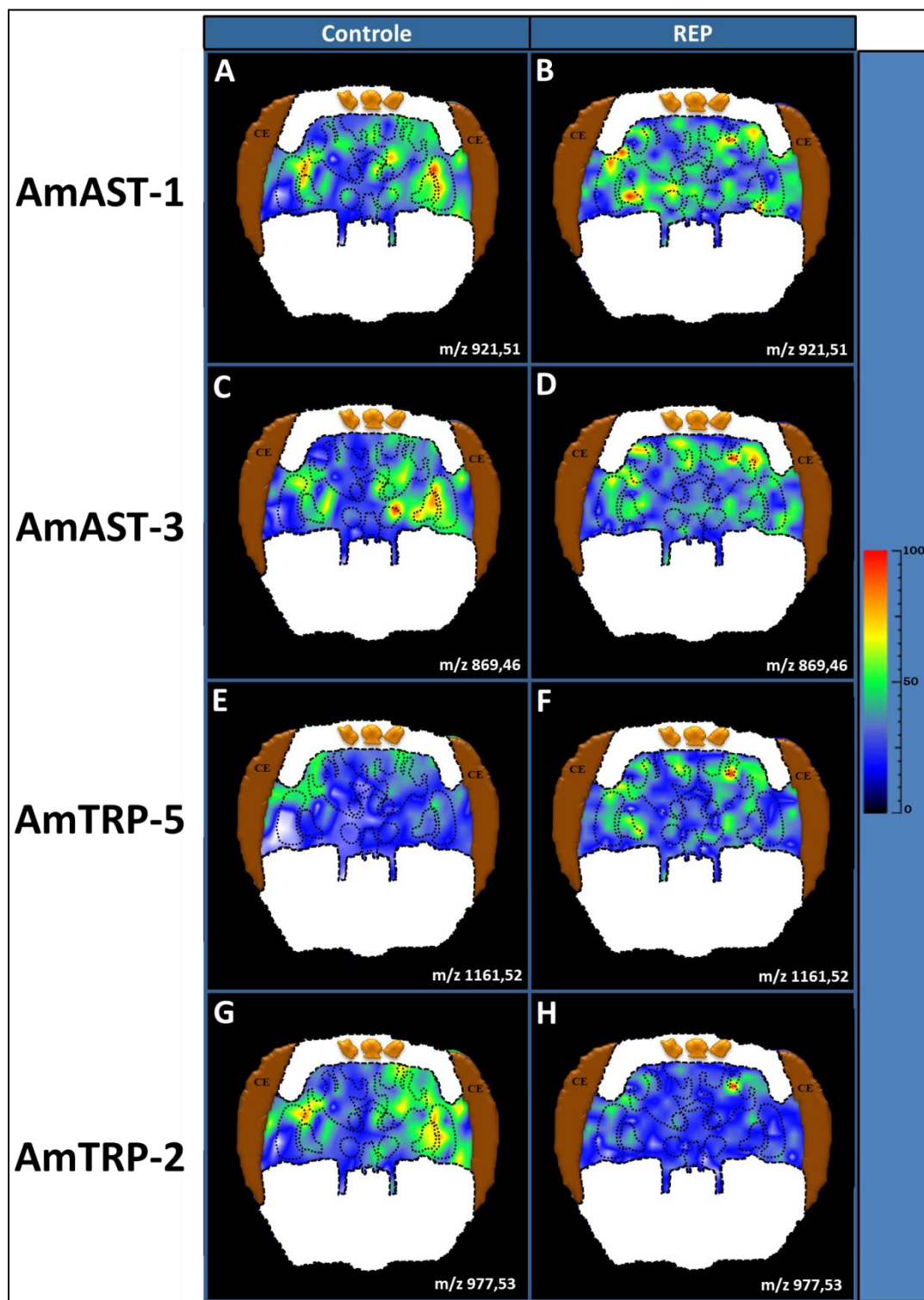
Na Figura 81 – H podemos observa que o neuropeptídeo AmTRP-2 está presente, de maneira geral, em baixas concentrações relativos distribuídos por quase todas as regiões do cérebro. Uma marcação mais intensa pode ser observada nos cálices dos corpos pedunculados e em algumas regiões dos lobos ópticos. De modo semelhante ao que foi observado para os neuropeptídeos apidaecina, NPLP-1 e SIFamida (Figura 80), o neuropeptídeo AmTRP-2 parecem ter sido rapidamente liberados e metabolizados durante os testes comportamentais; essas observações indicam que esse neuropeptídeo possa estar envolvido na modulação dos processos biológicos estudados.

A elevada concentração dos neuropeptídeos ASTA e TRP nos lobos ópticos pode indicar a atuação desses peptídeos no processamento visual (Figura 81 – A, B, C, D, F e G); em especial as alatostatinas, que estão presentes em concentrações relativas maiores (Figura 81 – A, B, C e D). Estudos da morfologia dos neurônios imunorreativos à AST nessas regiões sugerem um envolvimento com a detecção de movimento em *Apis* (KREISSL, STRASSER e GALIZIA, 2010), similar ao que foi descrito para moscas (KALB, EGELHAAF e KURTZ, 2008; BORST, 2009). Dado que a detecção de movimentos depende da precisão *spike*-tempo, e que as ASTs já foram descritas por influenciarem essa precisão em outros sistemas através de sua ação inibitória, a presença de ASTAs nessas regiões do sistema nervoso poderia atuar aumentando a precisão *spike*-tempo e atuar na detecção de movimento. Takeuchi e

colaboradores (2004) descreveram precursores de taquicinina (prepro-AmTRP) em alguns neurônios dos lobos ópticos, sugerindo que as taquicininas possam estar envolvidas com a visão em *A. mellifera*. Desse modo, a elevada detecção de ASTAs e TRPs nos lobos ópticos dos organismos estudados pode corroborar para a hipótese de que esses peptídeos estejam envolvidos no processamento visual em *A. mellifera*. Todavia, para a confirmação dessa hipótese os peptídeos precisariam ser testados fisiologicamente.

Alguns estudos em artrópodes descrevem a ação de algumas taquicininas como neuromoduladoras. Em *Locusta migratoria*, as taquicininas despolarizaram e desencadearam disparos de potencial de ação do neurônio DUM (*dorsal unpaired median*), possivelmente através da adenilato ciclase e o aumento do AMP cíclico (LUNDQUIST e NÄSSEL, 1997). Em *Pacifastacus leniusculus*, as taquicininas induzem a inibição pré-sináptica de fotorreceptores na região dos lobos ópticos (lamina) (GLANTZ, MILLER e NÄSSEL, 2000). No cérebro de *Drosophila* e de outros insetos estudados, as taquicininas foram encontradas em neurônios com projeções nos lobos antenais, corpos pedunculados e no corpo central, sugerindo que os neuropeptídeos dessa classe possam estar envolvidos no processamento sensorial olfativo e no controle motor de alta ordem (NÄSSEL, 1993; NÄSSEL et al., 1998; NÄSSEL, 1999; VITZTHUM e HOMBERG, 1998). Em *A. mellifera* precursores de taquicininas (prepro-AmTRP) foram descritos por encontrarem-se predominantemente nos MBs, e em alguns neurônios dos lobos ópticos e antenais, sugerindo o envolvimento das taquicininas com a visão, percepção de odor e com a memória e aprendizagem (TAKEUCHI et al., 2004). Esses dados se encaixam com a maioria dos resultados obtidos no presente trabalho, no qual observamos as taquicininas nas três regiões descritas acima (OL, AL e MB) – Figura 81 (E, F, G e H), corroborando para a hipótese de que as taquicininas estudadas possam estar envolvidas com a aquisição de memória e aprendizagem olfativa em *A. mellifera*.

Figura 81. Imagens moleculares de moleculares de alguns neuropeptídeos pertencentes às classes das taquicininas e alatostatinas, comparando os cérebros de abelhas do grupo controle (coluna da esquerda) e experimental (coluna da direita). **A e B** – alatostatina AmAST-1 (LPVYNFGI-NH₂); **C e D** – alatostatina AmAST-3 (RQYSFGL- NH₂); **E e F** – taquicinina AmTRP-5 (ARMGFHGMR-NH₂); **G e H** – taquicinina AmTRP-2 (ALMGFQGVR-NH₂).



Fonte: criado pelo autor, 2015.

13. CONCLUSÕES

O reflexo de extensão de probóscide (REP) é uma estratégia experimental utilizada avaliar a capacidade das abelhas de exibir um estímulo não-condicionado (US) (GIURFA et al., 2012). O ensaio de REP é frequentemente usado para investigar a aprendizagem e a memória em abelhas, especialmente na avaliação do aprendizado associativo entre os US e diferentes tipos de CS, como exibir REP cada vez que um odor identificado está associado a uma recompensa oferecida às abelhas (como beber uma solução de carboidratos), um método clássico de condicionamento Pavloviano (MATSUMOTO et al., 2012). REP representa um aspecto do comportamento de alimentação de abelhas; quando a antena é estimulada pelo contato com uma solução de carboidratos, os insetos estendem automaticamente suas probóscide para beber a solução de açúcares, constituindo assim uma resposta reflexa a um US (BICKER et al., 1992, GERBER et al., 1996). As abelhas adquirem / desenvolvem uma memória olfativa da fonte de alimento durante visitas a flores para coletar néctar e transferem essa memória para o paradigma no laboratório durante experimentos (GERBER et al., 1996).

Considerando-se a importância e o potencial de estudar aprendizagem e memória no cérebro de abelhas por meio do ensaio de REP como *input*, as estratégias adotadas ao longo do estudo e os resultados obtidos até o momento, podemos concluir:

- Diferentes estratégias analíticas foram empregadas na tentativa de não só se obter um maior número de identificação de proteínas, mas também de identificar proteínas minoritárias e/ou grupos específicos de proteínas.

Na parte I: três métodos diferentes de preparo de amostra foram testados para o estudo das proteínas solúveis (maceração da cabeça inteira vs cérebros dissecados; tampão de lise; tampão de lise + sonicação dos debrís e RapiGest). Vale ressaltar que a análise por espectrometria de massas foi realizada em três diferentes espectrômetros de massas a fim de se obter um bom perfil proteômico (Amazon-ETD, QToF e Orbitrap).

Na parte II: o estudo do transcriptoma de cérebros de abelhas forrageiras foi realizado com o intuito de melhorar o banco de dados de sequências de proteínas disponível para as análises de bioinformática.

Na parte III: grande parte do tempo dedicado a este projeto foi centralizado no estudo de receptores neuronais e proteínas de membrana. Para isto, diferentes estratégias de preparo de amostra foram testadas (cérebro inteiro vs cérebro dissecado; ultracentrifugação e/ou enriquecimento de fração de proteínas membrana por gradiente de sacarose; pré-fracionamento; quantificação *labeling* com TMT).

Na parte IV: uma técnica recente e inovadora, MALDI Imaging (na qual nosso grupo de pesquisa foi um dos pioneiros no Brasil), foi aplicado ao estudo de proteínas e peptídeos a fim de se visualizar a distribuição destas moléculas em cérebro de abelhas.

Além disso, a criação de um banco de dados para *Apis mellifera* que reúne toda a informação disponível na literatura e depositada nos principais bancos de dados disponíveis até o momento (Uniprot e NCBI (RefSeq), somando-se os dados obtidos na análise transcriptômica.

- No estudo do proteoma citosólico observou-se que o cérebro sofreu uma série de transformações metabólicas específicas e vários processos biológicos em nível celular para adaptar os cérebros dos insetos à função de coordenar o reconhecimento de odor de sacarose e associar este odor a um comportamento reflexo de extensão da probóscide. A análise comparativa dos perfis proteômicos para os cérebros de operárias do grupo controle e do grupo REP demonstraram uma ativação do metabolismo de compostos cíclicos / heterocíclicos / aromáticos em paralelo com o metabolismo de compostos nitrogenados. Este processo seguiu-se pela regulação negativa de proteínas envolvidas no metabolismo de metabólitos fosforilados e a regulação positiva das proteínas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos. Isto provavelmente ocorreu para fornecer energia metabólica para os processos celulares necessários para adaptar o cérebro à execução de REP. Em relação aos processos celulares, o perfil proteômico foi estimulado pelo REP, o que indica uma série de vários estímulos à diferenciação do sistema nervoso. Contudo, houve uma regulação negativa no desenvolvimento anatômico e na diferenciação celular em outros neurônios, seguida pela regulação positiva das proteínas envolvidas no desenvolvimento anatômico e do citoesqueleto.

- Usando a tecnologia de última geração Illumina HiSeq 2000, criamos uma biblioteca cDNA que contém 369 milhões de leituras finais pareadas. Reunimos 221.187 *contigs* de transcrição *de novo* e os dados RNA-seq foram mapeados para 6.556 seqüências UniProt.
- Realização do primeiro estudo das proteínas de membrana/receptores nervosos em cérebro de abelhas. Proteínas de membrana são um grupo de proteínas conhecidas por serem de difícil isolamento/identificação em detrimento de suas baixas abundâncias e às limitações técnicas dos procedimentos de separações (SANTONI et al., 2000, GYGI et al., 2012). Apesar disso, utilizamos diferentes métodos de enriquecimento com sucesso e aplicamos uma abordagem livre de gel, com separação multidimensional de peptídeos, para fornecer um conjunto de dados abrangente e elucidativo. Foram identificadas 6.882 proteínas, dentre as quais 1.582 são proteínas de membrana, sendo que dessas 658 apresentaram-se diferencialmente expressas. Dentre elas, proteínas importantes envolvidas na ligação de odor, na ativação do receptor olfativo e gustativo, bem como a atividade dos transportadores, a sinalização da proteína-G, transmissão sináptica e também proteínas envolvidas nas atividades de canais iônicos.
- Existem grandes diferenças quanto à expressão de proteínas ao se comparar o grupo REP e o grupo controle, tanto com relação às proteínas solúveis quanto com relação às proteínas de membrana e receptores neuronais. Este é o primeiro estudo de análise proteômica que chama atenção para o fato de que o comportamento reflexo (não-condicionado - US) por si só ativa diversas cascatas metabólicas, incluindo processos biológicos relacionados à memória. Se uma associação entre processos é estabelecida por abelhas, os indivíduos estendem sua probóscide para serem recompensados com uma solução de carboidratos. Assim, as variáveis bioquímicas e / ou genéticas observadas refletem as mudanças globais induzidas por ambas as manipulações de insetos. O REP sozinho é um reflexo importante na parte da estratégia experimental para acessar a habilidade das abelhas em aprender. Portanto, é necessário identificar as alterações bioquímicas induzidas nos cérebros das abelhas por este reflexo (US).
- O ensaio de REP, seja ele condicionado ou não, parece ativar os circuitos de transdução de sinal e síntese proteica para a consolidação da informação recebida (reconhecimento de sacarose e/ou memória associativa). Este processo é certamente mais proeminente no grupo REP-condicionado, em que se observou elevado grau de *up-regulation* de proteínas

importantes para a consolidação da memória olfativa, tais como receptores metabotrópicos, ionotrópicos, colinérgicos, dentre outros.

- Analisando as rotas, observou-se que tanto o processamento do estímulo olfativo recebido (odor da sacarose), assim como a associação de um estímulo odorífero (2-octanona) a uma recompensa (solução de sacarose) que leva à formação de uma memória associativa, dependem de não só uma rota, mas de diversas rotas (transdução olfativa, sinapses colinérgica, glutamatérgica, GABAérgica, serotoninérgica, dentre outras). Fica claro que se trata de um processo multicomplexo que exige a expressão/síntese de proteínas e a transdução de diferentes sinais. Sugere-se que as rotas mais correlacionadas com o processo de memória associativa (REP-condicionado vs REP) em comparação à REP vs controle sejam a transdução olfativa (todas as proteínas identificadas apresentaram-se *up-regulated*), sinapse dopaminérgica, sinapse glutamatérgica e sinapse GABAérgica. No caso de recuperação de memória previamente adquirida, a sinapse colinérgica (acetilcolina) parece ser de fundamental importância (grupo REP). Estudos de validação estão sendo empregados para a melhor compreensão destes processos.

- Embora haja atividade das vesículas sinápticas e diferenças na expressão de proteínas relacionadas às vesículas sinápticas, parece haver o processamento/percepção de sinais e não a emissão de sinais por si só, já que em todas as rotas analisadas a expressão das proteínas concentra-se em neurônios pós-sinápticos e não em neurônios pré-sinápticos.

- As técnicas de análise proteômica evoluem em ritmo consideravelmente rápido permitindo a identificação de proteínas minoritárias, e também daquelas de difícil acesso de sítio de clivagem (devido a inserção profunda nas membranas biológicas); e os métodos de preparo de amostra e enriquecimento de proteínas de membrana viabilizam a identificação das proteínas e receptores, mas a escassez em termos de informação funcional limita a compreensão dos dados obtidos.

- As análises de MALDI Imaging funcionam como um banco de dados de localização *in situ* de moléculas, já que os dados adquiridos podem ser utilizados em análises futuras para a criação de imagens moleculares e o estudo de proteínas/peptídeos de interesse.

- O trabalho contribuiu para gerar avanços na identificação funcional de proteínas de sistema nervoso, principalmente do cérebro de abelhas. Acreditamos que as informações obtidas são relevantes e incentivam a utilização de abelhas na neurociência para estudar os processos neurais conservados.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; RENAUT, J.; SERGEANT, K. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. **International Journal of Plant Genomics**, 2012.
- ABRAHAM, C.; HUTTER, H.; PALFREYMAN, M.T.; SPATKOWSKI, G.; WEIMER, R.M.; WINDOFFER, R.; JORGENSEN, E.M.; LEUBE, R.E. Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 103, p. 8227-8232, 2006.
- ABUIN, L.; BARGETON, B.; ULBRICH, M.H.; ISACOFF, E.Y.; KELLENBERGER, S.; BENTON, R. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. **Neuron**, v. 69(1), p. 44–60, 2011.
- ADAMS, M. E.; O'SHEA, M. Peptide cotransmitter at a neuromuscular junction. **Science**, v. 221, p. 286–289, 1983.
- AKINS, M.R.; BIEDERER, T. Cell-cell interactions in synaptogenesis. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 16, p. 83-89, 2006.
- 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.
- ALMEN MS, NORDSTROM KJ, FREDRIKSSON R, SCHIOTH HB. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. **BMC Biol.**, vol. 7, p. 50, 2009.
- ALZATE, O. **Neuroproteomics**. E.U.A: CRC Press. Ed. 1, 2010.
- ANDERSON L, SEILHAMER J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997;18(3-4):533-7.
- ANTHONY N. M.; HARRISON J. B.; SATTELLE, D. B. GABA receptor molecules of insects, **EXS.**, v. 63, p. 172-209, 1993.
- ANTONUCCI, F.; CORRADINI, I.; FOASSATI, G. et al. SNAP-25, a Known Presynaptic Protein with Emerging Postsynaptic Functions. **Front Synaptic Neurosci.**, v. 8, p. 7, 2016.
- ARROYO-JIM NEZ, M. M., et al. Ultrastructural localization of the alpha4-subunit of the neuronal acetylcholine nicotinic receptor in the rat substantia nigra. **J. Neurosci.**, 19, 6475-6487, 1999.
- ASO, Y., SIWANOWICZ, I., BRÄCKER, L., ITO, K., KITAMOTO, T., TANIMOTO, H. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. **Curr. Biol.**, v. 20, p. 1445-1451, 2010.
- ATAMAN, B.; BUDNIK, V.; Thomas, U. Scaffolding proteins at the *Drosophila* neuromuscular junction. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 75, p. 181-216, 2006.

AUDSLEY, N.; WEAVER, R.J. Analysis of peptides in the brain and corpora cardiaca-corpora allata of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. **Peptides**, v. 27, n. 3, p. 512–520, 2006.

AUNG, S.I., HELLIWELL, P., MALESZKA, R. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 77, 191-197, 2004.

BAE, N.; YANG, J. W.; SITTE, H.; POLLAK, A.; MARQUEZ, J.; LUBEC, G. An electrophoretic approach to screen for glutamine deamidation. **Analytical Biochemistry**, vol. 428, p. 1–3, 2012.

BAER, B.; HEAZLEWOOD, J. L.; TAYLOR, N. L.; EUBEL, H.; MILLAR, A. H. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. **Proteomics**, v. 9, n. 8, p. 2085–2097.

BAKER, N.; WOLSCHIN, F.; AMDAM, G. V. Age-related learning deficits can be reversible in honeybees *Apis mellifera*. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 764–772, 2012.

BANTSCHEFF, M.; SCHIRLE, M.; SWEETMAN, G.; RICK, J.; KUSTER, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, vol. 389, p.1017–1031, 2007.

BECKER, M.; SCHINDLER, J.; NOTHWANG, H. G. Neuroproteomics – The tasks lying ahead. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2819–2829, 2006.

BELLE, J. S; HEISENBERG, M. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. **Science**, v. 263, p. 692–695, 1994.

BELLÉS, X.; GRAHAM, L.A.; BENDENA, W.G.; DING, Q.; EDWARDS, J.P.; WEAVER, R.J.; TOBE, S.S. The molecular evolution of the allatostatin precursor in cockroaches. **Peptides**, New York, v. 20, p. 11–22, 1999.

BENITEZ-KING, G.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.; ORTIZ, L.; MEZA, I. The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutical target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**. Vol. 3, p. 515-533, 2004.

BENTON R, VANNICE KS, GOMEZ-DIAZ C, VOSSHALL LB. Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. **Cell**, vol. 136(1), p. 149-62, 2009.

BERRY, J.A., CERVANTES-SANDOVAL, I., NICHOLAS, E.P., DAVIS, R.L. Dopamine is required for learning and forgetting in *Drosophila*. **Neuron** 74: 530-542, 2012.

BICKER, G.; MENZEL, R. Chemical codes for the control of behavior in arthropods. **Nature**, v. 337, p. 33-39, 1989.

BICKER, Habituation of an appetitive reflex in the honeybee, **J. Neurophysiol.**, vol. 67, p. 588–598, 1992.

BITNER, R.S., NIKKEL, A.L. Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. **Brain Res.** 938, 45-54, 2002.

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.

BLENAU, W.; BAUMANN, A. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 48, p. 13-38, 2001.

BODZON-KULAKOWSKA A, BIERCZYNSKA-KRZYSIK A, DYLAG T, Drabik A, et al. Methods for samples preparation in proteomic research. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** vol. 849(1-2), p.1-31, 2007.

BOERJAN, B.; CARDOEN D.; BOGAERTS, A.; LANDUYT, B.; SCHOOFS, L.; VERLEYEN, P. Mass spectrometric profiling of (neuro)-peptides in the worker honeybee, *Apis mellifera*. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 248-258, 2010.

BONDARENKO, P. V.; CHELIUS, D.; SHALER, T. A. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, vol. 74, n. 18, p. 4741–4749, 2002.

BRANTL S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1575, p. 15-25, 2002.

BROADIE, K.S.; RICHMOND, J.E. Establishing and sculpting the synapse in *Drosophila* and *C. elegans*. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 12, p. 491-498, 2002.

BROCKMANN, A.; ANNANGUNDI, S. P.; RICHMOND, T. A.; AMENT, S. A.; XIE, F.; SOUTHEY, B. R.; RODRIGUES-ZAS, S. R.; ROBINSON, G. E.; SWEEDLER, J. V. Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2383-2388, 2009.

BROUNS SJ, JORE MM, LUNDGREN M, WESTRA ER, SLIJKHUIS RJ, SNIJDERS AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science.**;321(5891):960-4, 2008.

BROWN, D.A., DOCHERTY, R.J., HALLIWELL, J.V. The action of cholinomimetic substances on impulse conduction in the habenulointerpeduncular pathway of the rat *in vitro*. **J. Physiol.**, 353, 101, 1984.

BROWN, S. M.; NAPPER, R. M.; THOMPSON, C. M.; MERCER, A. R. Stereological analysis reveals striking differences in the structural plasticity of two readily identifiable glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honeybee. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 8514–8522, 2002.

BUCHNER, E.; LUBEC, G. Gel-free mass spectrometry analysis of *Drosophila melanogaster* heads. **Proteomics**, p.1-5, 2015.

BUDIN I, DEVARAJ NK. Membrane assembly driven by a biomimetic coupling reaction. **J Am Chem Soc.**, vol. 134, p.751-3, 2014.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. **J. Neurosci.**, 21, 1819-1829, 2001.

BURRE J, BECKHAUS T, SCHAGGER H, et al. Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. **Proteomics.**, vol. 6(23), p. 6250-62, 2006.

BUTCHER, J. Neuroproteomics comes of age. **The Lancet Neurology**, v. 6, p. 850–851, 2007.

BYLUND D.; DANIELSSON R.; MALMQUIST G.; MARKIDES K. E. **J Chromatogr A**, vol. 961, p. 237–244, 2002.

CALLEC, J. J e Treherne, J.E. Synaptic transmission in the central nervous system of insects.. North-holland, **American Elsevier Ed.**, v. 35, p. 119-185, 1974.

CALLEC, J. J., BOISTEL, J. Study of different types of electric activity recorded by capillary microelectrodes at the level of the lower abdominal ganglion in the cockroach, *Periplaneta americana* L. **C.R. Seances Soc. Biol. Fil.**, 160, 1943-1947, 1966.

CALLEC, J.J., GUILLET, J.C., PICHON, Y., BOISTEL, J. Relations between the activity of cercal mechanoreceptors and the corresponding postsynaptic potentials gathered at the level of an isolated giant fiber of the cockroach (*Periplaneta americana*). **J. Physiol**, 61, 98, 1969.

CAMERINO DC, TRICARICO D, DESAPHY JF. Ion channel pharmacology. **Neurotherapeutics**, vol. 4(2), p. 184-98, 2007.

CAMERON, H. A.; GLOVER, L. R. Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. **Annual Review of Psychology**, v. 66, p. 53–81, 2015.

CHELIUS, D.; BONDARENKO, P. V. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, vol. 1, n. 4, p. 317–323, 2002.

CHEN G, GHARIB TG, HUANG CC, TAYLOR JM, MISEK DE, KARDIA SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Mol Cell Proteomics**, v.1, n. 4, p. 304-13, 2002.

CHEN, P.; LI, X.; SUN, Y.; LIU, Z.; CAO, R.; HE, Q.; WANG, M.; XIONG, J.; XIE, J.; WANG, X.; LIANG, S. Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 1126–1140. 2006.

CHENG HC, QI RZ, PAUDEL H, ZHU HJ. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. **Enzyme Res.**, vol.794089, 2011.

CHOUQUET, B.; LUCAS, P.; BOZZOLAN, F.; SOLVAR, M.; MAIBECHECOISNE, M.; DURAND, N.; DEBERNARD, S. Molecular characterization of a phospholipase C β potentially involved in moth olfactory transduction. **Chem. Senses**, v. 35, p. 363-373, 2010.

CHRISTIE A. E.; STEMMLER E. A.; DICKINSON P. S. Crustacean neuropeptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, p. 4135–4169, 2010.

CHRISTOPHER, J. B.; WOLF, H.; DAVID, O.; EMMANUEL, P.; MICHAEL, J. S.; GAURAV, D.; DARYL, G.; MARION, S.; SARAH, C.; SCOTT, W. Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. **Nature**, v. 492, p. 433–437, 2012.

CLAUDIANOS, C.; LIM, J.; YOUNG, S. Y.; CRISTINO, A. S. et al. Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery. **European Journal of Neuroscience**, p. 1-13, 2013.

COAST G. M.; SCHOOLEY D. A. Toward a consensus nomenclature for insect neuropeptides and peptide hormones. **Peptides**, New York, v. 32, p. 620–631, 2011.

COLLABORATION CMS, CHATRCHYAN S, KHACHATRYAN V, SIRUNYAN AM, TUMASYAN A, ADAM W, et al. Search for a standard-model-like Higgs boson with a mass in the range 145 to 1000 GeV at the LHC. **Eur Phys J C Part Fields**. 2013;73(6):2469.

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.

COUGHENOUR HD, SPAULDING RS, THOMPSON CM. The synaptic vesicle proteome: a comparative study in membrane protein identification. **Proteomics**, vol. 4(10), p. 3141-55, 2004.

CRAIG R.; CORTENS J. P.; BEAVIS R. C. **Rapid Commun Mass Spectrom**, vol. 19, p. 1844–1850, 2005.

CREMONA, O.; DE CAMILLI, P. Synaptic vesicle endocytosis. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 7, p. 323-330, 1997.

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. Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. **Nat. Commun.**, v. 5, p. 5529, 2014.

CROSET, V.; RYTZ, R.; CUMMINS, S.F.; BUDD, A.; BRAWAND, D.; KAESMANN, H.; GIBSON, T.J.; BENTON, R. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. **PLoS Genet**, v. 6(8), p. e1001064, 2010.

CUATRECA.P. Affinity Chromatography, Principles and Applications. Abstr Pap Am Chem S. 1974:80-.

DAHANUKAR A, HALLEM EA, CARLSON JR. Insect chemoreception. **Curr Opin Neurobiol.**, vol.;15(4), p. 423-30, 2005.

DAVIS, R. L. Mushroom bodies and Drosophila learning. **Neuron**, v. 11, p. 1–14, 1993.

DE BOER SF, KOOLHAAS JM. 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: A pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. **Eur J Pharmacol.**, vol. 526(1-3), p. 125-39, 2005.

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 Environmenta Contamination and Toxicology**, v. 48, p. 242-250, 2005.

DIRCKSEN H.; NEUPERT S.; PREDEL R.; VERLEYEN P.; HUYBRECHTS J.; STRAUSS J. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of *Daphnia pulex* neuropeptides and protein hormones. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 10, p. 4478–504, 2011.

DUVE, H.; JOHNSEN, A. H.; SCOTT, A. G.; YU, C. G.; YAGI, K. J.; TOBE, S. S.; THORPE, A. Callatostatins: neuropeptides from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 2456–2460, 1993.

EDDY SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet.* 2001;2(12):919-29.

ELLIOTT, M. H; SMITH, D. S.; et al. Current trends in quantitative proteomics. **J Mass Spectrom**, Vol. 44, n. 12, p. 1637–60, 2008.

ENGELHARDT S, ROCHAIS F. G proteins - More than transducers of receptor-generated signals? **Circ Res.**, vol. 100(8), p. 1109-11, 2007.

ERBER, J.; MASUHR, T.; MENZEL, R. Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. **Physiological Entomology**, v. 5, p. 343–358, 1980.

EVERBERG H, SIVARS U, EMANUELSSON C, PERSSON C, et al. Protein pre-fractionation in detergent-polymer aqueous two-phase systems for facilitated proteomic studies of membrane proteins. **Journal of Chromatography A.**, vol. 1029(1-2), p. 113-24, 2004.

FAHR, S.; JANKOVIC, J.; HALLETT, M. Principles and Practice of Movement Disorders. Elsevier, Philadelphia, 2011.

FANG, Y.; ROBINSON, D. P.; FOSTER, L. J. Quantitative analysis of proteome coverage and recovery rates for upstream fractionation methods in proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 4, p. 1902–1912, 2010.

FAROOQUI, T., ROBINSON, K., VAESSIN, H., SMITH, B.H.: Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. **J Neurosci.** 23:5370-5380, 2003.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J.; Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, v.10; p. 645, 2009.

FERRO M, SEIGNEURIN-BERNY D, ROLLAND N, et al. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. **Electrophoresis**, vol. 21(16), p. 3517-26, 2000.

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.

FIELDS S, JOHNSTON M. Cell biology. Whither model organism research? **Science**, vol. 307 (5717), p. 1885-6, 2005.

FISCHER, VON M.G.; STAHL, B.; LI, C.; SUDHOF, T.C.; JAHN, R. Rab proteins in regulated exocytosis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, p. 164-168, 1994.

FITZPATRICK, P.F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 355-381, 1999.

FLORENS, L.; CAROZZA, M. J.; SWANSON, S. K.; et al. Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. **Methods**, vol. 40, n. 4, p. 303–311, 2006.

FONSLOW, B. R.; STEIN, B. D.; WEBB, K. J.; XU, T.; CHOI, J.; PARK, S. K.; YATES, J. R., 3RD. **Nat. Methods**, vol.10, p. 54–56, 2013.

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.

GAINER, H. The biology of neurosecretory neurons. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 28, p. 5–20, 1981.

GALIZIA, G. C.; KREISSL, S. Neuropeptides in Honey Bee. In: Honeybee Neurobiology and Behavior. Ed. **Springer**, Cap. 3.7, p. 211–226, 2012.

GARCIA, L.; GARCIA, C.H.S.; CALÁBRIA, L.K.; NUNES DA CRUZ, G.C.; PUENTES, A.S.; BÃO, S.N.; FONTES, W.; RICART, C.A.O.; ESPINDOLA, F.S.; SOUSA, M.V. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. **J. Proteome Res.**, v. 8, p. 1464–1473, 2009.

GERBER, B.; GEBERZHAN, N.; HELLSTERN, F.; KLEIN, J.; KOWALSKY, O.; WURSTENBERG D.; MENZEL, R. Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. **Anim. Behav.**, v. 52, p. 1079–1085, 1996.

GESTELAND RF, CECH TR, ATKINS JF. THE RNA WORLD THIRD EDITION The Nature of Modern RNA Suggests a Prebiotic RNA World Preface. **Cold Spring Harb Mon.** 2006;43:Ix-X.

GETAHUN, M.N.; WICHER, D.; HANSSON, B.S.; OLSSON, S.B. Temporal response dynamics of *Drosophila* olfactory sensory neurons depends on receptor type and response polarity. **Front Cell Neurosci.**, v. 6, p. 54, 2012.

GHILDIYAL M, ZAMORE PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet.**, vol. 10(2), p. 94-108, 2009.

GILAR M, OLIVOVA P, DALY AE, GEBLER JC. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **J Sep Sci.**, vol. 28(14), p. 1694-703, 2005.

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.

GIURFA, M.; SANDOZ, J.C. Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. **Learn. Mem.**, v. 19, p. 54–66, 2012.

GLANTZ, R. M.; MILLER, C. S.; NÄSSEL, D. R. Tachykinin-related peptide and GABA-mediated presynaptic inhibition of crayfish photoreceptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 1780–1790, 2000.

GLANZMAN, D.L. Common Mechanisms of Synaptic Plasticity Minireview in Vertebrates and Invertebrates. **Current Biology**, vol. 20, p. R31–R36, 2010.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.

GÖTZ, S.; ARNOLD, R.; SEBASTIÁN-LEÓN, P.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, S.; TISCHLER, P.; JEHL, M.A.; DOPAZO, J.; THOMAS RATTEI T.; CONESA, A. B2G-FAR, a species-centered GO annotation repository. **Bioinformatics**, v. 27, p. 919–924, 2011.

GREER, C.L., et al. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. **J. Neurobiol.** 64: 239-258, 2005.

GÜLPINAR, M. A.; YEGEN, B. C. The Physiology of Learning and Memory: Role of Peptides and Stress. **Current Protein and Peptide Science**, v. 5, n. 6, p 1–17, 2004.

GYGI, S. P., CORTHALS, G. L., ZHANG, Y., ROCHON, Y. et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 97, p. 9390–9395, 2000.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720–1730, 1999.

HAHNE, H.; WOLFF, S.; HECKER, M.; BECHER, D. From complementarity to comprehensiveness — targeting the membrane proteome of growing *Bacillus subtilis* by divergent approaches. **Proteomics**, v. 8, n. 19, p. 4123–4136, 2008.

HAMILL, G.S., CLARKE, P.B., PERT, A., JACOBOWITZ, D.M. ³Hnicotine and ¹²⁵I-alpha-bungarotoxin-labeled nicotinic receptors in the interpeduncular nucleus of rats. I. Subnuclear distribution. **J. Comp. Neurol.** 251, 398-406, 1986.

HAMMER, M.: An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. **Nature**, 366: 59-63, 1993.

HAMMER, M.; MENZEL, R. Learning and memory in the honeybee, *J. Neurosci.* 15 (1995) 1617–1630. [16] G. Braun, G. Bicker, Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. **J. Neurophysiol.**, v. 67, p. 588–598, 1992.

HAMMER, M.; MENZEL, R. Learning and memory in the honeybee. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1617–1630, 1995.

HAMMER, M.; MENZEL, R. Multiple Sites of Associative Odor Learning as Revealed by Local Brain Microinjections of Octopamine in Honeybees. **Learning & Memory**, v. 5, n. 1, p. 146–156, 1998.

HAMMER, R. MENZEL. Learning and memory in the honeybee, **J. Neurosci.**, vol. 15 p. 1617–1630, 1995.

HANSSON, B.S.; ANTON, S. Function and morphology of the antennal lobe: new developments. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 203- 231, 2000.

HARRIS, T.W.; SCHUSKE, K.; JORGENSEN, E.M. Studies of synaptic vesicle endocytosis in the nematode *C. elegans*. **Traffic**, v. 2, p. 597-605, 2001.

HEISENBERG, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learn. Mem.**, v. 5, p. 1–10, 1998.

HEISENBERG, M.; BORST, A.; WAGNER, S.; BYERS, D. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. **Journal of Neurogenetics**, v. 2, p. 1–30. 1985.

HEO, S.; KANG, S. U.; OEHLER, R.; POLLAK, A.; LUBEC, G. Mass spectrometrical analysis of the mitochondrial carrier Aralar1 from mouse hippocampus. **Electrophoresis**, v. 31, p. 1813–1821, 2010.

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.

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.

HINTON R, DOBROTA M. Density gradient centrifugation. Amsterdam ; New York

HIROKAWA, N.; TAKEMURA, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. **Nat Rev Neurosci**, vol. 6, p. 201–214, 2005.

HIROKO, A.; RYO, W.; YOSHIYASU, I.; YUJI, M.; KANTA, T.; SATOMI, K.; YUKIHISA, M.; YOSHITAKA, H.; SUMIHARE, N.; TARO, M.; MAKOTO, M. Roles of OA1 octopamine receptor and Dop1 dopamine receptor in mediating appetitive and aversive reinforcement revealed by RNAi studies. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

HOKFELT, T.; BROBERGER, C.; XU, Z. Q.; SERGEYEV, V.; UBINK, R.; DIEZ, M. Neuropeptides - an overview. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 8, p. 1337–1356, 2000.

HOLMGREN, S.; JENSEN, J. Evolution of vertebrate neuropeptides. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 6, p. 723–735, 2001.

HONJO, K., FURUKUBO-TOKUNAGA, K. Distinctive neuronal networks and biochemical pathways for appetitive and aversive memory in *Drosophila* larvae. **J. Neurosci.** 29:852-862, 2009.

HOSIE, A.; SATELLE, D.; ARONSTEIN, K.; CONSTANTE, R. F. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. **Trends I neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 578-583, 1997.

HOURLCADE, B., PERISSE, E., DEVAUD, J. M., SANDOZ, J. C. Long-term memory shapes the primary olfactory center of an insect brain. **Learning & Memory**, v. 16, p. 607–615, 2009.

HUANG, D. W.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, 2009.

HUMMON, A. B.; RICHMOND, T. A.; VERLEYEN, P.; BAGGERMAN, G.; HUYBRECHTS, J.; EWING, M. A.; VIERSTRAETE, E.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHOOFS, L.; ROBINSON, G. E.; SWEEDLER, J. V. From the genome to the proteome: uncovering peptides in the Apis brain. **Science**, v. 314, n. 5799, p. 647–649, 2006.

HUNZINGER C, WOZNY W, SCHWALL GP, et al. Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species. **J Proteome Res.**, vol. 5(3), p. 625-33. 2006.

ISHIHAMA Y.; ODA Y.; TABATA T.; SATO T.; NAGASU T.; RAPPSILBER J.;

ISONO, K.; MORITA, H. Molecular and cellular designs of insect taste receptor system. **Front Cell Neurosci**, v.4, p. 20, 2010.

IZUMI, T.; GOMI, H.; KASAI, K.; MIZUTANI, S.; TORII, S. The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. **Cell Struct Funct**, v. 28, p. 465-474, 2003.

JAHN, R. Principles of exocytosis and membrane fusion. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1014, p. 170-178, 2004.

JAITLEY N.; MONROE M. E.; PETYUK V. A.; CLAUSS T. R.; ADKINS J. N.; SMITH R. D. *Anal Chem.*, vol. 78, p. 7397–7409, 2006.

JOHARD, H. A.; ENELL, L. E.; GUSTAFSSON, E.; TRIFILIEFF, P.; VEENSTRA, J. A.; NÄSSEL, D. R. Intrinsic neurons of *Drosophila* mushroom bodies express short neuropeptide F: relations to extrinsic neurons expressing different neurotransmitters. **Journal of Comparative Neurology**, v. 507, n. 4, p. 1479–1496, 2008.

JONES, P.L.; PASK, G.M.; ROMAINE, I.M.; TAYLOR, R.W.; REID, P.R.; WATERSON, A.G.; SULIKOWSKI, G.A.; ZWIEBEL, L.J. Allosteric antagonism of insect odorant receptor ion channels. **PLoS One**, v. 7(1), p. e30304, 2012.

JONES, W.D.; NGUYEN, T.A.; KLOSS, B.; LEE, K.J.; VOSSHALL, L.B. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. **Curr. Biol.**, v. 15(4), p. R119–R121, 2005.

JOO WA, LEE DY, KIM CW. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. **Biosci Biotechnol Biochem.** vol. 67(7), p. 1574-7, 2003.

JUORIO, A.V.; ROBERTSON, H.A. Identification and distribution of some monoamines in tissues of the sunflower star, *Pycnopodia helianthoides* (Echinodermata). **J. Neurochem**, v. 28, p. 573-579, 1977.

JURGENS, G., WIESCHAUS, E., KLUDING, H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. **Roux's Arch. Dev. Biol.** 193: 283-295, 1984.

KANDEL ER. Principles of neural science. 5th ed. New York: **McGraw-Hill**; 2013. l, 1709 p. p.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; AND MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. **J. Mol. Biol.**, v. 428, p. 726-731, 2016.

KANG, S.U., *et al.* Gel-based mass spectrometric analysis of a strongly hydrophobic GABAA-receptor subunit containing four transmembrane domains. **Nat Protoc.**, vol. 4, p. 1093-1102, 2009.

KASTIN, A.J. **Handbook of Biologically Active Peptides**. Elsevier, 2ed., 2013.

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

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

Kohler RE. The eighth day of creation: Makers of the revolution in biology. *Isis*. 1997;88(4):730-1.

KOROGOD SM, KULAGINA IB. Dynamical electrical states of heterogeneous populations of ion channels in the membranes of excitable cells. **Fiziol Zh**, vol. 58(3), p. 50-9, 2012.

KRAMER S. J.; TOSCHI A.; MILLER C. A.; KATAOKA H.; QUISTAD G. B.; LI J. P. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 9458–9462, 1991.

KRIEGER, J.; KLINK, O.; MOHL, C.; RAMING, K.; BREER, H. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. **J. Comp. Physiol. A Neuroethol Sens Neural Behav. Physiol.**, v. 189(7), p. 519–526, 2003.

KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, SONNHAMMER EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol.**, vol. 305, p.567-80. 2001.

KRÜTTNER, S.; STEPIEN, B.; JASPRINA, N. et al. Drosophila CPEB Orb2A Mediates Memory Independent of Its RNA-Binding Domain. **Neuron**, vol.76, n. 2, p. 383, 2012.

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.

LAI X. Reproducible method to enrich membrane proteins with high purity and high yield for an LC-MS/MS approach in quantitative membrane proteomics. **Electrophoresis**, vol. 34(6), p. 809-17, 2013.

LARSSON, M.C.; DOMINGOS, A.I.; JONES, W.D.; CHIAPPE, M.E.; AMREIN, H.; VOSSHALL, L.B. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. **Neuron**, v.43(5), p. 703–714, 2004.

LEUNER, B.; GOULD, E.; SHORS, T. J. There A Link Between Adult Neurogenesis and Learning? **Hippocampus**, v.12, n. 5, p. 578–584. 2002.

LEVENSON, J. M.; SWEATT J. D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. **Cell. Mol. Life Sci.**, vol. 63, p. 1009–1016, 2006.

LICHTINGHAGEN R, MUSHOLT PB, LEIN M, ROMER A, RUDOLPH B, KRISTIANSEN G, et al. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol*. 2002;42(4):398-406.

LICIER, S. R.; MIRANDA, E. SERRANO, H. A Quantitative Proteomics Approach to Clinical Research with Non-Traditional. *Proteomes*, vol. 4, p. 31, 2016.

LIN SL, MILLER JD, YING SY. Intronic microRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(4):26818.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, vol. 76, n. 14, p. 4193–4201, 2004.

LO, S. H. Focal adhesions: what's new inside. **Developmental Biology**, v. 294, p. 280–291, 2006.

LOCKE M.; NOBLE E, G.; ATKINSON B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**, vol. 258, p. C723-C729, 1990.

LORENZ, M. W.; KELLNER R.; HOFFMANN K. H. A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 21103–21108, 1995.

LU P.; VOGEL C.; WANG R.; YAO X.; MARCOTTE E. M. **Nat Biotechnol**, vol. 25, p. 117–124, 2007.

LUBEC, G.; KRAPPENBAUER, K.; FOUNTOULAKIS, M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 69, p.193-211, 2003.

LUBEC, G.; KRAPPENBAUER, K.; FOUNTOULAKIS, M. Proteomics in brain

LUCAS, P.; PEZIER, A. DAG, calcium and chloride: partners involved in insect olfactory transduction. 17th ECRO, Granada, Spain, **Chem. Senses**, v. 31, p. E81, 2006.

LUNDQUIST, C. T., NÄSSEL, D. R. Peptidergic activation of locust dorsal unpaired median (DUM) neurons: depolarization induced by locust tachykinins may be mediated by cyclic AMP. **Journal of Neurobiology**, v. 33, p. 297–315, 1997.

MAIDA, R., REDKOZUBOV, A. AND ZIEGELBERGER, G. Identification of PLC beta and PKC in pheromone receptor neurons of *Antheraea polyphemus*. **Neuroreport**, v. 11, p. 1773-1776, 2000.

MANN, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, vol. 7, p. 952–958, 2006.

MARTIN, T.F. Prime movers of synaptic vesicle exocytosis. **Neuron**, v. 34, p. 9-12, 2002.

MARTINAC A, FILIPOVIC-GRCIC J, PERISSUTTI B, VOINOVICH D, PAVELIC Z. Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: swelling study and evaluation of in vitro drug release properties. **J Microencapsul**. Vol. 22(5), p. 549-61, 2005.

MATSUMOTO, R. MENZEL, J.C. SANDOZ, M. GIURFA, Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: a step toward standardized procedures. **J. Neurosci. Methods**, vol. 211, p. 159–167, 2012.

MATSUMOTO, Y.; SANDOZ, J.C.; JEAN-MARC DEVAUD, J.M; LORMANT, F.; MIZUNAMI, M.; GIURFA, M. Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee. **Learn. Mem.**, v. 21, p. 272–286, 2014.

membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. **Proteomics**, vol. 5(17), p. 4510-24, 2005.

MENZEL, R. Learning in honey bees in an ecological and behavioral context. Em: HÖLLDOBLER, B.; LINDAUER, M. (eds) **Experimental behavioral ecology and sociobiology**, p. 55–74, 1985.

MENZEL, R. The Honeybee as a model for understanding the basis of cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v.13, p. 758-768, 2012.

MENZEL, R.; GIURFA, M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 5, n.2, p. 62-71, 2001.

MENZEL, R.; HEYNE, A.; KINZEL, C.; GERBER, B.; FIALA, A. Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. **Behav. Neurosci.**, v. 113, p. 744-754, 1999.

MENZEL, R.; LEBOULLE, G.; EISENHARDT, D. Small Brains, Bright Minds. **Cell**, v. 124, p. 237-239, 2006.

MERCER, A.R.; MENZEL, R. The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. **J. Comp. Physiol. A**, v. 145, p. 363-368, 1982.

MERCIER, J.; DOUCET, D.; RETNAKARAN, A. Molecular physiology of crustacean and insect neuropeptides. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 4, p. 345–359, 2007.

MITRI, C., PARMENTIER, M.-L., PIN, J.-P., et al. Divergent Evolution in Metabotropic Glutamate Receptors - a new receptor activated by an endogenous ligand different from glutamate in insects. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, No. 10, 9313-9320, 2004.

MIZUNAMI, M.; UNOKI, S. MORI, Y. HIRASHIMA, D. et al. Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. **BMC Biology**, v. 7, p. 46, 2009.

MIZUNO, M.; YAMADA, K.; HE, J.; NAKAJIMA, A.; NABESHIMA, T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. **Learn Memory**, v.10, p. 108-115, 2003.

MIZUNO, M.; YAMADA, K.; HE, J.; NAKAJIMA, A.; NABESHIMA, T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. **Learn Memory**, v.10, p. 108-115, 2003.

MOLNAR I, HORVATH C. Reverse-Phase Chromatography of Polar Biological Substances - Separation of Catechol Compounds by High-Performance Liquid-**Chromatography**. **Clin Chem.**; vol. 22(9), p. 1497-502, 1976.

MONJE, F. J.; KIM, E. J.; POLLAK, D. D.; CABATIC, M.; LI, L.; BASTON, A.; LUBEC, G. Focal Adhesion Kinase Regulates Neuronal Growth, Synaptic Plasticity and Hippocampus Dependent Spatial Learning and Memory. **Neurosignals**, v. 20, p. 1–14, 2012.

MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G.; PANTANO, S. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 367-372, 2005.

MOOTHA VK, BUNKENBORG J, OLSEN JV, HJERRILD M, WISNIEWSKI JR, STAHL E, et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. **Cell.**, vol. 15(5), p. 629-40, 2003.

MUELLER L. N.; RINNER O.; SCHMIDT A.; LETARTE S.; BODENMILLER B.; BRUSNIAK M. Y. SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protein profiling. **Proteomics**, v. 7, n.19, p. 3470-3480, 2007.

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.

NAKAGAWA, T.; VOSSHALL, L.B. Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 19(3), p. 284–292, 2009.

NAKATANI, Y., et al. Why the carrot is more effective than the stick: Different dynamics of punishment memory and reward memory and its possible biological basis. **Neurobiol Learn Mem**, 2009.

NÄSSEL, D. R. Insect myotropic peptides: differential distribution of locustatac-hykinin- and leucokinin-like immunoreactive neurons in the locust brain. **Cell Tissue Research**, v. 274, p. 27–40, 1993.

NÄSSEL, D. R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 68, p. 1–84, 2002.

NÄSSEL, D. R. Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review. **Peptides**, v. 20, p. 141–158, 1999.

NÄSSEL, D. R.; LUNDQUIST, C. T.; MUREN, J. E.; WINTHER, A. M. E. An insect peptide family in search of functions: the tachykinin-related peptides. In: COAST, G. M.; WEBSTER, S. G. (Eds.), Recent Advances in Arthropod Endocrinology. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 248–277, 1998.

- 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.
- NICHOLS, D.E.; NICHOLS, C.D. Serotonin receptors. **Chem. Rev.**, v. 108, p. 1614-1641, 2008.
- NIE L, WU G, CULLEY DE, SCHOLTEN JC, ZHANG W. Integrative analysis of transcriptomic and proteomic data: challenges, solutions and applications. **Crit Rev Biotechnol.**, vol. 27(2), p. :63-75, 2007.
- NIEMCZEWSKI B. Observations of water cavitation intensity under practical ultrasonic cleaning conditions. **Ultrason Sonochem.** Vol.14(1), p. 13-8, 2007.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C., WIESCHAUS, E., AND KLUDING, H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. **Rouxs. Arch. Dev. Biol.** 193: 267-282, 1984.
- NUWAL, T.; HEO, S.; LUBEC, G.; BUCHNER, E. Mass spectrometric analysis of synapsins in *Drosophila melanogaster* and identification of novel phosphorylation sites. **Journal of Proteome Research**, vol. 10, p. 541-550, 2011.
- ÖGREN, S. O.; KUTEEVA, E.; TOTTIE, E. E.; HÖKFELT, T. Neuropeptides in learning and memory processes with focus on galanin. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, p. 9–17, 2010.
- OLAFSON, P.U. Molecular characterization and immunolocalization of the olfactory co-receptor Orco from two blood-feeding muscid flies, the stable fly (*Stomoxys calcitrans*, L.) and the horn fly (*Haematobia irritans irritans*, L.). **Insect Mol. Biol.**, 22(2):131–142, 2013.
- OLD W. M.; MEYER-ARENDT K.; VELINE-WOLF L.; PIERCE K. G.; MENDOZA A.; SEVINSKY J. R.; RESING K. A.; AHN N. G. **Mol Cell Proteomics**, vol. 4, p. 1487–1502, 2005.
- PACHECO LF, CARMONA-RIBEIRO AM. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. **J Colloid Interface Sci.** Vol. 258(1), p.146-54, 2003.
- PAGE, R. E. The Spirit of the Hive and How a Superorganism Evolves. In: Honeybee Neurobiology and Behavior. Ed. **Springer**, Cap. 1.1, p. 3-16, 2012.
- PANG, J. X.; GINANNI, N.; DONGRE, A. R.; HEFTA, S. A.; OPITECK, G. J. Biomarker discovery in urine by proteomics. **Journal of Proteome Research**, vol. 1, n. 2, p. 161–169, 2002.
- PAOLETTI, C.; PARMELY, T. J.; TOMOMORI-SATO, C.; et al., Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 103, n. 50, p. 18928–18933, 2006.

PAPASSOTIROPOULOS A, FOUNTOULAKIS M, DUNCKLEY T, STEPHAN DA, REIMAN EM. Genetics, transcriptomics, and proteomics of Alzheimer's disease. **J Clin Psychiatry**, vol. 67(4), p. 652-70, 2006.

PAPKE, R.L., DWOSKIN, L.P., CROOKS, P.A. The pharmacological activity of nicotine and nornicotine on nAChRs subtypes: relevance to nicotine dependence and drug discovery. **J. Neurochem.**, 101, 160-167, 2007.

PATCH, H.M.; VELARDE, R.A.; WALDEN, K.K.; ROBERTSON, H.M. A candidate pheromone receptor and two odorant receptors of the hawkmoth *Manduca sexta*. **Chem Senses**, v. 34(4), p. 305–316, 2009.

PAVLOPOULOS, E.; TRIFILIEFF, P.; CHEVALEYRE, V.; FIORITI, L.; ZAIRIS, S.; PAGANO, A.; MALLERET, G.; KANDEL, E. R. Neuralized1 activates CPEB3: a function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage. **Cell**, v. 147, p. 1369–1383, 2011.

PFLÜGER, H.J.; STEVENSON, P.A. Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. **Arthropod Struct. Dev.**, v. 34, p. 379-396, 2005.

POL, A. N. Neuropeptide Transmission in Brain Circuits. **Neuron**, v. 76, p. 98–115, 2012.

PORZGEN, P., PARK, S.K., HIRSH, J., SONDEERS, M.S., AND AMARA, S.G. The antidepressant-sensitive dopamine transporter in *Drosophila melanogaster*: a primordial carrier for catecholamines. **Mol. Pharmacol.** 59: 83-95, 2001.

PRATAVIEIRA, M.; MENEGASSO, A. R. S.; GARCIA, A. M. C.; 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.

PREMONT, R.T.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. Following the trace of elusive amines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 9474-9475, 2001.

RABILLOUD T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **Electrophoresis**, vol.17(5), p. 813-29, 1996.

RABILLOUD T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **Electrophoresis**, vol.7(5), p. 813-29, 1996.

RAO, P. V.; REDDY, A. P.; LU, X.; et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. **Journal of Proteome Research**, vol. 8, n. 1, p. 239–245, 2009.

RAPPSILBER, J.; RYDER, U.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. **Genome Research**, vol. 12, n. 8, p. 1231–1245, 2002.

REECE, J.; CAMPBELL, N. **Biology**, 6th ed. San Francisco; Benjamin Cummings, 2002.

REIFSCHNEIDER NH, GOTO S, NAKAMOTO H, et al. Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. **J Proteome Res.**, vol. 5(5), p. 1117-32, 2006.

REISINGER, V.; EICHACKER, L. A. Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. **Journal of Proteomics**, vol. 71, p. 277–283, 2008.

research: potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 69, p.193-211, 2003.

RIEMENSPERGER, T., VÖLLER, T., STOCK, P., BUCHNER, E., FIALA, A.: Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. **Curr Biol.** 15:1953-1960, 2005.

ROBERTS, K.M.; FITZPATRICK, P.F. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. **IUBMB Life.** v. 65, p. 350-357, 2013.

ROBERTSON, H.A.; JUORIO, A.V. Octopamine and some related noncatecholic amines in invertebrate nervous systems. **Int. Ver. Neurobiol.**, v. 19, p. 173-224, 1976.

ROEDER, T.; DEGEN, J.; DYCKZKOWSKI, C.; GEWECKE, M. Pharmacology and molecular biology of octopamine receptors from different insect species. **Prog. Brain. Res.**, v. 106, p. 249-258, 1995.

RONGLI, LI.; LAN, ZHANG.; YU, FANG.; BIN, HAN.; XIAOSHAN, LU.; TIANE, ZHOU.; MAO, FENG.; JIANKE, LI. Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. **BMC Genomics**, v. 14, p. 766–778, 2013.

ROSPARS, JEAN-PIERRE.; GU, Y.; GRÉMIAUX, A.; LUCAS, P. Odour Transduction in Olfactory Receptor Neurons. **Chinese Journal of Physiology**, v. 53(6), p. 364-372, 2010.

ROUTTENBERG, A.; REKART, J. L. Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. **Trends in Neurosciences**, v. 28, p. 12–19, 2005.

ROUTTENBERG, A.; REKART, J. L. Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. **Trends in Neurosciences**, v. 28, p. 12–19, 2005.

RYAN, T.A. A pre-synaptic to-do list for coupling exocytosis to endocytosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 18 p. 416-421, 2006.

RYBAK J, KUSS A, LAMECKER H, ZACHOW S, HEGE H, LIENHARD M, SINGER J, NEUBERT K AND MENZEL R. The digital bee brain: integrating and managing neurons in a common 3D reference system. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 4, n. 30, 2010.

SALZER I, GANTUMUR E, YOUSUF A, BOEHM S. Control of sensory neuron excitability by serotonin involves 5HT_{2C} receptors and Ca(2+)-activated chloride channels. **Neuropharmacology**, vol. 110(Pt A), p. 277-86, 2016.

SANDOZ, J. C. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, p. 1–20, 2011.

SANTONI, V., MOLLOY, M., RABILLOUD, T., Membrane proteins and proteomics: unamour impossible? **Electrophoresis**, vol. 21, p. 1054–1070, 2000.

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.

SATTELLE, D. B., HARROW, I.D., HUE, B., PELHATE, M., GEPNER, J.I., HALL, L.M. bungarotoxin blocks excitatory synaptic transmission between cercal sensory neurones and giant interneurone 2 of the cockroach *Periplaneta americana*. **J. Exp. Biol.**, 107, 473, 1983.

SATTELLE, D. B.; BUCKINGHAM, S.D. Invertebrate studies and their ongoing contributions to neuroscience. **Invertebrate Neuroscience**, v. 6, n.1. p. 1–3, 2006.

SCHAGGER H.; VON JAGOW G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Anal Biochem**, vol. 199, p. 223–231, 1991.
SCHAMEL W. W. Two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis. **Curr Protoc Cell Biol**, vol. 6, Suppl. 38, p. 6.10.1–6.10.21, 2008.

SCHROLL, C., RIEMENSPERGER, T., BUCHER, D., EHMER, J., VÖLLER, T., ERBGUTH, K., GERBER, B., HENDEL, T., NAGEL, G., BUCHNER, E., FIALA, A.: Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. **Curr Biol**. 16:1741-1747, 2006.

SCHWAERZEL, M., MONASTIRIOTI, M., SCHOLZ, H., FRIGGI-GRELIN, F., BIRMAN, S., AND HEISENBERG, M. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. **J. Neurosci**. 23: 10495-10502, 2003.

SCHWAERZEL, M., MONASTIRIOTI, M., SCHOLZ, H., FRIGGI-GRELIN, F., BIRMAN, S., HEISENBERG, M.: Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. **J Neurosci**. 23:10495-10502, 2003.

SCHWEIZER, F.E.; RYAN, T.A. The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 16, p. 298-304, 2006.

SELCHO, M., PAULS, D., HAN, K.A., STOCKER, R.F., AND THUM, A.S. The role of dopamine in *Drosophila* larval classical olfactory conditioning. **PLoS ONE** 4: e5897, 2009.

SEOK J, WARREN HS, CUENCA AG, MINDRINOS MN, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, vol. 110(9), p. 3507-12, 2013.

SEYFRIED, N. T.; HUYSENTRUYT, L. C.; ATWOOD III, J. A.; et al. Up-regulation of NG2 proteoglycan and interferon-induced transmembrane proteins 1 and 3 in mouse astrocytoma: a membrane proteomics approach. **Cancer Letters**, vol. 263, n. 2, p. 243–252, 2008.

SHAPIRA, M., et al. Changes in Neuronal Acetylcholinesterase Gene Expression and Division of Labor in Honey Bee Colonies. **Journal of Molecular Neuroscience**, vol. 17, 2001.

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.

SHIIO, Y.; AEBERSOLD, R. Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. **Nat. Protoc.**, vol. 1, p. 139–145, 2006.

SIGG, D.; THOMPSON, C. M.; MERCER, A. R. Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 7148–7156, 1997.

SILVERTHORN, D. **Human Physiology**. San Francisco : Pearson/Benjamin Cummings, 4th ed., 2007.

SIMMONS, D.D., MORLEY, B.J. Differential expression of the alpha 9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in neonatal and adult cochlear hair cells. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, 56, 287-292, 1998.

SINGH R.; CHENIER D.; BERIAULT R.; MAILLOUX R.; HAMEL R. D.; APPANNA V. D. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis and the monitoring of malate- and oxaloacetate-producing enzymes. **J Biochem Biophys Methods**, vol.64, p.189-199, 2005.

SIVARS U, TJERNELD F. Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. **Bba-Gen Subjects.**, vol.474(2), p. 133-46, 2000.

SLEBOS RJ, BROCK JW, WINTERS NF, STUART SR, MARTINEZ MA, LI M, et al. Evaluation of strong cation exchange versus isoelectric focusing of peptides for multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Proteome Res.**, vol. 7(12), p.5286, 2008.

SMITH, B. H.; BURDEN, C. M. A Proboscis Extension Response Protocol for Investigating Behavioral Plasticity in Insects: Application to Basic, Biomedical, and Agricultural Research. **J. Vis. Exp.**, vol. 91, 2014.

STAY, B.; TOBE S.S. The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 277–299, 2007.

STENGL, M.; FUNK, N. W. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.**, v. 199(11), p. 897-909, 2013.

STOCKER RF. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. **Cell Tissue Res.**, vol. 275(1), p. 3-26, 1994.

STRITTMATTER E. F.; FERGUSON P. L.; TANG K.; SMITH R. D. **J Am Soc Mass Spectrom**, vol. 14, p. 980–991, 2003.

- SUDHOF, T. The Presynaptic Active Zone. **Neuron**, v. 75, n. 1, p. 11–25, 2012.
- SUH, J., JACKSON, F.R. *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. **Neuron** 55: 435–447, 2007.
- SUNYER, B.; DIAO, W.; LUBEC, G. The role of post-translational modifications for learning and memory formation. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2593–2602, 2008.
- SWENSEN A. M.; MARDER E. Modulators with convergent cellular actions elicit distinct circuit outputs. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 21, p. 4050–4058, 2001.
- SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research Advance**, 2014.
- TAKAHASHI, M.; ITAKURA, M.; KATAOKA, M. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: regulation of neurotransmitter release by phosphorylation. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p. 41–45. 2003.
- TAKAMORI, S.; HOLT, M.; STENIUS, K.; LEMKE, E.A.; GRØNBORG, M.; RIEDEL, D.; URLAUB, H.; SCHENCK, S.; BRÜGGER, B.; RINGLER, P.; MÜLLER, S.A.; RAMMNER, B.; GRÄTER, F.; HUB, J.S.; DE GROOT, B.L.; MIESKES, G.; MORIYAMA, Y.; KLINGAUF, J.; GRUBMÜLLER, H.; HEUSER, J.; WIELAND, F.; JAHN, R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. **Cell**, v. 127, p. 831–846, 2006.
- TAKEUCHI, H.; YASUDA, A.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SAWATA, M.; MATSUO, Y.; KATO, A.; TSUJIMOTO, A.; NAKAJIMA, T.; KUBO, T. Prepro-tachykinin gene expression in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. **Cell Tissue Research**, v. 316, n. 2, p. 281–293, 2004.
- TALLENT, M. K. Presynaptic inhibition of glutamate release by neuropeptides: use-dependent synaptic modification. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 44, p. 177–200, 2008.
- TANG H.; ARNOLD R. J.; ALVES P.; XUN Z.; CLEMMER D. E.; NOVOTNY M. V.; REILLY J. P.; RADIVOJAC P. **Bioinformatics**, vol. 22 p.481–488, 2006.
- TEMPEL, B.L., LIVINGSTONE, M.S., AND QUINN, W.G. Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 81: 3577–3581, 1984.
- THANY, S.H., TRICOIRE-LEIGNEL, H. Emerging Pharmacological Properties of Cholinergic Synaptic Transmission: Comparison between Mammalian and Insect Synaptic and Extrasynaptic Nicotinic Receptors. **Current Neuropharmacology**, 9, 706–714, 2011.
- The Gene Ontology Consortium, Gene ontology consortium: going forward, **Nucleic Acids Res.**, v. 43, 2015 (D1049–1010 56).
- THELANDER, L. Ubiquitin-mediated proteolysis. **Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry**, 2004.

- THOMPSON A, SCHÄFER J, KUHN K, et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. **Anal. Chem.**, vol. 75, p. 1895–904, 2003.
- THONY, B., AUERBACH, G., AND BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochem. J.** 347: 1-16, 2000.
- TRAYNELIS SF, WOLLMUTH LP, MCBAIN CJ, et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. **Pharmacol Rev.**, vol. 62(3), p. 405-96, 2010.
- 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.
- UNOKI, S., MATSUMOTO, Y., MIZUNAMI, M.: Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. **Eur J Neurosci.** 22:1409-1416, 2005.
- UNOKI, S., MATSUMOTO, Y., MIZUNAMI, M.: Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. **Eur J Neurosci.** 24: 2031-2038, 2006.
- VERGOZ, V., ROUSSEL, E., SANDOZ, J-C., GIURFA, M.: Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. **PLoS One** 2:e288-10.1371/journal.pone.0000288, 2007.
- VERGOZ, V.; ROUSSEL, E.; SANDOZ, J. C.; GIURFA, M. Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. **PLoS One**, v. 2(3), p. 1–10, 2007.
- VERHAERT, P.; UTTENWEILER-JOSEPH, S.; DE VRIES, M.; LOBODA, A.; ENS, W.; STANDING, K.G. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: An Elegant Tool For Peptidomics. **Proteomics**, v. 1, p.118–131, 2001.
- VILIM, F. S.; CROPPER, E. C.; PRICE, D. A.; KUPFERMANN, I.; WEISS, K. R. Release of peptide cotransmitters in Aplysia: regulation and functional implications. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 8105–8114, 1996.
- VIRGINIO, C., GIACOMETTI, A., ALDEGHERI, L., RIMLAND, J.M., ERSTAPPEN, G.C. Pharmacological properties of rat alpha 7 nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. **Eur. J. Pharmacol.**, 445, 153-161, 2002.

VITZTHUM, H., HOMBERG, U. Immunocytochemical demonstration of locust tachykinin-related peptides in the central complex of the locust brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 390, p. 455–469, 1998.

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

VON HEIJNE G. Membrane-protein topology. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, vol. 7, p. 909–18, 2006.

VOSSHALL, L.B.; AMREIN, H.; MOROZOV, P.S.; RZHETSKY, A. AND AXEL, R. A spatial map of olfactory receptor expression in the Drosophila antenna. **Cell**, v. 96, p. 725–736, 1999.

WADDELL, S. Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. **Trends Neurosci.** 33: 457–464, 2010.

WANG Z. J.; XU X. P.; FAN K. Q.; JIA C. J.; YANG K. Q. Sample preparation for two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the identification of *Streptomyces coelicolor* cytoplasmic protein complexes. **J Biochem Biophys Methods**, vol. 70, p. 565–72, 2007.

WANG, G.; WU, W. W.; ZENG, W.; CHOU, C. L.; SHEN, R. F. **J Proteome Res**, vol. 5, p. 1214–1223, 2006.

WANG, P.; TANG, H.; FITZGIBBON, M. P.; MCINTOSH, M.; CORAM, M.; ZHANG, H.; YI E.; AEBERSOLD, R. **Biostatistics** vol. 8, p. 357–367, 2007.

WANG, Y.L.; YANG, M.L.; JIANG, F.; ZHANG, J.Z.; KANG, L. MicroRNA-dependent development revealed by RNA interference-mediated gene silencing of *LmDicer1* in the migratory locust. **Insect Sci.**, v. 20, p. 53–60, 2013.

WANG, Z.; WANG, Q. Q.; ZENG, Z. Gene expression analysis following olfactory learning in *Apis mellifera*. *Mol Biol Rep*, vol. 40, p. 1631–1639, 2013.

WATKINS LK, BONDARENKO PV, BARBACCI DC, et al. Fast C18 solid-phase desalting/delipidation of the human serum apolipoproteins for matrix-assisted laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometric analysis. **J Chromatogr A.**, vol. 840(2), p. 183–93, 1999.

WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Scientific American**, vol. 268, p. 34–41, 1993.

WEN-HUI, W.; ROBIN, L. Cooper Serotonin and Synaptic Transmission at Invertebrate Neuromuscular Junctions. **Exp. Neurobiol.**, v. 21(3), p. 101–112, 2012.

WERNER, T; SWEETMAN, G; SAVITSKI, MF; MATHIESON, T; BANTSCHKEFF, M; SAVITSKI, MM. Ion Coalescence of Neutron Encoded TMT 10-Plex Reporter Ions. **Anal. Chem.**, vol. 86, p. 3594–601, 2014.

WIESE, S.; REIDEGELD, K. A.; MEYER, H. E.; WARSCHIED, B. Protein labeling

WISNIEWSKI, J. R. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. **Anal. Chem.**, vol. 88, p. 5438–5443, 2016.

WISNIEWSKI, J.R. & MANN, M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. **Anal Chem**, vol. 84, p. 2631–2637, 2012.

WITTIG, I.; SCHÄGGER, H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. **Proteomics**, vol. 8, n. 9, p. 3974 – 3990, 2008.

WOJCIK-STANASZEK, L.; GREGOR, A.; ZALEWSKA, T. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 71: p. 103–112, 2011.

WOLSCHIN, F.; MÜNCH, D.; AMDAM, G. V. Structural and proteomic analyses reveal regional brain differences during honeybee aging. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 4027–4032, 2009.

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

WOZNIAK, M. A.; MODZELEWSKA, K.; KWONG, L.; KEELY, P. J. Focal adhesion regulation of cell behavior. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1692, p. 103–119, 2004.

WU X, BREWER G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. **Gene**. vol. 500(1), p. 10–21, 2012.

WU, W. W.; WANG, G.; YU, M. J., KNEPPER, M. A., AND SHEN, R. F. Identification and quantification of basic and acidic proteins using solution-based two-dimensional protein fractionation and label-free or (18) o-labeling mass spectrometry. **J. Proteome Res.**, vol. 6, p. 2447–2459, 2007.

YAMAMOTO I. Nicotine to nicotinoids: 1962 to 1997. **Abstr Pap Am Chem S.**, vol. 214:1-Agro, 1997.

YAMAMOTO, K.; VERNIER, P. The evolution of dopa dopamine systems in chordates. **Front Neuroanat.**, v. 5, p. 21, 2011.

YAMAMOTO, S.; SETO, E.S. Dopamine Dynamics and Signaling in Drosophila: An Overview of Genes, Drugs and Behavioral Paradigms **Exp. Anim.**, v. 63(2), p. 107–119, 2014.

YATES, J. R., 3RD. **Nat. Methods**, vol. 11, p. 347–348, 2014.

YEAT NC, LIN C, SAGER M, LIN J. Cancer proteomics: developments in technology, clinical use and commercialization. **Expert Rev Proteomic.**, vol.12(4), p. 391–405, 2015.

YEOH EJ, ROSS ME, SHURTLEFF SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. **Cancer Cell**, vol. 1(2), p.133-43, 2002.

ZHANG L, XIE J, WANG X, et al. Proteomic analysis of mouse liver plasma

ZHANG LJ, WANG XE, PENG X, et al. Proteomic analysis of low-abundant integral plasma membrane proteins based on gels. **Cell Mol Life Sci.**, vol. 63(15), p. 1790-804, 2006.

ZHANG X, FANG A, RILEY CP, WANG M, REGNIER FE, BUCK C. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics--a review. **Anal Chim Acta.**, vol. 664(2), p. 101-13, 2010.

ZHANG ZJ, PECK SC. Simplified enrichment of plasma membrane proteins for proteomic analyses in *Arabidopsis thaliana*. **Proteomics.**, vol. 11(9), p. 1780-8, 2011.

ZHANG, H.J.; ANDERSON, A.R.; TROWELL, S.C.; LUO, A.R.; XIANG, Z.H.; XIA, Q.Y. Topological and functional characterization of an insect gustatory receptor. **PLoS One**, v.6(8) p. e24111, 2011.

ZHANG, S., YIN, Y., LU, H., GUO, A. Increased dopaminergic signaling impairs aversive olfactory memory retention in *Drosophila*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 370:82-86, 2008.

ZHANG, X.; GAUDRY, Q. Functional integration of a serotonergic neuron in the *Drosophila* antennal lobe. **eLife**, v. 5, p. e16836, 2016.

ZHANG, Y.; VASTENHOUW, N. L.; FENG, J.; et al. Canonical Nucleosome Organization at Promoters Forms During Genome Activation. **Genome Res.**, 2013.

ZHANG, Y.; ZHANG, G.; HUANG, X.; HAN, R. Proteomic Analysis of *Apis cerana* and *Apis mellifera* Larvae Fed with Heterospecific Royal Jelly and by CSBV Challenge. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, e102663, 2014.

ZHENG, Q.; WANG, X.J. GOEAST: a web-based software toolkit for gene ontology enrichment analysis, **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. W358–W363, 2008.

ANEXO I

Tabela 1. Proteínas identificadas em ambos os grupos (controle e REP).

Proteínas Identificadas	Código de Acesso	Escore	Peptídeos (Ion Score)	PM (kDa)	Processo Biológico	Função Molecular
PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 4-like [Apis florea]	gi 380024563	65	VEIANDQGNR (36)	70	Defesa	Nucleotide-binding protein; response to stress
			NQVAMNPNTIFDAK (24)			
			STAGDTHLGGEDFDNR (51)			
PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis mellifera]	gi 110750754	57	LLDQNFGLGLYPEQLLSPSR (24)	23	Biosíntese de proteínas	regulation of translational initiation by eIF2 alpha phosphorylation
			LELCLQPR (30)			
			LSSDGVLTITAPR (47)			
PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like [Apis florea]	gi 380028391	101	VFFDMTADTKPVGR (96)	23	Defesa	Protein folding, protein peptidyl-prolyl isomerization
			FDDENFTLK (30)			
heat shock protein 90 [Apis mellifera]	gi 226446415	103	TLTILDSGIGMTK (32)	83	Defesa	Nucleotide-binding protein; response to stress
			ADLVNNLGTIAK (51)			
			GVVDSIDLPLNISR (68)			
			YHTSASGDEMCSLK (19)			
PREDICTED: heat shock protein 83-like [Apis florea]	gi 380022183	85	EIFLRELISNSSDALDKIR (13)	83	Defesa	Protein folding; response to stress
			ADLVNNLGTIAK (57)			
			EKELSEDEAEIEEEK (16)			
			GVVDSIDLPLNISR (62)			
			LGLGIDEEESVPPEQTTEEIIP LEGDTEDTSR (20)			
PREDICTED: V-type proton ATPase catalytic subunit A-like [Apis florea]	gi 380012277	64	EASIYTGITLSEYFR (28)	68	Metabolismo mitocondrial	ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cell
			ADFDQLHEDIQAFR (62)			
PREDICTED: histone H2B.3-like [Apis mellifera]	gi 110749558	113	QVHPDTGISSK (22)	14	Organização do nucleossomo	DNA binding protein
			AMSIMNSFVNDVFER (80)			

			IAAEASR (19)			
			EIQTAVR (25)			
			LLPGELAK (31)			
PREDICTED: 40S ribosomal protein S7 [Apis mellifera]	gi 110764063	93	SGGAEPDAFEASISQALLELE MNSDLK (50)	22	Biosíntese de proteínas	Translational elongation, enitiation and termination
			TLTAVYDALLEDLVYPVEIV GK (57)			
			TLTAVYDALLEDLVYPVEIV GK (30)			
60S acidic ribosomal protein P1 [Apis mellifera]	gi 297591983	57	AANVDVESYWPGLFAK (34)	12	Biosíntese de proteínas	translational elongation
			ELITNIGSGVGK (43)			
			APAAAPAAAAPASTESAPAK EEK (20)			
PREDICTED: v-type proton ATPase subunit E isoform 3 [Apis mellifera]	gi 66556287	60	LLIVQGLCQLTENHVTIR (60)	26	Transporte	hydrogen ion transporting ATPase activity, rotational mechanism
			AEEEFNIEK (20)			
			QVDLPLVESLLDSVQNAYK (29)			
			LELIAQQLIPDIR (62)			
PREDICTED: ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-like [Apis florea]	gi 380011072	88	TITLEVEASDTIENVK (71)	18	Biosíntese de proteínas	structural constituent of ribosome
			TITLEVEASDTIENVK (47)			
			TLSDYNIQK (27)			
PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis mellifera]	gi 328779675	60	INPENLGSK (23)	22	Biosíntese de proteínas	regulation of translational initiation by eIF2 alpha phosphorylation
			VINIEHTGKPCDAQNEER (60)			
PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2 [Apis mellifera]	gi 110765226	59	ILSSVGIEDGEEK (33)	12	Biosíntese de proteínas	Plays an important role in the elongation step of protein synthesis
			LLSMPVGGGVAVSADAAPV GGTTAPAEK (51)			
PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 3-like [Apis florea]	gi 380030032	106	QKEDIGTVIGIDLGTTYSCVG VYK (23)	106	Ciclo celular	plays a role in facilitating the assembly of multimeric protein complexes inside the ER
			VFAPEEISAMVLGK (43)			
			MKETAEAYLGK (28)			

			GINPDEAVAYGA AVQAGVLS GEQDTDAIVLLDVNPLTMGI ETVGGVMTK (46)			
			SQIFSTASDNQHTVTIQVYEG ERPMTK (79)			
			IVITNDQNR (33)			
PREDICTED: annexin-B9-like [Apis mellifera]	gi 66530530	70	ELHEAISGMGTDEGALIEVLA SLSNYGIR (70)	36	Diferenciação celular	maintenance of cell polarity, basolateral protein localization
PREDICTED: heat shock protein beta-1-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 110757651	67	LGDFSVIDTEFSNIR (45)	26	Defesa	regulation of --kappaB/NF-kappaB signaling
			ESNNFFK (1)			
			DGVLTV EAPLPAIGTGEK (45)			
PREDICTED: 40S ribosomal protein S15 [Apis mellifera]	gi 110757985	92	GVDLDQLLDMPNEQLMVLM HAR (92)	17	Biosíntese de proteínas	translational elongation, initiation and termination, rRNA processing
			TFNQVEIKPEMIGHYLGEFSV TYKPVK (21)			
PREDICTED: 60S ribosomal protein L14 [Apis mellifera]	gi 66565929	70	LVAIVDIIDQNR (40)	18	Ciclo celular	translation, mitotic spindle elongation; negative regulation of neuron apoptotic process
			AWEAANINDLWK (35)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ruvB-like 2-like [Apis florea]	gi 380014308	45	IAGRAILLAGQPGTGKTAIAM GMAQALGDPFTSAGSEIYS LYSK (30)	51	Reparo de DNA	Chromatin regulator
			TAIAMGMAQALGMDTPFTS MAGSEIYSLKMSK (22)			
PREDICTED: dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 328792787	28	RFEPTLEMLADAFETINGK (25)	40	Biosíntese de proteínas	rRNA methylation, transcription from mitochondrial promoter
			RFEPTLEMLADAFETINGK (18)			
PREDICTED: zinc finger protein 836-like [Apis florea]	gi 380030495	30	RFEPTLEMLADAFETINGK (6)	143	Biosíntese de proteínas	sequence specific DNA binding transcription factor activity
			IMEADSTQKSNASTSANK (10)			

PREDICTED: translational activator GCN1-like [Apis mellifera]	gi 66505329	27	LTVATHKISVLQGAGNLSYN AASGSSVER (6)	294	Biosíntese de proteínas	Acts as a translation activator that mediates translational control and perform an EF3-related function on the ribosome by regulating GCN2 protein kinase (EIF2AK1-4) activity
			NPEIQAIVPVLLKALQDPSHK (8)			
PREDICTED: eukaryotic initiation factor 4A-like [Apis mellifera]	gi 328790612	109	LLPHEVQVILLSATMPSDVLD VSK (66)	63	Ciclo celular	mitosis, cellular response to DNA damage stimulus, translational initiation
			DIEQFYNTSIEEMPMNVADLI (66)			
PREDICTED: 60S ribosomal protein L8-like [Apis florea]	gi 380017591	98	ASGNYATVIAHNPDTK (78)	28	Diferenciação celular	compound eye development, translation
			AMVGIVAGGGR (45)			
PREDICTED: 40S ribosomal protein S2 isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328777809	80	STITGIEMFHQTLEAEAGDQ MGALLR (75)	30	Diferenciação celular	cell differentiation, translation
			GTGIVSAPVPK (36)			
PREDICTED: 60S ribosomal protein L23-like [Apis florea]	gi 380028209	59	LPAAGSGDMIVATVK (59)	15	Ciclo celular	translation, neurogenesis, mitotic spindle organization
			LPAAGSGDMIVATVKKGKPE LR (20)			
PREDICTED: 10 kDa heat shock protein, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380014458	41	VLQGTVVAIGPGQR (41)	19	Defesa	Protein folding
			NDKGEHIPLSIK (23)			
PREDICTED: e3 ubiquitin-protein ligase HERC2 [Apis mellifera]	gi 328793081	42	IIDILK (21)	514	Degradação de proteínas	Heme binding
			YSLNGWLGFSHENKSLANG IMHCLENIQSVTPYQK (33)			
			RPNGMPVIAGSVNASILR (19)			
PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis mellifera]	gi 110750766	112	LLDQNFGLGLYPEQLLSNIL DQYILPNR(76)	23	Biosíntese de proteínas	Regulation of translational initiation by eIF2 alpha phosphorylation
			YMIPEQcDIDQVTSSLSSDGV LNITAPR(48)			
			FQVILDVQQFKPDEINVK(39)			

PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328790595	1226	EGYVLGEIK (35)	250	Componente do citoesqueleto	motor activity, actin-dependent ATPase activity; motor activity
			VIAYFATVGASTK (65)			
			KGSLEDQVVQTNPVLEAFGN AK (39)			
			LAGADIETYLLEK (89)			
			ITAAVMHMGGMK (16)			
			VISQQALER (35)			
			EQLNNLMTTLR (52)			
			IEDELAALEEK (49)			
			ELEEQNSK (35)			
			ADLESQQLDLNDR (51)			
			DIEDLELNLQK (32)			
			NLNDEIAHQDELINK (30)			
			IKLEHTLDELEDSLRL (84)			
			ELEQTIQR (31)			
			LEDEQSLVGK (21)			
			IEEEEEIEAER (52)			
			ELEELGER (21)			
			LEEAGGATSAQIELNK (84)			
			DLEEANIQHETTLANLR (105)			
			HNDVAEMGEQIDTLNK (34)			
			ASVDQLSNEK (85)			
			LSIENSDLLR (69)			
			QLEEAESQVNQLSK (86)			
			ISLTTQLEDTKR (37)			
			LADEESR (29)			
			EQVEEEAEGK (44)			
			ANAEAQLWR (45)			
			LAEAEETIESLNQK (98)			

			LSTEVEDLQIEVDR (83) ATAIANAEEK (66) LEAEKDELQAALAEAEAALE QEENK (139) ALDSMQASLEAEAK (76) TLLEQADR (40) AQQELEEAEER (35) KLEAELQTLHSDLDELLNEA K (34) LSIENSDLLR (85)			
PREDICTED: fatty acid synthase-like [Apis mellifera]	gi 328787941	352	LLIAMEEGIIPGNLHFK (33) TIMDSNLQLGAMAAVGLSW EEIAAR (25) IVNSSGVAFHSK (51) YVAPVGQK (23) MLLNIPAPILK (55) LQYAAINPIVHLDFIK (67) GLATTVVADPDFMWK (57) LINEGIESGAVRPLPSTVFSEQ QIEQSFR (84) ESNELAPIGGIFNLA AVL R (45) VSVVEAVANIMGIK (55) HLQLDLQNEESLQVEHANIN VLYR (79)	262	Metabolismo mitochondrial	reductase activity, hydrolase activity, malonyltransferase activity, shyntase activity, dehydratase activity
PREDICTED: fatty acid synthase-like [Apis florea]	gi 380012271	85	LEDGGAKTSYVFIQDKNLPK (19) ESNELAPIGGIFNLA AVL R (85)	262	Metabolismo mitochondrial	reductase activity, hydrolase activity, malonyltransferase activity, shyntase activity, dehydratase activity
PREDICTED: malate dehydrogenase,	gi 66513092	199	VAILGASGGIGQPLSLLMK	36	Metabolismo	NADH metabolic process,

mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]			(61) QSPLVTELSLYDVVNTPGVA ADLSHMDTPAK (35) QSPLVTELSLYDVVNTPGVA ADLSHMDTPAK (51) DDLSTNASIVR (38) AFIAIISNPVNSTVPIASEVLK (42) AFIAIISNPVNSTVPIASEVLK K (31) VFGVTTLDIVR (52) ANTFIAEAK (32) VKALTMRIQEAGTEVVK (1) IQEAGTEVVK (22) NLGIGNLNAYEK (33) ELLNAAIPELK (28)		mitochondrial	gluconeogenesis
PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380030605	195	VAILGASGGIGQPLSLLMK (111) QSPLVTELSLYDVVNTPGVA ADLSHMDTPAK (38) VFGVTTLDIVR (69) IQEAGTEVVK (36) AGTGSATLSMAYAGAR (67)	36	Metabolismo mitochondrial	NADH metabolic process, gluconeogenesis
PREDICTED: elongation factor 1-alpha-like [Apis florea]	gi 380025554	422	EAQEMGK (16) IGYNPAAVAFVPISGWHGDN MLEVSSK (131) CLIEALDAILPPTRPTDK (57) IGGIGTVPVGR (52) VETGVLPKPGMVVTFAPAGLT TEVK (114) SGDAAIVMLVPSKPMCVEAF QEFPLGR (145)	50	Biosintese de proteínas	Involved with synthesis elongation

			QTVAVGVK (42)			
			KIGYNPAAVAFVPISGWHGD NMLEVSSK (28)			
RecName: Full=Elongation factor 1- alpha; Short=EF-1-alpha	gi 119142	66	TLIEALDAILPPSRPTDK (18) VETGILKPGMLVTFAPAALTT EVK (23) IGGIGTVPVGR (42)	51	Biosintese de proteínas	Involved with synthesis elongation
EF1-alpha F2 copy [Apis dorsata]	gi 48596561	200	NMITGTSQADCAVLIVAAGT GEFEAGISK (104) IGYNPAAVAFVPISGWHGDN MLEVSSK (96) CLIEALDAILPPTRPTDK (65)	20	Biosintese de proteínas	Involved with synthesis elongation
glutamine synthetase [Apis mellifera]	gi 283436154	79	ESPNAALDK (21) YLDLPQPENK (18) HPSDLPIWTFDGSSTYQADG ANSDFILCPVAIYNDPFR (38) LVLCDTYYSDMTPTTSNKR (19) CNQAMEAIKDEDPWFGIEQE YTFLDFDGRPLGWPK (61)	41	Metabolismo citoplasmático	L-asparagine biosynthetic process;
PREDICTED: ATP-citrate synthase isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66530142	113	FVTITEGVNWTDIINDYPWLQ TER (30) EAGAYVPDSFDNLGDLMT VYSNLVK (37) DLVSSLVSGLLTIGDR (66) DLVSSLVSGLLTIGDR (45)	120	Metabolismo mitocondrial	lipid biosynthesis, ATP catabolic process, coenzyme A metabolic process, energy reserve metabolic process
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ATP-citrate synthase-like [Apis florea]	gi 380021157	127	EAGAYVPDSFDNLGDLMT VYSNLVK(70) DLVSSLVSGLLTIGDR(88)	120	Metabolismo mitocondrial	lipid biosynthesis, ATP catabolic process, coenzyme A metabolic process, energy reserve metabolic process
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glycogen phosphorylase-like	gi 380012845	101	TSDGHPFQNIEMDLTLPAEK (56)	150	Metabolismo citoplasmático	activate the first metabolic step of glycolysis

[Apis florea]			SQIDQNLALVQSK (70)			
PREDICTED: peroxiredoxin 1-like [Apis florea]	gi 380024788	47	KQGGLGEMNIPLADK (9)	22	Defesa	cell redox homeostasis; protection against oxidative stress
			QITINDLPVGR (47)			
TPX protein [Apis cerana cerana]	gi 314991296	69	ADEFEQIGCK (52)	22	Defesa	antioxidant activity, peroxiredoxin activity
			LIAASTDSHFSLAWVNTPR (33)			
PREDICTED: peroxiredoxin-6-like [Apis florea]	gi 380027803	43	INSIVPNFEADTTQGGQINFYD WQGDSWVVLFSHPADFTPV CTTELGR (43)	25	Defesa	phospholipid catabolic process, hydrogen peroxide catabolic process
			VSMPSGKVYVR (19)			
PREDICTED: ATP synthase subunit gamma, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380022713	88	LFANNILFVASEVGR (88)	33	Metabolismo mitochondrial	ATP catabolic process, ATP synthesis coupled proton transport, phagocytosis
			MTAMDNASK (20)			
PREDICTED: dihydropyrimidinase- like [Apis florea]	gi 380014889	68	TISAQTHVQAVDFNIFEGME VHGVP EYVIVEGR(35)	66	Metabolismo citoplasmatico	uracil catabolic process, thymine catabolic process, protein homotetramerization, beta- alanine metabolic process
			LLDAGVTGPEGHEMSRPEEV EAEAVNR(29)			
			KVPIHLQSAQNR(18)			
PREDICTED: dihydropyrimidinase- like [Apis mellifera]	gi 328786372	47	KVPIHLQSAQNR (32)	76	Metabolismo citoplasmatico	uracil catabolic process, thymine catabolic process, protein homotetramerization, beta- alanine metabolic process
			LLDAGVTGPEGHEMSRPEEV EAEAVNR (29)			
			KGVIAVGSDADIVVWDPNR (25)			
PREDICTED: phosphoglycolate phosphatase-like [Apis mellifera]	gi 48141571	66	TLMDSIDVVLSDCDGVLWR (40)	34	Metabolismo citoplasmatico	dephosphorylation, carbohydrate metabolic process
			KCNLDNYDATIDEIVCTSFLA AVYLKEK (11)			
			NFKPDPEVGAVVIGFDKDFSF PK (57)			
PREDICTED: alkyldihydroxyacetonephosphate synthase-like [Apis mellifera]	gi 328777397	61	ASCGPDFDHMILGSEGTLGII TEVVIK (48)	46	Metabolismo citoplasmatico	Catalyzes the exchange of an acyl for a long-chain alkyl group and the

			LMDNEQFQFGQMLRPESNW PGLILQGLK (31)			formation of the ether bond in the biosynthesis of ether phos
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: E3 ubiquitin-protein ligase HERC2-like [Apis florea]	gi 380019055	52	KSPLPMSPLVAQLIEMGFHK (19)	532	Degradação de proteínas	Heme binding
			IIDILK (19)			
			MSSSAMS VIAATLTSTNAQIV GEGVASDR (30)			
			TGSPLSLNLAEPVWK (20)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glycogen phosphorylase isoform 2 [Apis mellifera]	gi 328781343	81	TSDGHPFQNIEMDLTLPAEK (52)	150	Metabolismo citoplasmático	Carbohydrate metabolic process; small molecule metabolic process
			SQIDQNLALVQSK (54)			
fatty acid binding protein [Apis mellifera]	gi 27531025	136	LYSENFDDEFMK (75)	15	Transporte	Fatty acid transportation
			LGEEFEEETVDGR (71)			
			SVCTLDGNK (22)			
			VDDICTR (41)			
PREDICTED: peroxiredoxin-5, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 328787790	181	IPTIDLFEDSPTNK (71)	20	Defesa	cell redox homeostasis; protection against oxidative stress
			MLADPAAQFTDALELSVDLP VLGGK (82)			
			MLADPAAQFTDALELSVDLP VLGGK (75)			
PREDICTED: peroxiredoxin-5, mitochondrial-like isoform 1 [Apis floreia]	gi 380021497	72	IPTIDLFEDSPTNK(72)	20	Defesa	cell redox homeostasis; protection against oxidative stress
			GISEIFCISVNDPFVMAAWGK (12)			
PREDICTED: elongation factor 2-like [Apis florea]	gi 380025011	48	STLTDSLVS (19)	95	Ciclo Celular	positive regulation of gene expression; GTPase activity
			LMEPVYLCEIQCPETAVGGIY GVLNR (45)			
PREDICTED: elongation factor Tu, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66518853	87	STITGIEMFHQTLEAEAGDQ MGALLR (87)	52	Ciclo Celular	Golgi organization, cell proliferation
			DEVRRGMVLCKPGTMK (19)			
PREDICTED: elongation factor Tu, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380018679	87	STITGIEMFHQTLEAEAGDQ MGALLR (87)	52	Ciclo Celular	Golgi organization, cell proliferation

			KEAEA (23)			
PREDICTED: 40S ribosomal protein S3a-like [Apis florea]	gi 380022797	85	MVDTITNDVTK (47)	30	Ciclo Celular	Cell differentiation, cytoplasmic translation, oogenesis
			LLELHGDGAGSK (59)			
			SEEVGESGSK (22)			
PREDICTED: tubulin alpha-2 chain-like [Apis mellifera]	gi 328778269	169	EDAANNYAR (31)	53	Ciclo Celular	Mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint; ATP binding
			NLDIERPTYTNLNR (20)			
			LIGQIVSSITASLR (91)			
			LIGQIVSSITASLR (42)			
			FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR (64)			
			VGINYQPPTVVPGGDLAK (40)			
PREDICTED: tubulin alpha-1 chain-like [Apis mellifera]	gi 328787562	332	EDLAALEK (22)	53	Ciclo Celular	Mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint; ATP binding
			AVFIDLEPTVVDEV (70)			
			EDAANNYAR (38)			
			EIVDLVLDR (34)			
			NLDIERPTYTNLNR (45)			
			LIGQIVSSITASLR (74)			
			FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR (102)			
			AYHEQLSVAEITNACFEPAN QMVK (61)			
			DVNAAIATIK (39)			
			TIQFVDWCPTGFK (66)			
Cluster of PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial [Apis mellifera] (gi 48095960)	gi 48095960	97	EDLAALEK (21)	18	Metabolismo mitocondrial	Respiratory electron transport chain, small molecule metabolic process, positive regulation of cell cycle, oxidation-reduction process
			TNLDHWEFR (44)			
			LAAMDLPDPSIICAALR (40)			
			LAAMDLPDPSIICAALR (52)			
			EIYPYILQEIKPTLDELGINTIE ELGYDKPELALQSIDDH (32)			

PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 48095960	55	VKEIYPYILQEIKPTLDELGIN TIEELGYDKPELALQSIDDIH (49)	18	Metabolismo mitochondrial	respiratory electron transport chain, small molecule metabolic process, positive regulation of cell cycle, oxidation-reduction process
			EIYPYILQEIKPTLDELGINTIE ELGYDKPELALQSIDDIH (29)			
PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380025855	68	TNLDHWEFR (41)	18	Metabolismo mitochondrial	respiratory electron transport chain, small molecule metabolic process, positive regulation of cell cycle, oxidation-reduction process
			LAAMDLPDPSSIICAALR (54)			
PREDICTED: protein disulfide-isomerase [Apis mellifera]	gi 328790461	86	VFLEVGNVDDHVFVISNND K (17)	84	Defesa	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress; glycerol ether metabolic express, cell redox homeostasis
			YKPEKPEISSENVLEFVTAFIE GK (66)			
PREDICTED: protein disulfide-isomerase-like [Apis florea]	gi 380017817	49	YKPEKPEISSENVLEFVTAFIE GK (49)	89	Defesa	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress; glycerol ether metabolic express, cell redox homeostasis
			TILKANCEEAMYCLKPWCIE VVDSQQEVNK (20)			
RecName: Full=Major royal jelly protein 1; Short=MRJP-1;	gi 20138866	1492	FFDYDFGSDER (61)	49	Defesa	Caste determination, defense against microorganism infection
			RQDAILSGEYDYK (42)			
			NNYPSDIDQWHDK (67)			
			NNYPSDIDQWHDK (57)			
			IFVTMLR (28)			
			KVGDGGPLLQPYPDWSFAK (56)			
			VGDGGPLLQPYPDWSFAK (134)			
			VGDGGPLLQPYPDWSFAK (36)			

			YDDCSGIVSASK (21)			
			YDDCSGIVSASK (68)			
			LLTFDLTTSQLLK (87)			
			LSSLAVQSLDCNTNSDTMVY IADEK (48)			
			LSSLAVQSLDCNTNSDTMVY IADEK (203)			
			GEGLIVYHNSDDSFHR (96)			
			GEGLIVYHNSDDSFHR (77)			
			LTSNTFDYDPK (77)			
			TSDYQQNDIHYEGVQNILDT QSSAK (174)			
			SGVLFFGLVGDSALGCWNEH R (150)			
			TVAQSDETLQMIASMK (124)			
			TVAQSDETLQMIASMK (90)			
			EALPHVPIFDR (65)			
			EYILVLSNK (38)			
			EYILVLSNK (30)			
			MVNNDNFDDVNFR (128)			
			IMNANVNELILNTR (126)			
			CENPDNDR (29)			
major royal jelly protein MRJP1 precursor [Apis cerana]	gi 40557703	180	LLTFDLTTSQLLK (77)	49	Defesa	Caste determination, defense against microorganism infection
			YNGVPSSLNVISK (56)			
			IFVTMLR (31)			
			GEGLIVYHSDNSFHR (102)			
APD-3-like protein [Apis mellifera]	gi 290578564	126	LQEGASSLGSSALGASYAAG SAAAAGAAGVQQIVSGGVIG GR (126)	24	Transporte	Protein transporter activity
			ADIGPAEGPK (20)			

RecName: Full=Major royal jelly protein 2; Short=MRJP-2; AltName: Full=Bee-milk protein; Flags: Precursor	gi 20138892	922	SLNVIHEWK (47)	51	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
			YFDYDFGSEER (56)			
			RQAAIQSGEYDHTK (19)			
			QAAIQSGEYDHTK (55)			
			QAAIQSGEYDHTK (86)			
			NYPFDVDQWR (54)			
			TFVTILR (28)			
			YDGVSTLNVISGK (62)			
			LLKPYPDWSFAEFK (55)			
			LLKPYPDWSFAEFK (74)			
			LHVFDLK (18)			
			LHVFDLKTSNHLK (10)			
			GGLVSLAVQAIDLANLTVYM ADHK (133)			
			GDALIVYQNADDSFHR (68)			
			GDALIVYQNADDSFHR (80)			
			LTSNTFDYDPR (38)			
			MTIDGESFTLK (52)			
			SQFGENNVQYQGSSEDILNTQ SLAK (154)			
			TLQMIAGMK (58)			
			IKEELPHFVGSNKPVK (33)			
			IKEELPHFVGSNKPVKDEYM LVLSNR (100)			
			IVNDDFNFDDEVNFR (104)			
			IVNDDFNFDDEVNFR (64)			
			ILGANVK (27)			
TPA_exp: major royal jelly protein 7 [Apis mellifera]	gi 40949637	53	NLKNLTK (21)	51	Desconhecida	caste determination, influence by environmental factors
			NYPFDVDQWR (53)			

major royal jelly protein MRJP2 [Apis cerana cerana]	gi 40218301	76	RQAAIQSGEYDHTK (16)	53	Desconhecida	caste determination, influence by environmental factors
			QAAIQSGEYDHTK (37)			
			MTINGESFTLK (50)			
			TLQMIAGMK (49)			
MRJP5 [Apis mellifera]	gi 284812514	110	MDTMDTMDR (42)	70	Desconhecida	caste determination, influence by environmental factors
			QAAIQSGEYDHTK (31)			
			NYPFDVDQWR (28)			
			LTSNTFDYDPK (66)			
PREDICTED: major royal jelly protein 5-like [Apis florea]	gi 380022673	61	QAAIQSGEYDHTK (59)	34	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
			LWVLDSGLINNIQLICSPK (3)			
PREDICTED: major royal jelly protein 5-like [Apis florea]	gi 380022691	52	QAAIQSGEYDHTK (33)	74	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
			ILGANVNDLIMNTR (43)			
PREDICTED: major royal jelly protein 3-like [Apis florea]	gi 380022658	102	QAAIQSGEYDHTK (42)	63	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
			LTSNTFDYDPR (62)			
major royal jelly protein MRJP5 precursor [Apis cerana]	gi 42601246	163	RQAAIQSGEYDHTK (24)	68	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
			QAAIQSGEYDHTK (89)			
			LTSNTFDYDPK (74)			
			MDRMDIMDKMNK (19)			
major royal jelly protein MRJP5 [Apis cerana cerana]	gi 40218299	163	RQAAIQSGEYDHTK (24)	71	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutritions
			QAAIQSGEYDHTK (69)			
			NYPFDVDR (26)			
			LTSNTFDYDPK (74)			
			MDRMHTMDTMYRMDR (19)			
PREDICTED: major royal jelly protein 2-like [Apis florea]	gi 380022669	66	IKWVFMVACLGITCQGATVR (16)	49	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
			NYPFDVDQWR (66)			
major royal jelly protein [Apis mellifera]	gi 288872651	237	HIDFDFGSDER (7)	62	Desconhecida	caste determination, influence by environmental factors
			GGPLLRPYPDWSFAK (25)			
			YEDCSGIVSAFK (51)			

			IAVDKFDR (26) LWVLD SGLVNNNQPM CSPK (52) QVEIPHNI AVNATTGMGELV SLAVQAIDR (35) TNTMVYIADEK (30) GEGLIMYQNSDDSFHR (25) LTVAGESFTVK (31) NGVLFLGLVGNSGIACVNEH QVLQR (23) ESFDVVAQNEETLQMIVSMK (58) IMENLPQSGR (34) INDPEGNEYMLALSNR (47) IINNDNFNDVNFR (76)			
PREDICTED: major royal jelly protein 3-like, partial [Apis mellifera]	gi 328794347	480	DPQYEENNVQYEGSQDILNT QSFGK (93) NGVLFLGLVGNSGIACVNEH QVLQR (50) ESFDVVAQNEETLQMIVSMK (106) INDPEGNEYMLALSNR (80) YHNQNAGNQNAGNQNAGN QNADNQNV DNQ NANNQNA DNQNANK (32) IMENLPQSGR (47) GEGLIMYQNSDDSFHR (54)	43	Nutrição	Plays an important role in honeybee nutrition
major royal jelly protein 3 [Apis cerana]	gi 56422037	120	IAVDKFDR (26) LWVLD SGLVNNNQPM CSPK (52) LTVAGESFTVK (31)	69	Nutrição	caste determination, influence by environmental factors

			IINNDNFNDVNFR (76)			
PREDICTED: probable citrate synthase 2, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380027359	97	SKYWEYVYEDIMNLIK (64)	52	Metabolismo mitocondrial	cellular carbohydrate metabolic process
			YWEYVYEDIMNLIK (53)			
PREDICTED: 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328790551	99	IILLEAVLETIR (76)	57	Neurotransmissão	Catalyzes the conversion of gamma-aminobutyrate and L-beta-aminoisobutyrate to succinate semialdehyde and methylmalonate semialdehyde, respectively. Can also convert delta-aminovalerate and beta-alanine
			LMNLQNEFSTMINSVRGR (22)			
PREDICTED: 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380023176	68	SLFQELNAIQASSVQFFADY EK (31)	57	Neurotransmissão	neurotransmitter secretion; synaptic transmission; protein homodimerization activity
			ILLEAVLETIR (63)			
			LMNLQNEFSTMINSVR (24)			
unnamed protein product [Apis mellifera]	gi 311818750	99	LLLTEILR (37)	61	Desconhecida	Unknow
			LTALGRPQLLLQLSEVIMR (39)			
			EGVIHLFPWSGILDENYELSE TFQVPDIK (69)			
peroxiredoxin-like protein [Apis mellifera]	gi 283436152	77	LDMIDEISKDDPEQALTVR (77)	25	Defesa	Protection against oxidative stress
			VMILPTVKDEELPK (20)			
RecName: Full=Major royal jelly protein 4; Short=MRJP-4; AltName: Full=Bee-milk protein; AltName: Full=Royal jelly protein RJP57-2; Flags: Precursor	gi 20138954	49	QAAIQSGEYDR (10)	53	Nutrição	May play an important role in honeybee nutrition
			YEDCSGIVSAHK (29)			
			SENQGNDVQYER (46)			
PREDICTED: major royal jelly protein 4-like [Apis florea]	gi 380022660	64	YEDCSGIVSAHK (60)	56	Nutrição	May play an important role in honeybee nutrition
			QAAIQSGEYDR (22)			
RecName: Full=Prohormone-4; Contains: RecName: Full=Brain peptide	gi 190360039	77	RPPVEETASFLQSLASHGPN YLEK (68)	22	Modulação do cérebro	Neuropeptide regulating brain functioning

IDLSRFYGHFNT; Contains: RecName: Full=Brain peptide IDLSRFYGHFN; Contains: RecName: Full=Brain peptide IDLSRFYGHF; Contains: RecName: Full=Brain peptide DLSRFYGHFNT; Contains: RecName: Full=Brain peptide DLSRFYGHFN; Contains: RecName: Full=Brain peptide DLSRFYGHF; Flags: Precursor			DTLKPLGGVNTVAIALSESQT IEDFGAALHLLR (40)			
PREDICTED: uncharacterized protein C6orf168 [Apis mellifera]	gi 328784030	90	GALPFVELNGEEIADSTIILR (72) IPNGILNFFFK (48)	46	Defesa	GST superfamily; detoxification
chemosensory protein 3 [Apis mellifera]	gi 112031581	107	VLPDALATDCKK (48) FDNINVDEILHSDR (84)	15	Comunicação química	Pheromone transporter
PREDICTED: protein FAM151B-like [Apis mellifera]	gi 110756296	68	TLEGSAMMLEADVVLGK (56) MINTLTEQQVTQSVTPVR (35)	35	Desconhecida	Unknow
PREDICTED: calerythrin isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328776808	65	QGADTDQDGQVSR (65) EEWFQLWEEYAK (39)	21	Desconhecida	calcium ion binding
PREDICTED: tubulin beta-4 chain-like [Apis florea]	gi 380021994	153	INVYYNEASGGK (44) AILVDLEPGTMDAVR (31) GHYTEGAELVDSVLDVVR (61) MSATFIGNSTAIQELFK (97)	50	Comoponente do Componente do Citoesqueleto	Is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP
PREDICTED: actin, clone 205-like [Apis mellifera]	gi 328790797	660	AGFAGDDAPR (48) HQGVMVGMGQK (62) HQGVMVGMGQK (21) DSYVGDEAQS (48) YPIEHGIITNWDDMEK (53) IWHHTFYNELR (58) VAPEEHPVLLTEAPLNPK (100)	42	Componente do Componente do Citoesqueleto	structural constituent of cytoskeleton

			TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEG YALPHAILR (102) GYSFTTTAER (47) LCYVALDFEQEMATAAASTS LEK (152) LCYVALDFEQEMATAAASTS LEK (118) SYELPDGQVITIGNER (100) CPEALFQPSFLGMESCGIHET VYNSIMK (36) EITALAPSTIK (26) IIAPPER (21) QEYDESGPGIVHR (25)			
actin related protein 1 [Apis mellifera]	gi 297591985	487	AGFAGDDAPR (48) AGFAGDDAPR (1) HQGVMVGMGQK (62) HQGVMVGMGQK (21) DSYVGDEAQS (48) IWHHTFYNELR (58) VAPEEHPVLLTEAPLNPK (100) TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEG YALPHAILR (102) GYSFTTTAER (47) LCYVALDFEQEMATAAASSS LEK (35) LCYVALDFEQEMATAAASSS LEK (82) SYELPDGQVITIGNER (100) EITALAPSTMK (43) IIAPPER (21)	42	Componente do Componente do Citoesqueleto	axcytoskeleton organization

			QEYDESGPSIVHR (43)			
PREDICTED: actin, clone 403-like [Apis florea]	gi 380014273	215	AGFAGDDAPR (54)	42	Componente do Componente do Citoesqueleto	cytoskeleton organization
			DSYVGDEAQS (48)			
			TTGIVLDSDGVSHTVPIYEG YALPHAILR (82)			
			GYSFTTTAER (48)			
			SYELPDGQVITIGNER (100)			
PREDICTED: actin, indirect flight muscle-like [Apis mellifera]	gi 110757102	78	EITALAPSTIK (29)	12	Componente do Componente do Citoesqueleto	structural constituent of cytoskeleton
			IIAPPERKYSVWIGGSILASLS TFQQMWISK (60)			
			QEYDESGPGIVHR (29)			
PREDICTED: tubulin alpha-1 chain- like [Apis mellifera]	gi 66535209	118	AVFIDLEPTVVDEV (70)	50	Ciclo celular	mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint; ATP binding
			LIGQIVSSITASLR (77)			
			IWHHTFYNELR (70)			
PREDICTED: tubulin alpha chain- like [Apis mellifera]	gi 328783652	81	FDGALNVDLTEFQTNLVPYP R (38)	52	Ciclo celular	mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint; ATP binding
			FDGALNVDLTEFQTNLVPYP R (61)			
			AFVHWYVGEGMEEGEFAEA R (25)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: myosin heavy chain, muscle-like [Apis florea]	gi 380023203	53	GGGFSTVSSSYR (17)	250	Componente do Citoesqueleto	motor activity, actin- dependent ATPase activity; cell motility
			ASVDQLSNEK (25)			
			QLQHQLNETQGK (7)			
			ATAIANAAEK (45)			
PREDICTED: myosin regulatory light chain 2 [Apis mellifera]	gi 328777082	52	ELDDMLNEAPAPINFTQLNL FASR (18)	31	Componente do Citoesqueleto	Cell motility
			GFIDTQSLIAMLTGQEDEDEE (52)			
PREDICTED: myosin regulatory light chain 2-like [Apis florea]	gi 380024235	180	QEYDESGPGIVHR (30)	27	Componente do Citoesqueleto	Cell motility
			ATFDNVGR (44)			

			LVTDKELDDMLNEAPAPINF TQLLNLFASR (121)			
			ELDDMLNEAPAPINF TQLLNLFASR (73)			
PREDICTED: tropomyosin-1-like [Apis mellifera]	gi 66522386	108	LAEASQAADSSR (74)	32	Componente do Citoesqueleto	dendrite morphogenesis, cell motility
			SLEVSEK (26)			
			ADKVNEEVGELQK (3)			
			ALTNAESEVAALNR (52)			
			VQLIEEDLER (19)			
			KLAFVEDELEVAEDR (19)			
			IMELEEELK (47)			
PREDICTED: myosin light chain alkali-like isoform 4 [Apis mellifera]	gi 328777788	47	AEFAFSIYDADGTNVIDAIDL GNVLR (46)	17	Componente do Citoesqueleto	muscle system process, flight
			LDEFLPIYSQCK (25)			
PREDICTED: paramyosin, long form-like [Apis florea]	gi 380029535	71	SLVEASLHQVESELESVR (71)	102	Componente do Citoesqueleto	motor activity
			IQLEEESEAR (12)			
			IVKIEAIKK (3)			
PREDICTED: calmodulin-like [Apis florea]	gi 380022715	205	EAFSLFDKDGDTITTK (81)	17	Transdução de sinal	Calcium binding protein
			SLGQNPTAEELQDMINEVDA DGNGTIDFPEFLTMMAR (153)			
			ELGTVMR (21)			
PREDICTED: alpha-actinin, sarcomeric [Apis mellifera]	gi 328791347	73	EDLVDMFIVHTMEEIQGLMD AHAAFK (39)	102	Componente do Citoesqueleto	Actin cytoskeleton reorganization, cytoskeletal anchoring at plasma membrane, flight behavior
			QLDAVTAIGLGLQGTLEDQL HR (48)			
			ILAIVDPNNSGYVHFDAFLDF MTR (21)			
			MPPYKGPNAIPGALDYRSFST ALYGESDL (2)			
PREDICTED: endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1-like [Apis florea]	gi 380026812	91	ALEWNAAHPEEDDGGQPRPP GR (91)	15	Diferenciação celular	structural constituent of cuticle

			DAVITSQQLEVNFNFDGNYVNN FETSNGISHQESGQPK (24)			
PREDICTED: peroxidase-like [Apis florea]	gi 380021206	45	SISVAVSTPNDQSDVSRTLTV MQWGQFIANDISYTPMR (29) LRALYAHPPDDVDLIIGGMAE RPVDDGLLGPTFR (23)	89	Defesa	phagocytosis, neurogenesis, eggshell chorion assembly
PREDICTED: arginine kinase-like [Apis mellifera]	gi 66499163	70	TFLVWCNEEDHLR (70) IGILELIK (26)	43	Transdução de sinal	phosphorylation; May play an important role in the energy releasing mechanism in the visual system. By acting as an energy shuttle and/or as an energy reservoir, ARGK can provide both spatial and temporal buffering in delivering energy in sensory cells
PREDICTED: arginine kinase-like [Apis florea]	gi 380024296	172	EMEEKVSSTLSGLELKGKT FYPLTGMSK (18) LIDDHFLFK (24) FLQAANACR (32) LGFLTFCPTNLGTTVR (52) AKLEEIAGKFNLQVR (23) SLEGYPFNPCLTEAQYK (27) VSSTLSGLELKG (64) IISMQMGGDLGQVYR (75)	40	Transdução de sinal	phosphorylation; May play an important role in the energy releasing mechanism in the visual system. By acting as an energy shuttle and/or as an energy reservoir, ARGK can provide both spatial and temporal buffering in delivering energy in sensory cells
PREDICTED: ATP synthase subunit delta, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380017791	120	FTFAGANQVFYDESVIK (105) QVDVPSFSGSFGILPK (40)	18	Metabolismo mitochondrial	oxidative phosphorylation, response to copper ion, respiratory electron transport chain
PREDICTED: protein kinase C, brain isozyme-like [Apis florea]	gi 380018643	70	NDFMGSLSFGISELIK (70) LFMMNLDQTEFMGFSFLNPE FVQHV(29)	71	Transdução de sinal	Protein phosphorylation
protein kinase C [Apis mellifera]	gi 201023355	91	NDFMGSLSFGISELIK (91)	77	Transdução de sinal	Protein phosphorylation

			GSFGKVMLAERK (19)			
PREDICTED: tubulin beta-1 chain-like [Apis florea]	gi 380011812	885	EIVHIQAGQCGNQIGAK (70)	50	Componente do citoesqueleto	structural constituent of cytoskeleton, axon guidance
			FWEIISDEHGIDPTGTYHGDS DLQLER (137)			
			AILVDLEPGTMDSVR (55)			
			GHYTEGAELVDSVLDVVR (90)			
			KEAESCDCCLQGFLTHSLGG GTGSGMGTLLISK (20)			
			EAESCDCCLQGFLTHSLGGG TGSGMGTLLISK (103)			
			IREEYPDR (22)			
			LSTPTYGDLNHLVSLTMSGV TTCLR (121)			
			LHFFMPGFAPLTSR (27)			
			NMMAACDPR (34)			
			YLTVAAIER (37)			
			NSSYFVEWIPNNVK (57)			
			MSATFIGNSTAIQELFK (114)			
			MSATFIGNSTAIQELFK (37)			
			INVYYNEASGGK (57)			
			SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAG NNWAK (140)			
			ALSVPELTQQMFDAK (104)			
PREDICTED: tubulin beta-3 chain-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328787631	122	EIVHLQAGQCGNQIGAK (49)	50	Componente do citoesqueleto	structural constituent of cytoskeleton, axon guidance
			GHYTEGAELVDSVLDVVR (61)			
			NSSYFVEWIPNNVK (55)			
PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha [Apis mellifera]	gi 328784260	1358	TDNLEDLKQELDIDFHK (102)	114	Transporte	ATP binding proton transportation
			YQVSIHESDNPDDPRHLLVM KGAPER (14)			

		AEELVLGDVVEVK (77)		
		MTVAHMFWDNQIIEADTTED QSGLYDR (40)		
		KADIGVAMGIAGSDVSK (35)		
		QAADMILLDDNFASIVTGVE EGR (76)		
		QAADMILLDDNFASIVTGVE EGR (71)		
		RTDNLEDLKQELDIDFHK (13)		
		ITPEELYQR (35)		
		NMVPQIAIVIR (40)		
		AEELVLGDVVEVK (60)		
		VDNSSLTGESEPPSR (102)		
		SPEFTNENPLETK (100)		
		NLAFFSTNAVEGTAK (75)		
		NLEAVETLGSTSTICSDK (142)		
		TGTLTQNR (43)		
		IATLCNR (17)		
		AGQEDKPILK (52)		
		EVNGDASEAALLK (33)		
		CMELALGDVVMGIR (64)		
		VCEIPFNSTNK (24)		
		CSTIFIGGK (30)		
		EAFNNAYLELGGLGER (116)		
		FVGLMSMIDPPR (86)		
		MGAIVAVTGDGVNDSPALK (90)		
		KADIGVAMGIAGSDVSK (35)		
		LNIPVSEVNPR (38)		

			VIMVTGDHPITAK (48)			
			VLGFCDYILPSDKFPIGFK (77)			
			SVGIISEGNETVEDIAQR (95)			
			AAVIHGTELRL (48)			
			ELNSDQLDEILRL (72)			
			LIIVEGCQR (60)			
			QAADMILLDDNFASIVTGVE EGR (159)			
PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-like [Apis mellifera]	gi 328788761	110	NLEAVETLGSTSTICSDK (110)	115	Transporte	ATP binding proton transportation
			KADIGVAMGISGSDVAK (21)			
PREDICTED: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial-like [Apis mellifera]	gi 66547450	370	ALMLQGVDILADAVAVTMGPK (101)	60	Defesa	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions
			ALMLQGVDILADAVAVTMGPK (108)			
			VEFQDALLLFSEK (77)			
			KPLVIIAEDIDGEALSTLVVNR (72)			
			DQIANTTSDYEK (28)			
			TALTDAAGVASLLTTAEAVV AELPK (104)			
heat shock protein cognate 4 [Apis mellifera]	gi 229892210	98	VEIIANDQGNR (61)	71	Defesa	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions
			TTPSYVAFTETER (34)			
			TFFPEEVSSMVLVK (52)			
			DAGTISGLNVLR (34)			
			STAGDTHLGGEDFDNR (18)			
			MVNHFVQEFK (19)			
			GTLEPVEK (5)			
			SINPDEAVAYGAAVQAAILH GDK (22)			
PREDICTED: spectrin beta chain	gi 328787929	156	AVVQQSQR (20)	278	Componente do	Major constituent of the

[Apis mellifera]			LEEAVDYHQLFADADDIDIW MLDTLR (67)		citoesqueleto	cytoskeletal network
			VAVVNQLAR (18)			
			IDQIHTIWEQLTQMLK (45)			
			DGLNEVWQDLLELIETR (79)			
PREDICTED: synapse-associated protein of 47 kDa-like [Apis florea]	gi 380014561	126	IPVTAEGEELDR (58)	48	Aquisição de memoria	associative learning, synaptic transmission
			LDMLVGVK (15)			
			SQMTGWFSGGIPGLSR (53)			
			TLGGFLYSAVNK (43)			
			LVAELNR (26)			
			GEAVAPWVGAPNEDILR (26)			
			EVDFPWDFAVQPMATL ALDPNLENMR (21)			
			WISEENFWR (30)			
PREDICTED: vesicle-fusing ATPase 1-like isoform 2 [Apis mellifera]	gi 328793374	136	ADFLHALENDVKPAFGTSAE ALDYLLIR (89)	86	Neurotransmissão	regulation of short-term neuronal synaptic plasticity; neurotransmitter secretion
			ILHVPNLSTPDHLLSVLEEVD LFNK (75)			
PREDICTED: excitatory amino acid transporter 2-like [Apis florea]	gi 380026483	82	ISTLDAILDIIIR (82)	59	Neurotransmissão	Adult behavior, synaptic transmission, visual behavior, taurine transport
			GMMQAWMTALGTASSAAT LPITFR (19)			
PREDICTED: histone H4-like [Apis mellifera]	gi 328789054	102	DNIQGITKPAIR (56)	11	Organização do nucleossomo	nucleosome assembly
			DNIQGITKPAIR (45)			
			TVTAMDVVYALK (51)			
PREDICTED: glutamate decarboxylase-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328779619	97	LMELSEYMVRRIR (21)	61	Neurotransmissão	glutamate degradation
			NISSAAVTEADVDFLLAEMDR (97)			
PREDICTED: complexin [Apis mellifera]	gi 328783290	89	GAVGGEGGDEDDKEKEEEA ER (92)	16	Neurotransmissão	neuromuscular synaptic transmission, synaptic growth at neuromuscular junction, synaptic vesicle
			KREEVQEMTQEEP NPLMR (19)			

			TPEELAAEAEAEEDDEITK (17)			exocytosis
PREDICTED: synaptobrevin-like [Apis florea]	gi 380022345	96	TPQQIASQK (38)	14	Neurotransmissão	synaptic transmission, cholinergic, synaptic vesicle exocytosis
			LQATQAQVDEVVDIMK (81)			
PREDICTED: probable aspartate aminotransferase, cytoplasmic-like [Apis florea]	gi 380024335	53	IVATILQNPDLFK (53)	47	Neurotransmissão	neurotransmitter receptor metabolic process, synapse assembly, glutamate biosynthetic process
			LLLGTDSPHIAQGHAFGIQTLSTGTALR (22)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: clathrin heavy chain-like [Apis florea]	gi 380013532	124	LLEMNLM SAPQVADAILGNQMFTHYDR (12)	188	Neurotransmissão	neurotransmitter secretion
			RPLIDQVVQTALSETQDPEDISVTVK (79)			
			AFMTADLPNELIELLEK (72)			
			LDNYDAPDIANIANNEL YEEAFAIFK (32)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: calreticulin-like [Apis florea]	gi 380017227	57	HEQNIDCGGGYVK (15)	47	Defesa	protein folding, neurogenesis, olfactory behavior, brain morphogenesis
			DEICAIGFDLWQVR (28)			
			SGTIFDNVLITDDPEVAR (57)			
PREDICTED: arrestin homolog [Apis florea]	gi 380027220	83	DFIDHLDSIDPIDGHIIVVENDYLQGR (83)	45	Transdução de sinal	signal transduction, sensory transduction
			LMHPAPGTAEK (29)			
PREDICTED: protein DJ-1-like [Apis mellifera]	gi 328782818	52	TAILLIADGSEEMEAVITTDILR (52)	24	Defesa	response to oxidative stress
			ASIRMSVLCRVLPHPAQSICK (20)			
PREDICTED: voltage-dependent anion-selective channel-like [Apis florea]	gi 380022734	434	APPSYNDLGK (25)	30	Defesa	Protects cells against oxidative stress and cell death
			DLFSSGYHFGLIK (30)			
			DLFSSGYHFGLIK (52)			
			SGVEFSSGGVSNQDTGK (91)			
			YNIDDYGLK (28)			

			WNTDNTLATDITFADK (65)			
			GLTLGYGCTFSPQTGTK (74)			
			NNFALGYTASDFTLHAAVNN GCDFSGLIYHK (100)			
			VKPELEGAINLEWNSSNNVT QFGIATK (142)			
			YNLDNDASIR (62)			
			IGLALDLQA (22)			
fatty acid binding protein [Apis mellifera]	gi 27531027	112	FQFVSQNNFEEFAK (65)	16	Transporte	Fatty acid transporter
			MNVPFEEETLPSLPDRK (19)			
			FQTVTSIEGNTFK (46)			
			TETQVNDSLK (23)			
			LYEFSDNELLVHISTNK (47)			
PREDICTED: 14-3-3 protein epsilon-like [Apis florea]	gi 380030609	53	LAEQAER (29)	29	Transdução de sinal	Implicated in the regulation of a large spectrum of both general and specialized signaling pathways
			EAAENSLVAYK (53)			
			DSTLIMQLLR (30)			
PREDICTED: spectrin alpha chain-like [Apis mellifera]	gi 328777212	45	VTEVNELADK (22)	280	Componente do citoesqueleto	Constituent of the cytoskeletal network
			TVEDIELWLSEVEGQLMSED YGK (33)			
			VEEEEAWITEK (18)			
PREDICTED: profilin-like, partial [Apis mellifera]	gi 110774457	47	LMHPAPGTAEK (18)	10	Componente do citoesqueleto	Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton
			LVQGFEEQDILTSSGVTLAGN R (47)			
RecName: Full=Arginine kinase; Short=AK	gi 25453067	162	KTSFDSTLLDCIQSGIENLDS GVGIYAPDAEAYTLFADLFD PIIEDYHGGFK (19)	40	Transdução de sinal	phosphorylation; May play an important role in the energy releasing mechanism in the visual system. By acting as an energy shuttle and/or as an energy reservoir, ARGK can provide both spatial
			TSFDSTLLDCIQSGIENLDG VGIYAPDAEAYTLFADLFDPI IEDYHGGFK (24)			
			DFGDVDSLGNLDPANEFIVST R (21)			

			SLEGYPFNPCLTEAQYK (18) VSSTLSGLEGELK (62) GTFYPLTGMSK (15) FLQAANACR (36) TFLVWCNEEDHLR (29) IISMQMGGDLGQVYR (54) LVHAVNEIEK (22) LVHAVNEIEK (20) LGFLTFCPTNLGTTVR (52) LEEIAGK (17) GEHTEAEGGIYDISNK (39) LGLTEYQAVK (19)			and temporal buffering in delivering energy in sensory cells.
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 6-phosphofructokinase [Apis mellifera]	gi 328786483	128	AVTETGVELSNEER (75) NLLSVAYK (21) EICYDVLGLLDK (37) YLAEVATGETR (54) AYQDAFEISK (25) QAFDDAIAELDTLNEDSYKD STLIMQLLR (17) DSTLIMQLLR (29)	111	Metabolismo citoplasmático	Enzyme from the glycolytic pathway
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 6-phosphofructokinase-like [Apis florea]	gi 380017740	90	MGAEAVMALMEAKPDTEAC VVTNLGNQAVRLPLMECVR R (19) FTPFAELLEMTDFEHR (90)	89	Metabolismo citoplasmático	Enzyme from the glycolytic pathway
PREDICTED: myosin-IIIa [Apis florea]	gi 380028233	248	SDNPPHIFAVADAAYQALLH QR (148) ILQINPIMEAFGNATTGINANS SR (95) SHVIHVEPLR (57) TVSQLLGVEESDLLEALTSNS VMTR (67)	196	Transdução de sinal	protein autophosphorylation, response to stimulus, sensory perception of sound, visual perception

PREDICTED: phosphoglycerate kinase isoform 1 [Apis mellifera]	gi 110763826	59	VQIHLPIDFVTADK (43)	45	Metabolismo citoplasmático	Phosphorylation, glycolysis
			GAISIIGGGDTATCAAK (40)			
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II [Apis mellifera]	gi 201023361	64	ICDPHLTAFEPEALGNLVEG MDFHK (64)	59	Aquisição de memória	Learning and memory, long-term memory, protein phosphorylation, synaptic transmission
			QGVATHHQSEESR (16)			
PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2-like [Apis mellifera]	gi 48095204	94	VFVWNSETGQFLGR (62)	36	Transporte	Regulates, through assembly of alpha/beta heterodimers, the number of sodium pumps transported to the plasma membrane
			TICDYGKPPAPGK (19)			
			NLPSTMPADLQEHK (16)			
			LDTVWVSCSGENPADVENM GAIQYIPR (57)			
			ASDEGNFLHWTR (21)			
PREDICTED: proline dehydrogenase 1, mitochondrial-like isoform 1 [Apis florea]	gi 380012993	88	LTALGRPQLLLQLSEVIMR (39)	71	Metabolismo mitocondrial	Converts proline to delta-1-pyrroline-5-carboxylate
			EGVIHLFPWSGILDENYELSE TFQVPDIK (69)			
			LLLTEIMRRFASGQIFYKPK (2)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: AP-2 complex subunit alpha-like [Apis florea]	gi 380019993	63	IVHLLNDQHLGVVTAAASLI DALVK (50)	105	Transporte	involved in cargo selection and vesicle formation
			LQGFGMQLLDGIDPNPDNFV CAGIVHMR (29)			
PREDICTED: ATP synthase subunit d, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328785988	198	AINWSAITER (26)	20	Metabolismo mitocondrial	ATP biosynthetic process, cellular metabolic process, oxidative phosphorylation
			YTQAIDSEK (45)			
			IQSFIQEVNSQIAELQQNLDR (114)			
			IQSFIQEVNSQIAELQQNLDR (75)			
			NMIPFSEMTMEDFSDIQPK (29)			
PREDICTED: phosphate carrier protein, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66525867	99	IQVNPAAK (20)	39	Transporte	Transport of phosphate groups from the cytosol to the mitochondrial matrix
			VTLAEDGTR (36)			
			IQTTPGFANTLR (39)			

			IYAEEGITGFYK (48)			
			LGFGGVWK (22)			
PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 328785025	1132	IVAVIGAVVDVQFDDALPPIL NALEVQNR (84)	55	Metabolismo mitocondrial	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances
			LVLEVAQHLGENTVR (81)			
			LVLEVAQHLGENTVR (38)			
			TIAMDGTEGLVR (70)			
			GQSVLD SGYPIR (66)			
			IPVGAETLGR (24)			
			IINVIGEPIDER (64)			
			LAPIHADAPEFVDMSVEQEIL VTGIK (117)			
			LAPIHADAPEFVDMSVEQEIL VTGIK (53)			
			IGLFGGAGVGK (35)			
			TVLIMELINNVAK (61)			
			EGNDLYHEMIESGVISLK (94)			
			VALVYGQMNEPPGAR (62)			
			VALTGLTVAEYFR (84)			
			DQEGQDVLLFIDNIFR (119)			
			DQEGQDVLLFIDNIFR (48)			
			FTQAGSEVSALLGR (93)			
			IPSAVGYQPTLATDMGSMQE R (75)			
			AIAELGIYPAVDPLDSTSR (60)			
			AIAELGIYPAVDPLDSTSR (42)			
			IMDPNIIGAEHYNVAR (88)			
			ILQDYK (9)			

			SLQDIHAILGMDELSEEDKLT VAR (116)			
			FLSQPFQVAEVFTGHAGK (93)			
			LVPLEETIK (32)			
PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380021893	230	TIAMDGTEGLVR (13)	55	Transporte	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain
			TVLIMELINNVAK (46)			
			VALTGLTVAEYFR (72)			
			DQEGQDVLLFIDNIFR (90)			
			SLQDIHAILGMDELSEEDKLT VAR (96)			
			LVPLEETIK (20)			
			SLQDIHAILGMDELSEEDKLT VAR (57)			
			TSKVALVYGQMNEPPGARA R (15)			
PREDICTED: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]	gi 48100966	276	ANLEETGR (20)	60	Transporte	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain
			VLSIGDGIAR (50)			
			GMALNLEPDNVGVVVFND R (43)			
			GMALNLEPDNVGVVVFND R (59)			
			TGAIVDVPVGEELLGR (40)			
			VVDALGNPIDGK (47)			
			AVDSLVPIGR (34)			
			TALAITIINQK (66)			
			HALIYDDLSK (40)			
			MNESLGGGSLTALPVIETQA GDVSAYIPTNVISITDGQIFLE TELFYK (32)			
			GIRPAINVGLSVSR (25)			

			EVAFAQFGSDLDAATQQLL NR (54)			
			DNTISEASDAK (24)			
PREDICTED: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380027725	166	VLSIGDGIAR (63)	57	Transporte	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain
			TGAIVDVPVGEELLGR (56)			
			VVDALGNPIDGK (69)			
			AVDSLVPIGR (23)			
			HALIYDDLSK (37)			
			DNTISEASDAK (35)			
PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 isoform 1 [Apis mellifera]	gi 48142692	417	AGAEYIVESTGVYTTK (40)	36	Metabolismo citoplasmatico	Enzyme of glycolytic pathway
			VIHDNFEIVEGLMTTVHAVT ATQK (104)			
			VVDAPSAK (27)			
			GACQNIIPAATGAAK (50)			
			VPVHNVSVDLTVR (68)			
			GILGYTEDEVVSSDFIGDDHA SIFDAK (161)			
			AGIALNNNFVK (58)			
			LISWYDNEYGYSCR (68)			
			IENDQLVVNGNK (74)			
			ASGHLQAGAK (22)			
			VIPALDGK (33)			
			LTGMAFR (27)			
			AGIALNNNFVK (61)			
PREDICTED: enolase-like [Apis mellifera]	gi 328776580	221	GNPTVEVDLVTDDGLFR (68)	39 kDa	Metabolismo citoplasmatico	Enzyme of glycolytic pathway
			SEVPSGASTGIHEALELR (47)			
			AISNINNTIGPELIK (59)			
			SNLDVTSQSDIDNFLK (65)			
			MGTEIYHHLK (38)			
			EALNLIIDSIK (40)			

			IGMDVAASEFYK (59)			
			NLYLQFIK (20)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: enolase-like [Apis florea]	gi 380022456	201	GNPTVEVDIVTDDGLFR (68)	47	Metabolismo citoplasmatico	Enzyme of glycolytic pathway
			MGTEIYHHLK (38)			
			IGMDVAASEFYK (59)			
			NLYLQFIK (20)			
			SAGWGTMVSHR (29)			
			SGETEDTFIADLVVGLSTGQIK (95)			
ADP/ATP translocase [Apis mellifera]	gi 33642164 (+4)	203	LLLQVQHISK (36)	33	Transporte	Transporter activity
			EFTGLGNCLTK (40)			
			GTGGALVLVLYDEIK (35)			
			DFLAGGVAAAIK (49)			
			ADGITGLYRGFGVSVQGIIY RAAYFGFYDTAR (62)			
			GFGVSVQGIIYR (38)			
			GAFSNLRGTGGALVLVLYD EIKNLL (39)			
			GTGGALVLVLYDEIK (68)			
			TTVAPIER (25)			
			YFVGNLASGGAAGATSLCFV YPLDFAR (48)			
			EQGFSLSYWR (38)			
PREDICTED: ADP,ATP carrier protein-like [Apis mellifera]	gi 66512141	79	YFPTQALNFAFK (73)	35	Transporte	Transporter activity
			GNLANVIR (25)			
PREDICTED: glutathione S- transferase-like isoform 1 [Apis florea]	gi 380020933	213	FLLSYAGISFEDER (60)	23 k	Defesa	Metabolic process of detoxification
			IKPTTPFGQVPVLDVDGK (41)			
			IKPTTPFGQVPVLDVDGKK (29)			
			KSLAGKDDWEALEIDSIVD TIHDVR (43)			

			DDWEALEIDSIVDTIHDVR (95)			
			LAAFHYEENEEIK (49)			
			SGLAGKDDWEALEIDSIVDTI HDVR (123)			
			SGLAGKDDWEALEIDSIVDTI HDVR (30)			
PREDICTED: glutathione S-transferase-like [Apis mellifera]	gi 328793353	228	IAQSVAISR (43)	24	Defesa	Metabolic process of detoxification
			KSGLAGKDDWEALEIDSIVDTI HDVR (43)			
			DDWEALEIDSIVDTIHDVR (87)			
			VLNLPAIK (27)			
			SGLAGKDDWEALEIDSIVDTI HDVR (122)			
			SGLAGKDDWEALEIDSIVDTI HDVR (30)			
PREDICTED: pyruvate kinase-like [Apis mellifera]	gi 328786389	442	LNFSHGTHEYHAETIANVR (27)	65	Metabolismo citoplasmatico	Component of glycolytic pathway
			IENHQGVVNIDEIIDASDGIM VAR (155)			
			VGKPIICATQMLES MVK (25)			
			LSGIICTIGPASR (39)			
			MIDTGMNIAR (44)			
			AGLSIPVGIALDTK (28)			
			TGLLEGGAEEVELKK (42)			
			VFVDDGLISLK (61)			
			KGVNLPGTPVDLPVSEK (24)			
			AESSDVANAILDGADCVM LS GETAK (101)			
			NQGFIKPGDAVIVVTGWR (33)			

			AIPPIDATHAVAI VVEASVK (19)			
			NQGFIKPGDAVIVVTGWR (38)			
PREDICTED: pyruvate kinase-like [Apis florea]	gi 380021483	263	AIPPIDATHAVAI VVEASVK (19)	57	Metabolismo citoplasmatico	Enzyme of glycolytic pathway
			LSGIICTIGPASR (59)			
			MIDTGMNIAR (35)			
			LNFSHGTHEYHAETIANVR (58)			
			TGLLEGGAEEVELKK (77)			
			KGVNLPGTPVDLPVSEK (24)			
			AESSDVANAILDGADCVMLS GETAK (101)			
			NQGFIKPGDAVIVVTGWR (39)			
PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase-like [Apis mellifera]	gi 110748949	273	SIAQQIVAPGK (14)	40	Metabolismo citoplasmatico	Enzyme of glycolytic pathway
			GILAADESTATIGK (46)			
			ADDGTPFVELLK (25)			
			VDTGVTFLFGTEETTTQGL DNLQAR (72)			
			LAIENANVLAR (56)			
			YASICQSAR (30)			
			IVPIVEPEILPDGDHDLAR (27)			
			EQISAGQEELIK (20)			
			LKDINVENTEDNRR (44)			
			VDTGVTFLFGTEETTTQGL DNLQAR (85)			
			IVPIVEPEILPDGDHDLAR (83)			
			EQISAGQEELIK (25)			
PREDICTED: fructose-bisphosphate	gi 380013251	214	SIAQQIVAPGK (22)	40	Metabolismo	Enzyme of glycolytic

aldolase-like [Apis florea]			QLLFTSAK (25) ADDGTPFVELLK (46) VDTGVVTLFGTEETTTQGL DNLQAR (106) LAILENANVLAR (54) YASICQSAR (26) IVPIVEPEILPDGDHDLAR (92)		citoplsmatico	pathway
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type-like [Apis florea]	gi 380022760	109	IEGNDSSFHEFEITGSTYEPVG EIFLR (22) VGEATETALIVLAEK (70) IVEFLQSMNEISAMTGDGVN DAPALK (60) FSIPVVLLDETLK (29)	112	Transporte	Magnesium-dependent enzyme catalyzes the hydrolysis of ATP coupled with the transport of calcium
PREDICTED: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328785449	367	IDQSILTGESVSVIK (48) NILFSGTNVAAGK (30) GVVIGTGLNTAIGK (48) TEMSETEEIK (18) TGTLTTNQMSVSR (55) IEGNDSSFHEFEITGSTYEPVG EIFLR (37) VGEATETALIVLAEK (52) VIVITGDNK (35) ATAEAICR (55) IVEFLQSMNEISAMTGDGVN DAPALK (38) IVEFLQSMNEISAMTGDGVN DAPALK (76) SASEMVLADDNFSSIVA AVE EGR (70) SASEMVLADDNFSSIVA AVE EGR (57)	112	Transporte	Magnesium-dependent enzyme catalyzes the hydrolysis of ATP coupled with the transport of calcium

			FSIPVVLLDETLK (47)			
PREDICTED: probable citrate synthase 1, mitochondrial-like [Apis mellifera]	gi 66521738	100	EHGSAVVGEVTVDDMMYGG MR (39)	52	Metabolismo mitocondrial	Enzyme of Krebs cycle
			GLLWEPSVLDPEEGIR (33)			
			DGSEPLPEGLFWLLITGDVPN NK (37)			
			SKYWEYVYEDIMNLIK (29)			
			YWEYVYEDIMNLIK (26)			
			MLGYEDPQFTELLR (49)			
			EIGDSPSDEK (22)			
PREDICTED: cytochrome c-like [Apis florea]	gi 380017934	129	VGPPLYGVYGR (57)	12	Metabolismo mitocondrial	Oxidation-reduction process
			KTGQAPGYSYTDANK (9)			
			ETLFEYLENPK (46)			
			ETLFEYLENPKK (58)			
			ADLIAYIEQASK (44)			
superoxide dismutase 1 [Apis mellifera]	gi 295849268	236	AVCVLQGEVK (19)	16	Defesa	Superoxide metabolic process during oxidative stress
			VTGQVTGLK (24)			
			HVGDLGNIEADASGVANVNI TDK (105)			
			TIQLQGPHSVIGR (88)			
			TLVVHADPDDLKG (41)			
			LACGVIGITK (50)			
			TLVVHADPDDLKG (70)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: superoxide dismutase [Cu-Zn]-like [Apis florea]	gi 380016456	51	AVCVLQGEVK (36)	9	Defesa	Superoxide metabolic process during oxidative stress
			VTGQVTGIK (31)			
			LACGVIGITK (36)			
alpha glucosidase III [Apis florea]	gi 148283774	97	MKAVIVFCLMALSIVDAAW KLPENLK (18)	66	Metabolismo citoplasmatico	Carbohydrate metabolic process
			IILDFVPNHTSDQHKWFQLSL K (97)			

			FYILISQDAKFENI (22)			
glucose oxidase [Apis mellifera]	gi 58585090	57	VLLLEAGPDEPAGAEIPSNLQ	68	Metabolismo citoplasmatico	Carbohydrate metabolic process
			LYLGGDLWDK (46)			
			SGGLMNVER (22)			
			AADFIKEDWGELLQLL (34)			
triosephosphate isomerase [Apis mellifera]	gi 145386848	154	SEINDIVGFLK (37)	27	Metabolismo citoplasmatico	Glycolytic pathway
			INSWDNVVVAYEPVWAIGTG K (39)			
			NVNQTVAE TVR (55)			
			EKDIDGFLVGGASLKP DFVQI VNAK (65)			
			NIFGENDELIAEK (22)			
			TATPQQAQEVHEK (62)			
PREDICTED: triosephosphate isomerase-like [Apis florea]	gi 380014259	73	VIACIGEK (20)	27	Metabolismo citoplasmatico	Glycolytic pathway
			INSWDNVVVAYEPVWAIGTG K (9)			
			NVNQTVAE TVR (47)			
			EKDIDGFLVGGASLKP DFVQI VNAK (48)			
PREDICTED: aconitate hydratase, mitochondrial-like [Apis mellifera]	gi 48098039	120	VLYSHLDEPDKQEIQR (57)	86	Metabolismo mitocondrial	Citrate metabolic process, trocarboxylic cycle
			YDQIIELDLSTLEPHVNGPFTP DLAHPISK (71)			
			ITLNHTMNEQQISWFK (47)			
PREDICTED: aconitate hydratase, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380022424	72	QEIQRGTTYLR LRPDR (23)	86	Metabolismo mitocondrial	Citrate metabolic process, trocarboxylic cycle
			NDANPATHAFVTSP ELVTAL SLAGR (72)			
PREDICTED: phosphoglycerate mutase 2-like [Apis mellifera]	gi 66550890	109	FLGDEETVK (19)	35	Metabolismo citoplasmatico	Glycolytic pathway
			FTFDIAHTSLLSR (72)			
			EIGQENITVQK (33)			
			YYEIVNDPR (28)			

			LNLPTGIPFVYELDENFKPVV SMK (20)			
			AAMAAVAAQAK (34)			
PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial-like [Apis mellifera]	gi 66523464	84	VTVAAYDNHAPIAQVSIVFR (35)	48	Metabolismo mitocondrial	Oxidative phosphorylation,
			TEILDAADNSLCLLESMQQQ AVLK (84)			
PREDICTED: dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66526646	82	LLGVHMGSVAGELINEAVL AIEYGASAEDVAR (13)	55	Metabolismo mitocondrial	Is a component of the glycine cleavage system as well as of the alpha- ketoacid dehydrogenase complexes
			LLGVHMGSVAGELINEAVL AIEYGASAEDVAR (82)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis florea]	gi 380014406	77	AAQLGMKTICVEKDETGGT CLNVGCIPSK (3)	54	Metabolismo mitocondrial	Is a component of the glycine cleavage system as well as of the alpha- ketoacid dehydrogenase complexes
			LLGVHMGSVAGELINEAVL AIEYGASAEDVAR (54)			
			LLGVHMGSVAGELINEAVL AIEYGASAEDVAR (46)			
pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 335892820	77	VFLGEEVALYDGAYK (70)	38	Metabolismo mitocondrial	Catalyzes the overall conversion of alpha-keto acids to acyl-CoA and CO2
			VVSPYTSERAK (23)			
			SLRPLDITIVQSVVK (34)			
PREDICTED: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD ⁺]-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66518233	67	AVALLDLSDSGESAAADLN NEFGK (17)	28	Metabolismo mitocondrial	Contributes to the regulation of events that are under the control of prostaglandin levels
			EHAMDLLDEETAAMAMVT MQK (67)			
PREDICTED: mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like [Apis mellifera]	gi 66500205	85	FILAGAGGVNHNALVELAQK (27)	53	Maturação de proteínas	Cleaves presequences (transit peptides) from mitochondrial protein precursors
			IDSVNASNIHDIGMK (82)			
PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 66534766	101	ETFPDPLELATGLEK (86)	14	Metabolismo mitocondrial	Respiratory electron transport chain
			ELLAAAAGNFDPPYHMK (49)			
			IVGCICEPDTSHVNWMLHD GQPR (57)			
			DCPNLVPSAFK (37)			

PREDICTED: 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328786455	100	STELGVESIVMGMPHR (65)	121	Metabolismo mitocondrial	Component of tricarboxylic acid cycle
			KPLSQIFTQFAALEAADDGSG DVK (19)			
			LAVVANPSHLEAVDPVVQK (62)			
PREDICTED: glutamate dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66523390	147	FFDMVEYFFHR (60)	62	Neurotransmissão	glutamine metabolic process, glutamate metabolic process glutamate biosynthetic process
			TFIVQGFGNVGLHSMR (77)			
			AGAACIGVIEHDGAIYNAEGI DPK (53)			
PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit 7-like [Apis mellifera]	gi 328782037	56	WAYEAAGFNQYGLHR (28)	14	Metabolismo mitocondrial	Oxidative phosphorylation
			AMQLDCQK (18)			
			FEDDILYLTPIHEEMR (38)			
PREDICTED: cytochrome c1, heme protein, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 66518223	64	EGQYFNPYFVGALGMPQII YDEVIEYEDGTPASASQLAK (64)	35	Metabolismo mitocondrial	Oxidative phosphorylation
			EGQYFNPYFVGALGMPQII YDEVIEYEDGTPASASQLAK (20)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: transformation/transcription domain-associated protein-like [Apis florea]	gi 380021027	48	APDPVTQMNTYKSYVTML ADPVSK (21)	431	Metabolismo citoplasmático	Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor
			LLENLIQAHK (14)			
			LVLTEK (15)			
			LVLITEKSLMVEVSSPFRIPL MK (16)			
PREDICTED: ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial [Apis mellifera]	gi 328785946	77	LVDVTPEIEK (50)	11	Transporte	ATP synthesis coupled proton transport
			LVDVTPEIEKER (54)			
PREDICTED: protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2-like [Apis florea]	gi 380020434	107	GTMELGISPIVTSGLIMQLLS GTK (101)	51	Transporte	posttranslational protein targeting to membrane, translocation; peptide transport
			GTEFEGAVIALFHLLATR (27)			
PREDICTED: aminoacylase-1-like [Apis mellifera]	gi 48096676	64	TIHISFVPDEEIGGVLMEDF VHTK (64)	45	Metabolismo citoplasmático	Involved in the hydrolysis of N-

			QVGIPAIGFSPMNKTKILLHD HDEYLNK (24)			acylated or N-acetylated amino acids (except L- aspartate).
PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]	gi 66505480	99	LGANSLDLVVFGR (99) ESRGAHAR (23)	72	Metabolismo mitochondrial	electron transport chain
PREDICTED: basement membrane- specific heparan sulfate proteoglycan core protein-like [Apis mellifera]	gi 328783869	37	IVNIQIADR (19) ALLFIGGVPSDNITQYAEINS GFVGCISR (25)	499	Diferenciação celular	Brain development, angiogenesis
PREDICTED: 4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase-like [Apis floreas]	gi 380024443	51	LYDFMHDNPFIEMLAVNYV NNPQIVAK (51) YIAENLVENGATMQMGIGSIP DAVLSFLDNHK (18)	51	Metabolismo mitochondrial	acetyl-CoA metabolic process
fatty acyl-CoA reductase 1 [Apis mellifera]	gi 299832915	55	LLDVPLFDK (55) TIPIYHCCTGQQNPITWQQFV ELILK (19)	59	Metabolismo mitochondrial	wax biosynthetic process, long-chain fatty-acyl-CoA metabolic process
PREDICTED: xanthine dehydrogenase [Apis mellifera]	gi 110759329	38	LKSSQYYQVVQKDQEANDL VGR (18) QATGEAIYCDDMPKFVDELY LAVVLSTRAHAK (21)	152	Metabolismo citoplasmático	Key enzyme in purine degradation. Catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine
PREDICTED: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2-like [Apis florea]	gi 380019647	56	GLVALVTGGASGLGLGVVQ R (56) GLVALVTGGASGLGLGVVQ RFIKAGAK (2)	27	Metabolismo mitochondrial	acyl-CoA metabolic process, fatty acid metabolic process, tRNA processing
PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase-like [Apis mellifera]	gi 66499293	51	EALQLLELAK (51) GKNENEARTELQK (21)	63	Metabolismo citoplasmático	glycolysis, gluconeogenesis, oxidation-reduction process
PREDICTED: brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 [Apis florea]	gi 380017271	43	DNSKEMFIIRALEK (20) ALLTVMTSQHVEVHEGTVLL TIRTVYSVYLASRNLVNQTT AR (19) ALCQVSLEELSHPTQPRMFSL TK (38)	192	Transporte	Golgi to plasma membrane transport, exocytosis, protein transport, receptor recycling

PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic-like [Apis florea]	gi 380021586	56	DWWIGTKPGEWVSMGVLS DSYGIPIK (56)	36	Metabolismo mitocondrial	NADH metabolic process, component of Krebs Cycle
			LLDVPLFDK (19)			
Chain A, Nmr Solution Structure Of Apis Mellifera Chymotrypsin Inhibitor (Amci).	gi 159162159	71	ICTMQCR (28)	6	Defesa	Negative regulation of endopeptidase activity
			IGCQCQEGFLR (71)			
PREDICTED: fatty acid synthase-like isoform 1 [Apis mellifera]	gi 328776933	35	SYAKEK (16)	269	Metabolismo citoplasmatico	Catalyzes the synthesis of saturated and monounsaturated fatty acids
			VETWKLYGINVSILSGMDAT K (26)			
			ETFPSIDDDHIGNSR (24)			
PREDICTED: dynein heavy chain 10, axonemal-like [Apis mellifera]	gi 328788110	35	GCISLEKAPKINPTEWL PATGWADLLK (32)	565	Componente do citoesqueleto	Produces force towards the minus ends of microtubules
			NIQSNPR (17)			
PREDICTED: dehydrogenase/reductase SDR family member 11-like [Apis mellifera]	gi 66548280	59	VPFIPGFSVYPASK (18)	26	Metabolismo citoplasmatico	Reduces all-trans-retinal and 9-cis retinal
			VPFIPGFSVYPASK (53)			
PREDICTED: putative ATP synthase subunit f, mitochondrial-like [Apis mellifera]	gi 48138741	57	LTELK (18)	14	Transporte	proton transport, lateral inhibition, ATP biosynthetic process
			YYGKPDTPFGEVK (36)			
			LGELPAWFSR (50)			
PREDICTED: ATP synthase subunit g, mitochondrial-like [Apis mellifera]	gi 328791879	47	MSKIVGEVSTLIKLG VTK (23)	12	Metabolismo mitocondrial	cellular metabolic process, ATP catabolic process, respiratory electron transport chain, small metabolic process
			IVGEVSTLIK (47)			
PREDICTED: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2-like [Apis mellifera]	gi 110760701	77	GLVALVTGGASGLGL GVVQR (71)	27	Metabolismo mitocondrial	acyl-CoA metabolic process, fatty acid metabolic process, tRNA processing
			LGTPDEYAQLAEHIV ENSLN GEVIR (36)			
PREDICTED: plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 [Apis mellifera]	gi 328783833	100	GESFDPMLVLSGTHV MEGSGK (21)	131	Transporte	transmembrane transport
			MLVTA VGVNSQAGI FTLLG AAVDQEQEIK (100)			
cytochrome oxidase II [Apis cerana]	gi 11761396 (+7)	104	LLETDN (22)	27	Metabolismo mitocondrial	electron transport chain
			LITSTDVHSWTVP SLGIK (102)			

			INQLNLISK (33)			
cytochrome oxidase subunit II [Apis mellifera ligustica]	gi 300244819	104	LLETDNR (22)	23	Metabolismo mitocondrial	electron transport chain
			LITTSTDVIHSWTVP SLGIK (102)			
			INQLNLISK (32)			
cytochrome oxidase 2 [Apis dorsata]	gi 31711443	102	LLETDNR (22)	26	Metabolismo mitocondrial	electron transport chain
			LITTSTDVIHSWTVP SLGIK (102)			
RecName: Full=Cytochrome c oxidase subunit 2; AltName: Full=Cytochrome c oxidase polypeptide II	gi 1706020	104	LLETDNR (22)	27	Metabolismo mitocondrial	electron transport chain
			LITTSTDVIHSWTVP SLGIK (102)			
			INQLNLISK (33)			
PREDICTED: ATP synthase subunit delta, mitochondrial isoform 2 [Apis mellifera]	gi 328786452	188	FTFAGANQVFYDESVIK (106)	19	Transporte	oxidative phosphorylation, response to copper ion, respiratory electron transport chain
			QVDVPSFSGSFGILPK (21)			
			AQQELSSATTEEDKAAATIAI EVSEALVQAVQ (110)			
			AAATIAIEVSEALVQAVQ (20)			
voltage-dependent anion-selective channel	gi 66521459	242	APPSYNDLGK (27)	30	Neurotransmissão	neuron-neuron synaptic transmission
			DLFSSGYHFGLIK (23)			
			DLFSSGYHFGLIK (27)			
			SGVEFSSGGVSNQDTGK (50)			
			YNIDDYGLK (34)			
			WNTDNTLATDITFADK (74)			
			GLTLGYGCTFSPQTGTK (68)			
			NNFALGYTASDFTLHAAVNN GCDFSGLIYHK (21)			
			VKPELEGAINLEWNSSNNVT QFGIATK (88)			
			YNLDNDASIR (44)			
			IGLALDLQA (36)			

Fonte: Criado pelo autor, 2015.

ANEXO II

Tabela 4. Proteínas identificadas em ambos o grupos, controle e REP.		
Acess Code	pValue	Protein
571516901	0.012065955	PREDICTED: spectrin alpha chain-like [Apis mellifera]
572266590	0.026277844	PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-like [Apis dorsata]
572270713	0.011877825	PREDICTED: clathrin heavy chain-like [Apis dorsata]
571550284	0.007912169	PREDICTED: spectrin beta chain isoform X1 [Apis mellifera]
571550309	0.00581155	PREDICTED: spectrin beta chain isoform X7 [Apis mellifera]
571524355	0.002176228	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch [Apis mellifera]
572307846	0.00041581	PREDICTED: ankyrin-2-like [Apis dorsata]
571525698	0.000572381	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch-like [Apis mellifera]
572307637	0.004146281	PREDICTED: ankyrin-3-like isoform X1 [Apis dorsata]
820851639	0.000310597	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ankyrin-2-like [Apis florea]
820851321	0.000929174	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch-like [Apis florea]
373212304	0.031409544	ATP synthase subunit beta [Apis cerana]
820861088	0.019750917	PREDICTED: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [Apis florea]
48100966	0.029676768	PREDICTED: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]
45645402	0.040390872	
48098039	0.021642004	PREDICTED: aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
571550390	0.020788709	PREDICTED: V-type proton ATPase catalytic subunit A-like isoform X3 [Apis mellifera]
229892210	0.015973642	heat shock protein cognate 4 [Apis mellifera]
229892203	0.010326815	heat shock protein cognate 5 [Apis mellifera]
820864945	0.008581954	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 3 [Apis florea]
373210239	0.005171641	GrpE protein [Apis cerana]
229892265	0.004343182	heat shock protein Hsp70Ab-like [Apis mellifera]
373203049	0.016116682	Heat shock cognate protein HSP 90-beta [Apis cerana]
110758921	0.00706404	PREDICTED: endoplasmin-like isoform 1 [Apis mellifera]
328789099	0.01268257	PREDICTED: dynamin isoformX1 [Apis mellifera]

571520412	0.011810288	PREDICTED: dynamin isoform X8 [Apis mellifera]
571554588	0.009355891	PREDICTED: 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X5 [Apis mellifera]571554584, 572318941
571576796	0.004864169	PREDICTED: putative glutamate synthase [NADPH]-like isoform X1 [Apis mellifera]
820847409	0.004280304	PREDICTED: putative glutamate synthase [NADPH] isoform X1 [Apis florea]
572266207	0.035345512	PREDICTED: actin-5C-like isoform X1 [Apis dorsata]
820857060	0.032841228	PREDICTED: actin, clone 205-like isoform X1 [Apis florea]
820857084	0.036972474	PREDICTED: actin, muscle [Apis florea]
571573515	0.027419613	PREDICTED: arginine kinase isoform X1 [Apis mellifera]
25453067	0.025286844	RecName: Full=Arginine kinase
571570187	0.004034449	PREDICTED: myosin-IIIa isoform X1 [Apis mellifera]
288872187	0.013105608	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial [Apis mellifera]
572267776	0.010737386	PREDICTED: NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial-like [Apis dorsata]
571568809	0.005879907	PREDICTED: pyruvate carboxylase, mitochondrial isoform X2 [Apis mellifera]
572262136	0.021671666	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit B-like [Apis dorsata]
110748949	0.021892034	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase-like isoform X2 [Apis mellifera]
820863637	0.009141951	PREDICTED: lamin-C-like isoform X1 [Apis florea]
571544339	0.006296445	PREDICTED: phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein LAP isoform X2 [Apis mellifera]
572314212	0.014262138	PREDICTED: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial-like [Apis dorsata]
571512479	0.001966566	PREDICTED: inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform X1 [Apis mellifera]
572259623	0.007258752	PREDICTED: protein hu-li tai shao-like isoform X1 [Apis dorsata]
373198074	0.010094871	Protein hu-li tai shao [Apis cerana]
380014710	0.005988545	PREDICTED: AP-1 complex subunit beta-1 [Apis florea]
373195813	0.014185719	Synaptotagmin 1 [Apis cerana]
820857634	0.00740685	PREDICTED: translation elongation factor 2 isoform X2 [Apis florea]
571572998	0.012541288	PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial-like [Apis mellifera]
820853382	0.030607673	PREDICTED: voltage-dependent anion-selective channel-like [Apis florea]
571575247	0.007520649	PREDICTED: transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94 [Apis mellifera]
507418852	0.006506011	Rab escort protein [Apis mellifera]

820861907	0.00895858	PREDICTED: fasciclin-1 isoform X2 [Apis florea]
571547833	0.012087085	PREDICTED: fasciclin-1 isoform X1 [Apis mellifera]
571549030	0.006463778	PREDICTED: glycogen phosphorylase [Apis mellifera]
66499293	0.010727418	PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase-like [Apis mellifera]
571575167	0.009929436	PREDICTED: NADP-dependent malic enzyme isoform X1 [Apis mellifera]
328778238	0.005219331	PREDICTED: NADP-dependent malic enzyme isoformX1 [Apis mellifera]
380019993	0.005918486	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: AP-2 complex subunit alpha [Apis florea]
820865968	0.022243033	PREDICTED: 14-3-3 protein epsilon [Apis florea]
373196924	0.019851951	2014-3-3 protein zeta [Apis cerana]
571554802	0.0153636	PREDICTED: 14-3-3 protein zeta-like isoform X7 [Apis mellifera]
572316405	0.014002436	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha-like [Apis dorsata]
48095594	0.00299512	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha-like isoform 1 [Apis mellifera]
572301515	0.018399865	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2-like [Apis dorsata]
145386848	0.020479378	triosephosphate isomerase [Apis mellifera]
571522695	0.00877788	PREDICTED: serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit 3-like isoform X1 [Apis mellifera]
373209986	0.004087379	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit B [Apis cerana]
571564930	0.013086092	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit-like isoform X4 [Apis mellifera]
820855892	0.009077349	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100865626 isoform X1 [Apis florea]
48095204	0.019413689	PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2-like [Apis mellifera]
66499419	0.004012959	PREDICTED: puromycin-sensitive aminopeptidase isoformX1 [Apis mellifera]
328776808	0.025770597	PREDICTED: uncharacterized protein LOC410013 isoform 1 [Apis mellifera]
820850329	0.012776038	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100863653 [Apis florea]
237681308	0.012527239	glutathione S-transferase S1 [Apis mellifera]
373213868	0.028600868	Glutathione S-transferase [Apis cerana]
572258018	0.008063304	PREDICTED: alanine aminotransferase 2-like isoform X4 [Apis dorsata]
572265407	0.011584754	PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial-like [Apis dorsata]
820862547	0.000828605	PREDICTED: dynein heavy chain, cytoplasmic [Apis florea]
58585212	0.003285881	yellow-f precursor [Apis mellifera]

820853508	0.015239785	PREDICTED: ATP synthase subunit gamma, mitochondrial [Apis florea]
571542665	0.009138226	PREDICTED: calreticulin [Apis mellifera]
571554778	0.005466498	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 6-phosphofructokinase [Apis mellifera]572309340, 572309346, 572309348, 572309350, 373196662, 373196666, 373196664, 373196668
328784397	0.00634462	PREDICTED: choline O-acetyltransferase-like isoform X2 [Apis mellifera]
571506173	0.004552597	PREDICTED: dynamin related protein 1 [Apis mellifera]
571549004	0.007995714	PREDICTED: reticulon-4-like isoform X1 [Apis mellifera]
571549012	0.009233339	PREDICTED: reticulon-4-like isoform X3 [Apis mellifera]
571549018	0.006386739	PREDICTED: reticulon-4-like isoform X4 [Apis mellifera]
572315599	0.013930392	PREDICTED: annexin-B9-like isoform X2 [Apis dorsata]
571531564	0.005428349	PREDICTED: annexin-B9-like [Apis mellifera]
572315597	0.006979615	PREDICTED: annexin-B9-like isoform X1 [Apis dorsata]
572299096	0.007560179	PREDICTED: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type-like isoform X4 [Apis dorsata]
571571517	0.004066035	PREDICTED: ATP-citrate synthase isoform X2 [Apis mellifera]
820838406	0.005106131	PREDICTED: serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform isoform X1 [Apis florea]
820856483	0.002702786	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 [Apis florea]
571559875	0.006862896	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial isoform X2 [Apis mellifera]
572272336	0.006192564	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial-like [Apis dorsata]
328792246	0.006386613	PREDICTED: cat eye syndrome critical region protein 5-like isoformX1 [Apis mellifera]
571522434	0.005553139	PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoform X1 [Apis mellifera]
571522438	0.004313332	PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoform X2 [Apis mellifera]
820853574	0.043300709	PREDICTED: calmodulin [Apis florea]
571567070	0.018934379	PREDICTED: protein l(2)37Cc-like isoform X2 [Apis mellifera]
380029607	0.004435322	PREDICTED: kinesin heavy chain isoform X1 [Apis florea]
571544790	0.005307848	PREDICTED: calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 isoform X1 [Apis mellifera]
571557727	0.002638655	PREDICTED: uncharacterized protein LOC409323 [Apis mellifera]
572262341	0.01580709	PREDICTED: tropomyosin-1-like [Apis dorsata]

572303880	0.014972344	PREDICTED: tropomyosin-1, isoforms 9A/A/B-like isoform X28 [Apis dorsata]
572303876	0.006260123	PREDICTED: tropomyosin-1, isoforms 9A/A/B-like isoform X26 [Apis dorsata]
571568018	0.007908109	PREDICTED: uncharacterized protein LOC408421 isoform X3 [Apis mellifera]
572318283	0.004287814	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: acetyl-coenzyme A synthetase-like [Apis dorsata]
94158854	0.004664614	alpha glucosidase 2 precursor [Apis mellifera]
201023355	0.004304195	protein kinase C [Apis mellifera]
571574163	0.008920976	PREDICTED: aldose reductase-like isoformX1 [Apis mellifera]
820861307	0.004522907	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1-like [Apis florea]
571539825	0.0009751	PREDICTED: V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1-like isoform X2 [Apis mellifera]
820856961	0.005436626	PREDICTED: EH domain-containing protein 3 [Apis florea]
6225644	0.006361321	RecName: Full=Alpha-glucosidase
20138866	0.011600698	RecName: Full=Major royal jelly protein 1
20138892	0.003290342	RecName: Full=Major royal jelly protein 2
571557260	0.004399554	PREDICTED: major royal jelly protein 6 isoform X1 [Apis mellifera]
284812514	0.003672063	MRJP5 [Apis mellifera]
20138902	0.002238027	RecName: Full=Major royal jelly protein 5
692518389	0.021790238	1-cys thioredoxin peroxidase [Apis cerana cerana]
571573725	0.002709207	PREDICTED: putative mitochondrial inner membrane protein-like isoform X1 [Apis mellifera]
373196949	0.005603146	Transferrin [Apis cerana]
572311601	0.006335176	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: alpha-actinin, sarcomeric-like [Apis dorsata]
380018596	0.009632838	PREDICTED: alpha-actinin, sarcomeric [Apis florea]
295842222	0.004292147	thioredoxin reductase 1 isoform 1 [Apis mellifera]
820849095	0.012299937	PREDICTED: probable isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial [Apis florea]
572311840	0.013371403	PREDICTED: soluble NSF attachment protein-like [Apis dorsata]
380024788	0.016922736	PREDICTED: peroxiredoxin 1 [Apis florea]
328777120	0.016873884	PREDICTED: peroxiredoxin 1 [Apis mellifera]
820847160	0.008308621	PREDICTED: eukaryotic initiation factor 4A-I-like [Apis florea]

48126576	0.008504366	PREDICTED: cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit isoform 1 [Apis mellifera]380027942, 373217596
48128966	0.007555854	PREDICTED: NADH-cytochrome b5 reductase 2-like isoformX1 [Apis mellifera]
66563290	0.004331745	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit gamma [Apis mellifera]
48096676	0.004855134	PREDICTED: aminoacylase-1-like [Apis mellifera]
328785330	0.003417616	PREDICTED: staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 [Apis mellifera]
571507879	0.004257025	PREDICTED: ELAV-like protein 2-like isoform X3 [Apis mellifera]
571507939	0.007141781	PREDICTED: ELAV-like protein 2-like isoform X20 [Apis mellifera]
820863657	0.005491649	PREDICTED: synapsin isoform X1 [Apis florea]
572300710	0.006018506	PREDICTED: synapsin-like isoform X2 [Apis dorsata]
571544992	0.004448751	PREDICTED: glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X1 [Apis mellifera]
820845882	0.007209791	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha isoform X1 [Apis florea]
571500335	0.006735335	PREDICTED: endophilin-A isoform X2 [Apis mellifera]
571514258	0.001537637	PREDICTED: calcium-dependent secretion activator isoform X4 [Apis mellifera]
571506305	0.002887841	PREDICTED: mediator of DNA damage checkpoint protein 1 isoform X1 [Apis mellifera]
571525670	0.002633371	PREDICTED: biotin--protein ligase isoform X2 [Apis mellifera]
820850622	0.008141466	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 [Apis florea]
66544702	0.006254833	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit theta-like [Apis mellifera]
820849116	0.004212217	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: T-complex protein 1 subunit beta [Apis florea]
571529935	0.001697314	PREDICTED: neuroglian isoform X3 [Apis mellifera]
571503978	0.004953632	PREDICTED: uncharacterized protein LOC408592 isoform X2 [Apis mellifera]
373212818	0.020047919	Protein lethal(2)essential for life [Apis cerana]
572306621	0.002206626	PREDICTED: hypoxia up-regulated protein 1-like isoform X1 [Apis dorsata]
56405005	0.034320019	RecName: Full=Cytochrome c
380016904	0.008170427	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit d [Apis florea]
66546786	0.004920268	PREDICTED: inositol-3-phosphate synthase 1-B isoformX1 [Apis mellifera]
380024493	0.012853783	PREDICTED: peroxiredoxin-like [Apis florea]
571501685	0.005626125	PREDICTED: transaldolase [Apis mellifera]

571537241	0.005009643	PREDICTED: transcriptional activator protein Pur-beta-B-like isoform X2 [Apis mellifera]
571513382	0.005724432	PREDICTED: excitatory amino acid transporter 2 isoform X1 [Apis mellifera]
571515318	0.003211863	PREDICTED: uncharacterized protein LOC410819 isoform X7 [Apis mellifera]
820852266	0.010357819	PREDICTED: prohibitin-2 [Apis florea]
66521713	0.002936346	PREDICTED: glycine--tRNA ligase [Apis mellifera]
571548426	0.004145492	PREDICTED: long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3-like isoform X6 [Apis mellifera]
820849808	0.002121439	PREDICTED: dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial isoform X6 [Apis florea]
328777671	0.006012042	PREDICTED: inorganic pyrophosphatase-like [Apis mellifera]
119142	0.009955826	RecName: Full=Elongation factor 1-alpha
820858106	0.007935768	PREDICTED: elongation factor 1-alpha [Apis florea]
571547686	0.00152756	PREDICTED: peripheral plasma membrane protein CASK-like isoform X1 [Apis mellifera]
571523799	0.001383525	PREDICTED: diacylglycerol kinase theta-like isoform X3 [Apis mellifera]
820852375	0.007215994	PREDICTED: RNA-binding protein lark isoform X4 [Apis florea]
820838582	0.001359492	PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 14 homolog isoform X1 [Apis florea]
571527134	0.001342181	PREDICTED: oxidation resistance protein 1-like isoform X2 [Apis mellifera]
571525796	0.00164638	PREDICTED: nidogen-2 [Apis mellifera]
572313295	0.014763842	PREDICTED: cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [Apis dorsata]
571578195	0.020284589	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial isoform X1 [Apis mellifera]
572261236	0.00232167	PREDICTED: disks large 1 tumor suppressor protein-like isoform X1 [Apis dorsata]
373213120	0.013390237	Ras-related protein Rab-2A [Apis cerana]
380025855	0.016213283	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial [Apis florea]
751249877	0.009416771	cytochrome c oxidase subunit 2 (mitochondrion) [Apis mellifera syriaca]
571555517	0.008125043	PREDICTED: fumarate hydratase, mitochondrial-like [Apis mellifera]
572306433	0.006601319	PREDICTED: fumarate hydratase, mitochondrial-like [Apis dorsata]
571574167	0.008306996	PREDICTED: TPPP family protein CG4893-like isoform X1 [Apis mellifera]
48104663	0.00862358	PREDICTED: receptor of activated protein kinase C 1 isoformX1 [Apis mellifera]
66546988	0.004379832	PREDICTED: D-arabinitol dehydrogenase 1-like [Apis mellifera]
572257966	0.007023368	PREDICTED: ras-related protein Rab-11A-like isoform X1 [Apis dorsata]572257968, 380017257, 373197600, 373197598

380026307	0.00902194	PREDICTED: phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform [Apis florea]
572307809	0.001334509	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 35-like isoform X3 [Apis dorsata]
328782140	0.001717643	PREDICTED: lon protease homolog, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
110749393	0.001512283	PREDICTED: n-(5-amino-5-carboxypentanoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthase isoform X2 [Apis mellifera]
572318419	0.009445109	PREDICTED: paramyosin, long form-like [Apis dorsata]
373200334	0.005779834	Paramyosin, short form [Apis cerana]
571565753	0.00415685	PREDICTED: fasciclin-3 isoform X1 [Apis mellifera]
572301765	0.00672468	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit D 1-like [Apis dorsata]
373203367	0.001538386	LETM1 and EF-hand domain-containing protein anon-60Da [Apis cerana]
571572473	0.005529687	PREDICTED: protein yellow [Apis mellifera]
820865777	0.001638894	PREDICTED: oxysterol-binding protein-related protein 8 isoform X1 [Apis florea]
571530447	0.002258448	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412543 isoform X2 [Apis mellifera]572312279, 572312281
373197421	0.007448508	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8 [Apis cerana]
380016962	0.008765001	PREDICTED: innexin inx1-like [Apis florea]
820843585	0.002587699	PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A-like isoform X1 [Apis florea]
571541951	0.002524181	PREDICTED: calnexin isoform X1 [Apis mellifera]
572257567	0.000721627	PREDICTED: WD repeat-containing protein 7-like isoform X1 [Apis dorsata]
820850362	0.007745168	PREDICTED: 60S ribosomal protein L7 [Apis florea]
571541810	0.001025681	PREDICTED: neurexin-4 isoform X6 [Apis mellifera]
820863755	0.000441226	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: neurexin-4-like [Apis florea]
209180477	0.004647308	lambda crystallin-like protein [Apis mellifera]
48099278	0.011687676	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial [Apis mellifera]
820835695	0.00117423	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase classes I and II-like [Apis florea]
820835201	0.012316237	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 5A [Apis florea]
58585214	0.016224567	FABP-like protein [Apis mellifera]
572266968	0.012592757	PREDICTED: 40S ribosomal protein S9-like [Apis dorsata]
820843704	0.006303024	PREDICTED: protein NipSnap [Apis florea]

572317668	0.005976453	PREDICTED: protein NipSnap-like [Apis dorsata]
820845072	0.015236549	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100867686 [Apis florea]
380018008	0.005085893	PREDICTED: vesicle-associated membrane protein-associated protein B [Apis florea]
66523051	0.003475202	PREDICTED: probable methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial isoform X6 [Apis mellifera]
66514595	0.012305506	PREDICTED: ras-related protein Rab-3 isoformX2 [Apis mellifera]
373205486	0.004657936	Ras-related protein Rab-8A [Apis cerana]
572305479	0.000545616	PREDICTED: CD2-associated protein-like [Apis dorsata]
66518279	0.004841755	PREDICTED: ras-related protein Rab-10 isoformX2 [Apis mellifera]
571574298	0.002241271	PREDICTED: type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase isoform X1 [Apis mellifera]
380020999	0.007374158	PREDICTED: 60S ribosomal protein L13 [Apis florea]
373211978	0.007289012	40S ribosomal protein SA [Apis cerana]
328793281	0.004187644	PREDICTED: alpha-L-fucosidase [Apis mellifera]
571562753	0.001824662	PREDICTED: casein kinase II subunit alpha isoform X3 [Apis mellifera]
571546438	0.001638724	PREDICTED: NADPH--cytochrome P450 reductase-like isoform X2 [Apis mellifera]
328783393	0.00436601	PREDICTED: uncharacterized protein LOC725661 [Apis mellifera]
820845985	0.004425081	PREDICTED: flotillin-1 isoform X2 [Apis florea]
572316310	0.003974205	PREDICTED: succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial-like isoform X1 [Apis dorsata]
380023762	0.007628981	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P0 [Apis florea]
571539848	0.001839164	PREDICTED: aminopeptidase N-like isoform X2 [Apis mellifera]
328776512	0.006591908	PREDICTED: mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein-like isoform X2 [Apis mellifera]
1883001	0.016070259	histone H4 [Apis mellifera]
380027232	0.00894628	PREDICTED: 40S ribosomal protein S4 [Apis florea]
572310243	0.001302034	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102677944 [Apis dorsata]
571509939	0.003340126	PREDICTED: protein Mo25-like isoform X1 [Apis mellifera]
572305896	0.002387975	PREDICTED: alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] A-like isoform X1 [Apis dorsata]
820857977	0.001130138	PREDICTED: voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-3 isoform X4 [Apis florea]
571547090	0.001829769	PREDICTED: G protein-coupled receptor kinase 1 [Apis mellifera]

572301785	0.002172856	PREDICTED: kinesin light chain-like isoform X1 [Apis dorsata]
572270669	0.004277863	PREDICTED: bleomycin hydrolase-like isoform X2 [Apis dorsata]
328779221	0.002754427	PREDICTED: UDP-glucuronosyltransferase 1-3-like [Apis mellifera]
66501629	0.001054662	PREDICTED: leucine--tRNA ligase, cytoplasmic-like isoformX1 [Apis mellifera]
68532853	0.002191833	acetylcholinesterase [Apis mellifera]
288872185	0.016592009	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 [Apis mellifera]
380013653	0.002545134	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit epsilon [Apis florea]
571550109	0.003641819	PREDICTED: protein kinase shaggy isoform X1 [Apis mellifera]
572314208	0.021069788	PREDICTED: 10 kDa heat shock protein, mitochondrial-like isoform X1 [Apis dorsata]
328778513	0.004488442	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial [Apis mellifera]
571511696	0.007300748	PREDICTED: IQ domain-containing protein E isoform X3 [Apis mellifera]
380012569	0.011409225	PREDICTED: 40S ribosomal protein S8 [Apis florea]
66517659	0.003908494	PREDICTED: glyoxalase domain-containing protein 4-like [Apis mellifera]
56404802	0.016613316	RecName: Full=Profilin
66512107	0.006031652	PREDICTED: proteasome subunit beta type-1 [Apis mellifera]
66556287	0.012582792	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit E isoform 3 [Apis mellifera]
572258774	0.011340491	PREDICTED: ras-like protein 3-like isoform X1 [Apis dorsata]
571514559	0.005477039	PREDICTED: ras-like protein 1-like isoform X2 [Apis mellifera]
380018841	0.00403334	PREDICTED: ras-like protein 2 isoform X1 [Apis florea]
110760701	0.006133376	PREDICTED: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2-like [Apis mellifera]
373196578	0.011069183	Myosin-2 essential light chain [Apis cerana]
380028623	0.005464666	PREDICTED: histone H3 [Apis florea]
571552355	0.001437396	PREDICTED: adenylyl cyclase-associated protein 1-like isoform X3 [Apis mellifera]
380011574	0.008918491	PREDICTED: 40S ribosomal protein S13 isoform X2 [Apis florea]
820845946	0.004004492	PREDICTED: moesin/ezrin/radixin homolog 1 isoform X4 [Apis florea]
380019294	0.004947481	PREDICTED: frequenin-1 [Apis florea]
572304240	0.008276051	PREDICTED: probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like isoform X1 [Apis dorsata]

328784953	0.002804952	PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoformX2 [Apis mellifera]
572316146	0.001876135	PREDICTED: protein 4.1 homolog isoform X7 [Apis dorsata]
571569016	0.007314132	PREDICTED: 40S ribosomal protein S18 [Apis mellifera]
820846579	0.003076835	PREDICTED: syntaxin-1A isoform X1 [Apis florea]
572271845	0.003652953	PREDICTED: hsc70-interacting protein 1-like [Apis dorsata]
373213074	0.004945411	Mitochondrial glutamate carrier 1 [Apis cerana]
820835127	0.005497736	PREDICTED: mitochondrial glutamate carrier 1-like isoform X1 [Apis florea]
571513386	0.012701273	PREDICTED: fatty acid binding protein isoform X1 [Apis mellifera]
373198326	0.001989664	Microtubule-associated protein 2 [Apis cerana]
380028294	0.003696053	PREDICTED: adenylosuccinate synthetase [Apis florea]
48105889	0.004483226	PREDICTED: 60S ribosomal protein L7a [Apis mellifera]
571573593	0.004335053	PREDICTED: dehydrogenase/reductase SDR family member 11-like isoform X1 [Apis mellifera]
328792040	0.003508619	PREDICTED: innexin inx2 [Apis mellifera]
572266386	0.003201935	PREDICTED: innexin inx3-like isoform X1 [Apis dorsata]
373212951	0.003529426	Inositol monophosphatase 1 [Apis cerana]
571516127	0.000430607	PREDICTED: histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific isoform X1 [Apis mellifera]
66530010	0.003638375	PREDICTED: hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2-like isoform X2 [Apis mellifera]
66519390	0.001478979	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 [Apis mellifera]
328791329	0.001122635	PREDICTED: voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-3-like isoform X4 [Apis mellifera]
572268727	0.000468402	PREDICTED: syntaxin-binding protein 5-like [Apis dorsata]
328777798	0.000748429	PREDICTED: probable cationic amino acid transporter-like isoform X3 [Apis mellifera]
572259517	0.006849409	PREDICTED: synaptosomal-associated protein 25-like isoform X2 [Apis dorsata]
571568866	0.008013285	PREDICTED: cytoglobin-1-like isoform X5 [Apis mellifera]
572313106	0.008667034	PREDICTED: ras-related protein Rab-7a-like isoform X1 [Apis dorsata]
820849750	0.001704718	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: sex-lethal homolog [Apis florea]
572309194	0.005470313	PREDICTED: ras-related protein Rab-5C-like [Apis dorsata]
820852789	0.002676008	PREDICTED: phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta isoform X2 [Apis florea]
572306399	0.005001981	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102675653 isoform X1 [Apis dorsata]

572259663	0.008605595	PREDICTED: phosphatidylethanolamine-binding protein homolog F40A3.3-like isoform X1 [Apis dorsata]
571568560	0.001531308	PREDICTED: protein ERGIC-53-like [Apis mellifera]
571574560	0.001082461	PREDICTED: major facilitator superfamily domain-containing protein 6-like isoform X1 [Apis mellifera]
820860777	0.001758612	PREDICTED: endophilin-B1 isoform X1 [Apis florea]
380026255	0.004375215	PREDICTED: programmed cell death protein 6 isoform X1 [Apis florea]
571574656	0.012893964	PREDICTED: complexin isoform X3 [Apis mellifera]
380025630	0.002568765	PREDICTED: calumenin [Apis florea]
335892823	0.001837076	hsp90 co-chaperone Cdc37 [Apis mellifera]
572307233	0.011092453	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3-like [Apis dorsata]
380011215	0.010260062	PREDICTED: 40S ribosomal protein S14 [Apis florea]
328777858	0.000443006	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 13C-like isoform X1 [Apis mellifera]
571575106	0.006466952	PREDICTED: GTP-binding protein SAR1b-like isoform X1 [Apis mellifera]
380030154	0.007651286	PREDICTED: sorting nexin-12 [Apis florea]
380028768	0.014745391	PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit 9 [Apis florea]
571525189	0.010925482	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like [Apis mellifera]
572273461	0.002292573	PREDICTED: serine/arginine-rich splicing factor 4-like isoform X1 [Apis dorsata]
571515395	0.005868057	PREDICTED: tetraspanin-9 isoform X1 [Apis mellifera]
380030776	0.002152277	PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1 [Apis florea]
572263147	0.00271637	PREDICTED: proton-coupled amino acid transporter 1-like isoform X1 [Apis dorsata]
572260357	0.001219917	PREDICTED: prolyl endopeptidase-like isoform X3 [Apis dorsata]
571572956	0.003171837	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F-like isoform X2 [Apis mellifera]
572316903	0.001923494	PREDICTED: phosphatidate cytidyltransferase, photoreceptor-specific-like [Apis dorsata]
373209039	0.001646142	Phosphatidate cytidyltransferase, photoreceptor-specific [Apis cerana]
820834326	0.002449924	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nuclear migration protein nudC [Apis florea]
571551216	0.001497413	PREDICTED: uncharacterized protein LOC409232 [Apis mellifera]
571514456	0.002691572	PREDICTED: RNA-binding protein squid-like [Apis mellifera]
820862939	0.003266229	PREDICTED: ras-like GTP-binding protein Rho1 isoform X1 [Apis florea]
820850221	0.00296425	PREDICTED: protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2 [Apis florea]
380015823	0.001359446	PREDICTED: mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44 [Apis florea]

571512898	0.004015968	PREDICTED: uncharacterized protein LOC408695 [Apis mellifera]
820841191	0.001032479	PREDICTED: fasciclin-2 isoform X7 [Apis florea]
48096310	0.001733842	PREDICTED: actin-related protein 2/3 complex subunit 1A [Apis mellifera]
571573218	0.001632499	PREDICTED: hexokinase type 2-like isoform X1 [Apis mellifera]
380017985	0.001572693	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tyrosine 3-monooxygenase [Apis florea]
572306215	0.001990643	PREDICTED: tyrosine 3-monooxygenase-like isoform X2 [Apis dorsata]
572264939	0.000708338	PREDICTED: apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial-like [Apis dorsata]
110749921	0.001377448	PREDICTED: mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50-C-like [Apis mellifera]
572272617	0.002074528	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14-like [Apis dorsata]
66506623	0.002350061	PREDICTED: 60S ribosomal protein L15 [Apis mellifera]
571502919	0.001137968	PREDICTED: uncharacterized protein LOC413056 [Apis mellifera]
571541896	0.001301236	PREDICTED: twinfilin isoform X1 [Apis mellifera]
328780929	0.002051092	PREDICTED: uncharacterized protein LOC725439 isoform 1 [Apis mellifera]
820843158	0.001717022	PREDICTED: potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3 isoform X1 [Apis florea]
380027884	0.004038712	PREDICTED: ras-related protein Rac1 [Apis florea]
66509892	0.004684202	PREDICTED: cdc42 homolog isoformX1 [Apis mellifera]
572314070	0.00648671	PREDICTED: cdc42 homolog isoform X1 [Apis dorsata]
226882323	0.001604606	unnamed protein product [Apis mellifera]
820859024	0.003952413	PREDICTED: troponin I isoform X3 [Apis florea]
820835081	0.001403129	PREDICTED: sorting nexin-2 [Apis florea]
110755329	0.002119976	PREDICTED: neurofilament heavy polypeptide [Apis mellifera]
373195158	0.001751352	hypothetical protein ACCB00056.6 [Apis cerana]
380029249	0.001991841	PREDICTED: tumor protein D53 homolog isoform X1 [Apis florea]
110762610	0.001197325	PREDICTED: neurotactin [Apis mellifera]
820861168	0.007621163	PREDICTED: 60S ribosomal protein L17 [Apis florea]
820859526	0.001545267	PREDICTED: actin-binding LIM protein 1 isoform X12 [Apis florea]
110755392	0.001801635	PREDICTED: probable dynactin subunit 2 isoform X1 [Apis mellifera]
572270251	0.003172754	PREDICTED: microtubule-associated protein RP/EB family member 1-like isoform X3 [Apis dorsata]

571542593	0.000357788	PREDICTED: rho GTPase-activating protein 100F-like isoform X6 [Apis mellifera]
572299441	0.004135862	PREDICTED: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A-like isoform X1 [Apis dorsata]
373196149	0.001663747	Sodium/potassium/calcium exchanger 5 [Apis cerana]
373202655	0.00483954	60S ribosomal protein L13a [Apis cerana]
328779079	0.003029793	PREDICTED: fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A-like isoform X3 [Apis mellifera]
820862751	0.002223877	PREDICTED: O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD2-like isoform X1 [Apis florea]
373210886	0.001384462	Protein extra bases [Apis cerana]
328784430	0.002784155	PREDICTED: UDP-glucuronosyltransferase 2A3-like isoform X2 [Apis mellifera]
373202595	0.011935764	Histone H2A [Apis cerana]
380023501	0.002611947	PREDICTED: quinone oxidoreductase isoform X1 [Apis florea]
66565444	0.007333117	PREDICTED: 60S ribosomal protein L9 [Apis mellifera]
380016718	0.000910177	PREDICTED: zinc finger RNA-binding protein isoform X1 [Apis florea]
572313124	0.006715213	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit F 1-like [Apis dorsata]
328793605	0.000911428	PREDICTED: farnesyl pyrophosphate synthase-like [Apis mellifera]
572267768	0.003460316	PREDICTED: 60S ribosomal protein L5-like [Apis dorsata]
820845830	0.004846706	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: RNA-binding protein squid [Apis florea]
571518685	0.000272658	PREDICTED: protein retinal degeneration B isoform X1 [Apis mellifera]
572272235	0.001583522	PREDICTED: inosine-5'-monophosphate dehydrogenase-like [Apis dorsata]
380024395	0.003276644	PREDICTED: glutaredoxin 3 [Apis florea]
820860222	0.003942307	PREDICTED: nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform X1 [Apis florea]
571560836	0.002438806	PREDICTED: excitatory amino acid transporter 1-like isoform X1 [Apis mellifera]
571529541	0.000884766	PREDICTED: extended synaptotagmin-1 isoform X1 [Apis mellifera]
571522941	0.001623028	PREDICTED: proliferation-associated protein 2G4-like [Apis mellifera]
820865185	0.006239663	PREDICTED: actin-related protein 2/3 complex subunit 5 [Apis florea]
380027242	0.007494099	PREDICTED: 40S ribosomal protein S10-like isoform X1 [Apis florea]
328788965	0.001752864	PREDICTED: TOM1-like protein 2-like isoform X1 [Apis mellifera]
820837510	0.002167737	PREDICTED: proton-coupled amino acid transporter 4 [Apis florea]
820863451	0.000678602	PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 isoform X1 [Apis florea]
202078686	0.006837815	defensin [Apis cerana cerana]

48104474	0.007943138	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial [Apis mellifera]
820857514	0.003459316	PREDICTED: F-actin-capping protein subunit alpha [Apis florea]
572310918	0.001643493	PREDICTED: tropomodulin-like isoform X1 [Apis dorsata]
571500899	0.007840502	PREDICTED: 60S ribosomal protein L14 isoform X2 [Apis mellifera]
66564615	0.007139756	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 N [Apis mellifera]
571542426	0.000798696	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase OSR1-like isoform X1 [Apis mellifera]
571518500	0.00430533	PREDICTED: 40S ribosomal protein S21-like isoform X1 [Apis mellifera]
380014351	0.008317903	PREDICTED: ADP-ribosylation factor-like protein 8B-A [Apis florea]
380018266	0.005315011	PREDICTED: probable NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial [Apis florea]
373211236	0.005009045	Ras-related protein Rab-14 [Apis cerana]
820846607	0.000320646	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC100871025 [Apis florea]
373216366	0.003992573	hypothetical protein ACCB13413 [Apis cerana]
820859670	0.00026922	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: translational activator GCN1 [Apis florea]
572317526	0.005966062	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 1-like isoform X1 [Apis dorsata]
380029629	0.003946055	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 2 [Apis florea]
328787912	0.002878097	PREDICTED: protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase-like isoform X2 [Apis mellifera]5
74835476	0.00477408	RecName: Full=Icarapin-like
572314603	0.000402523	PREDICTED: synaptojanin-1-like [Apis dorsata]
328786212	0.00068776	PREDICTED: tubulin-specific chaperone E-like [Apis mellifera]
572315191	0.008039058	PREDICTED: 60S ribosomal protein L30-like [Apis dorsata]
283436150	0.002411152	adenylate kinase 1 [Apis mellifera]
571528288	0.013240782	PREDICTED: 40S ribosomal protein S29-like isoform X1 [Apis mellifera]
110764763	0.009230252	PREDICTED: ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]
572314998	0.007169133	PREDICTED: ribonuclease kappa-like [Apis dorsata]
380022345	0.005050528	PREDICTED: vesicle-associated membrane protein 2 [Apis florea]
572306522	0.01014674	PREDICTED: ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial-like isoform X2 [Apis dorsata]
571520912	0.001084136	PREDICTED: aquaporin AQPAn.G-like isoform X1 [Apis mellifera]
380017357	0.005222808	PREDICTED: transmembrane emp24 domain-containing protein bai [Apis florea]

572307623	0.004172312	PREDICTED: 40S ribosomal protein S24-like isoform X1 [Apis dorsata]
571501696	0.001836379	PREDICTED: 60S ribosomal protein L10a [Apis mellifera]
572301034	0.000848837	PREDICTED: RNA-binding protein Nova-1-like isoform X1 [Apis dorsata]
572299360	0.009085832	PREDICTED: myosin light chain alkali-like isoform X1 [Apis dorsata]
328779806	0.001001407	PREDICTED: microtubule-associated protein Jupiter-like isoform X1 [Apis mellifera]
572258698	0.002081142	PREDICTED: ubiquitin-fold modifier 1-like isoform X1 [Apis dorsata]
572310713	0.004070471	PREDICTED: histone H1B-like [Apis dorsata]
572313013	0.001388947	PREDICTED: glycine receptor subunit alpha-3-like isoform X1 [Apis dorsata]
66507736	0.003490667	PREDICTED: transcription elongation factor B polypeptide 2 [Apis mellifera]
571577867	0.001103439	PREDICTED: sialin-like isoform X2 [Apis mellifera]
572298191	0.000764305	PREDICTED: protein FAM98A-like [Apis dorsata]
572317037	0.001488562	PREDICTED: 2-acylglycerol O-acyltransferase 1-like [Apis dorsata]
380019307	0.002397593	PREDICTED: calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2 isoform X1 [Apis florea]
380030493	0.001379205	PREDICTED: ras-related protein Rab-37 isoform X1 [Apis florea]
572267695	0.000899141	PREDICTED: probable histone-binding protein Caf1-like [Apis dorsata]
571578355	0.003042105	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 [Apis mellifera]
571570205	0.002069561	PREDICTED: cytochrome P450 9e2 [Apis mellifera]
820843096	0.005383602	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 60S ribosomal protein L26 [Apis florea]
315258197	0.001344903	p42 mitogen-activated protein kinase [Apis cerana cerana]5
572267423	0.001336561	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R-like isoform X1 [Apis dorsata]
571526318	0.002040009	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R-like isoform X4 [Apis mellifera]
328780104	0.001056449	PREDICTED: sorting and assembly machinery component 50 homolog [Apis mellifera]
820843760	0.002027408	PREDICTED: gamma-soluble NSF attachment protein-like [Apis florea]
571509569	0.001607828	PREDICTED: hrp65 protein-like isoform X2 [Apis mellifera]
571523225	0.000685914	PREDICTED: hemK methyltransferase family member 1-like isoform X2 [Apis mellifera]
380026816	0.004184701	PREDICTED: mitochondrial fission 1 protein [Apis florea]
380029409	0.003742949	PREDICTED: 60S ribosomal protein L24 [Apis florea]
572267871	0.002124786	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog [Apis dorsata]
572258084	0.000936009	PREDICTED: solute carrier family 25 member 40-like [Apis dorsata]

380022616	0.001624891	PREDICTED: endoplasmic reticulum resident protein 44 isoform X1 [Apis florea]
820841935	0.000925067	PREDICTED: catenin delta-2 isoform X8 [Apis florea]
66553455	0.001685699	PREDICTED: prostaglandin reductase 1-like [Apis mellifera]
571576551	0.001182689	PREDICTED: long-chain fatty acid transport protein 4-like isoform X1 [Apis mellifera]
820861164	0.00149867	PREDICTED: dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase dSOR1 [Apis florea]
572307917	0.000978587	PREDICTED: oxysterol-binding protein 1-like isoform X6 [Apis dorsata]
328788786	0.004092548	PREDICTED: 39S ribosomal protein L12, mitochondrial [Apis mellifera]
572302699	0.000442656	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: c-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic-like [Apis dorsata]
572313289	0.000629448	PREDICTED: hemicentin-1-like isoform X1 [Apis dorsata]
820836779	0.001385398	PREDICTED: ras-related protein Rab6 isoform X1 [Apis florea]
572311716	0.00454784	PREDICTED: proteasome subunit beta type-2-like [Apis dorsata]
572259951	0.001072694	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E-like isoform X1 [Apis dorsata]
572258732	0.001597602	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H-like [Apis dorsata]
380011097	0.002666878	PREDICTED: oligosaccharyltransferase complex subunit ostc-A isoform X1 [Apis florea]
380019913	0.002140825	PREDICTED: ADP-ribosylation factor-like protein 1 isoform X1 [Apis florea]
572270872	0.001601902	PREDICTED: fragile X mental retardation syndrome-related protein 1-like, partial [Apis dorsata]
380016984	0.00309924	PREDICTED: putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase dodo [Apis florea]
572309678	0.001857829	PREDICTED: 40S ribosomal protein S7-like [Apis dorsata]
571523773	0.000934711	PREDICTED: ER membrane protein complex subunit 1-like isoform X1 [Apis mellifera]
373193827	0.001025587	Poly(rC)-binding protein 3 [Apis cerana]
380027158	0.001938111	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-6-like [Apis florea]
328788607	0.003623305	PREDICTED: 60S ribosomal protein L27 isoform X1 [Apis mellifera]3
380027733	0.000452826	PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 [Apis florea]
820842479	0.005483557	PREDICTED: calcineurin subunit B type 2 [Apis florea]
572272221	0.004045081	PREDICTED: 40S ribosomal protein S11-like isoform X1 [Apis dorsata]
572307466	0.001182875	PREDICTED: annexin-B11-like isoform X1 [Apis dorsata]
66525633	0.002380243	PREDICTED: sideroflexin-3-like isoform 1 [Apis mellifera]
328781627	0.002322668	PREDICTED: FUN14 domain-containing protein 1-like isoformX1 [Apis mellifera]
380021155	0.004008115	PREDICTED: thioredoxin-like protein 1 [Apis florea]

373196564	0.001419392	Lysophospholipid acyltransferase 7 [Apis cerana]
380025956	0.001798625	PREDICTED: optic atrophy 3 protein homolog [Apis florea]
373203303	0.001962976	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal [Apis cerana]
571500154	0.003062186	PREDICTED: alkyldihydroxyacetonephosphate synthase-like [Apis mellifera]
571541537	0.001849621	PREDICTED: uncharacterized protein LOC413002 isoform X1 [Apis mellifera]
380011417	0.001479193	PREDICTED: probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 [Apis florea]
380024539	0.0013494	PREDICTED: dihydropteridine reductase [Apis florea]
66547760	0.003237594	PREDICTED: dihydropteridine reductase isoform X2 [Apis mellifera]
572259881	0.001195937	PREDICTED: vesicular integral-membrane protein VIP36-like isoform X1 [Apis dorsata]
380030656	0.00262758	PREDICTED: isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial-like [Apis florea]
66522232	0.002906148	PREDICTED: isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial-like isoform X3 [Apis mellifera]
572301703	0.005217911	PREDICTED: protein lin-7 homolog C-like isoform X2 [Apis dorsata]
328787790	0.006530858	PREDICTED: peroxiredoxin-5, mitochondrial [Apis mellifera]
380015827	0.001380791	PREDICTED: actin-related protein 10 [Apis florea]
820856810	0.000431062	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: pre-mRNA-processing factor 39 [Apis florea]
571573858	0.001017673	PREDICTED: probable proline--tRNA ligase, mitochondrial-like isoform X1 [Apis mellifera]
571536703	0.000378462	PREDICTED: flocculation protein FLO11-like isoform X1 [Apis mellifera]
572269059	0.000424925	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I-like isoform X1 [Apis dorsata]
820859073	0.000583985	PREDICTED: RIMS-binding protein 2-like isoform X7 [Apis florea]
572264935	0.00322426	PREDICTED: glucosamine-6-phosphate isomerase-like [Apis dorsata]
48097144	0.003719435	PREDICTED: probable signal peptidase complex subunit 2-like [Apis mellifera]
572265932	0.005396377	PREDICTED: 60S ribosomal protein L22-like isoform X1 [Apis dorsata]
572300575	0.000565974	PREDICTED: 1-acylglycerophosphocholine O-acyltransferase 1-like isoform X1 [Apis dorsata]
571550579	0.001357349	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: aldehyde dehydrogenase family 3 member B1 [Apis mellifera]
572303738	0.000883376	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: aldehyde dehydrogenase family 3 member B1-like [Apis dorsata]
571538866	0.001411114	PREDICTED: vesicular acetylcholine transporter-like isoform X2 [Apis mellifera]
328793299	0.000687902	PREDICTED: putative leucine-rich repeat-containing protein DDB_G0290503 isoform X2 [Apis mellifera]
572311210	0.000541267	PREDICTED: protein EFR3 homolog cmp44E-like isoform X1 [Apis dorsata]
373209138	0.003366459	Membrane-associated progesterone receptor component 2 [Apis cerana]

328793182	0.002809885	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial [Apis mellifera]
380027184	0.001153201	PREDICTED: putative adenosylhomocysteinase 2 isoform X1 [Apis florea]
572315849	0.001009679	PREDICTED: nucleosome assembly protein 1-like 1-like isoform X2 [Apis dorsata]
296524902	0.001418306	unnamed protein product [Apis mellifera]
571504286	0.00058564	PREDICTED: lanC-like protein 2-like isoform X1 [Apis mellifera]
572314414	0.004665445	PREDICTED: S-phase kinase-associated protein 1-like [Apis dorsata]
572263859	0.005395707	PREDICTED: cytochrome b5-like isoform X1 [Apis dorsata]
380014028	0.007036722	PREDICTED: 40S ribosomal protein S15Aa [Apis florea]
380019464	0.001733108	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 4B [Apis florea]
820841949	0.002072428	PREDICTED: selenide, water dikinase [Apis florea]
572304608	0.003694493	PREDICTED: PRA1 family protein 3-like isoform X1 [Apis dorsata]
572316648	0.006117551	PREDICTED: 40S ribosomal protein S25-like [Apis dorsata]
820864903	0.000519545	PREDICTED: vigilin [Apis florea]
820860424	0.001175279	PREDICTED: membrane metallo-endopeptidase-like 1 isoform X2 [Apis florea]
328778117	0.001573817	PREDICTED: homer protein homolog 2-like isoform X2 [Apis mellifera]
571537192	0.001891274	PREDICTED: peroxisomal multifunctional enzyme type 2-like isoform X2 [Apis mellifera]
373196861	0.001104686	RNA-binding protein Musashi Rbp6 [Apis cerana]
328789473	0.000773126	PREDICTED: glucosidase 2 subunit beta-like [Apis mellifera]
380022797	0.00551934	PREDICTED: 40S ribosomal protein S3a [Apis florea]
572312126	0.001498685	PREDICTED: chloride intracellular channel exc-4-like [Apis dorsata]
572267493	0.002840063	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit G-like [Apis dorsata]
820859621	0.000360981	PREDICTED: carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform isoform X1 [Apis florea]
820848725	0.000471561	PREDICTED: adenylate cyclase type 8-like isoform X4 [Apis florea]
380022788	0.001688101	PREDICTED: putative fatty acyl-CoA reductase CG5065 [Apis florea]
572310454	0.002345979	PREDICTED: dynactin subunit 3-like [Apis dorsata]
572271226	0.001997051	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102674958 isoform X1 [Apis dorsata]
820856995	0.005039282	PREDICTED: 40S ribosomal protein S5 [Apis florea]
820842565	0.000374361	PREDICTED: multidrug resistance-associated protein 4-like [Apis florea]
380030448	0.004352743	PREDICTED: calcyclin-binding protein [Apis florea]

572297140	0.004374006	PREDICTED: calcyclin-binding protein-like [Apis dorsata]
380027029	0.001629466	PREDICTED: proteasome subunit beta type-7 [Apis florea]
571552022	0.005442627	PREDICTED: protein tyrosine phosphatase type IVA 1 [Apis mellifera]
820861324	0.00188141	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, A2/B1 homolog isoform X1 [Apis florea]
41350389	0.001054119	prophenoloxidase [Apis mellifera]
571559827	0.00195184	PREDICTED: alpha-tocopherol transfer protein-like isoform X2 [Apis mellifera]
66552169	0.004436283	PREDICTED: 60S ribosomal protein L28 [Apis mellifera]
571576251	0.000429739	PREDICTED: bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase [Apis mellifera]
820864548	0.001868769	PREDICTED: reticulocalbin-2 [Apis florea]
380030652	0.004051888	PREDICTED: translation machinery-associated protein 7 homolog [Apis florea]
820861319	0.002248401	PREDICTED: renin receptor isoform X1 [Apis florea]
572262093	0.001122359	PREDICTED: O-phosphoseryl-tRNA(Sec) selenium transferase-like isoform X2 [Apis dorsata]
380013537	0.006605531	PREDICTED: globin [Apis florea]
572316658	0.001912565	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: proteasome subunit alpha type-5-like [Apis dorsata]
380018691	0.003373211	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: GTP-binding nuclear protein Ran-like [Apis florea]5
820842013	0.001987335	PREDICTED: RNA-binding protein cabeza-like isoform X1 [Apis florea]5
572310221	0.003042163	PREDICTED: cytochrome c1, heme protein, mitochondrial-like isoform X1 [Apis dorsata]
820858553	0.000293562	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ribosomal protein S6 kinase 2 beta-like [Apis florea]
572258970	0.001153651	PREDICTED: cAMP-dependent protein kinase type I regulatory subunit-like isoform X1 [Apis dorsata]
820856523	0.000490408	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: exportin-7 [Apis florea]
380022226	0.003694437	PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis florea]
373203380	0.001037215	Sorting nexin-6 [Apis cerana]
820838651	0.000552035	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 [Apis florea]
572313137	0.003209892	PREDICTED: protein translation factor SUI1 homolog [Apis dorsata]
572266421	0.000384244	PREDICTED: coatomer subunit gamma-like isoform X1 [Apis dorsata]
66564441	0.000750538	PREDICTED: protein rogdi isoform X2 [Apis mellifera]
820849093	0.001060327	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: myelin expression factor 2 [Apis florea]
380017591	0.002247251	PREDICTED: 60S ribosomal protein L8 [Apis florea]
29329817	0.000272458	vitellogenin precursor [Apis mellifera]

571515814	0.000134486	PREDICTED: ryanodine receptor 44F isoform X1 [Apis mellifera]
820858673	9.22E-05	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ryanodine receptor 44F-like [Apis florea]
66524513	0.001009485	PREDICTED: coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 6B, mitochondrial-like [Apis mellifera]
328783818	0.00491589	PREDICTED: dynein light chain 2, cytoplasmic [Apis mellifera]
820834965	0.002210348	PREDICTED: 40S ribosomal protein S12 [Apis florea]
373202641	0.001068657	26S protease regulatory subunit 4 [Apis cerana]
380011733	0.004730019	PREDICTED: mitochondrial pyruvate carrier 1 [Apis florea]
380022185	0.005173621	PREDICTED: 28S ribosomal protein S36, mitochondrial [Apis florea]
572260962	0.003791606	PREDICTED: thioredoxin-2-like [Apis dorsata]
373197090	0.001979056	RNA-binding protein 1 [Apis cerana]
751249881	0.003192747	NADH dehydrogenase subunit 3 (mitochondrion) [Apis mellifera syriaca]
48102954	0.001434238	PREDICTED: small ubiquitin-related modifier-like [Apis mellifera]
572264811	0.000671997	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4-like isoform X1 [Apis dorsata]
66534766	0.004714419	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial [Apis mellifera]
571510083	0.00192087	PREDICTED: probable oligoribonuclease-like [Apis mellifera]
380012521	0.000503128	PREDICTED: protein transport protein Sec23A isoform X1 [Apis florea]
572308627	0.000938217	PREDICTED: COMM domain-containing protein 4-like [Apis dorsata]
572300087	0.000901808	PREDICTED: selT-like protein-like [Apis dorsata]
820864493	0.000823962	PREDICTED: 26S protease regulatory subunit 8 isoform X3 [Apis florea]
110761892	0.001017119	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G-like [Apis mellifera]
571527711	0.00237807	PREDICTED: guanylate kinase-like isoform X1 [Apis mellifera]
380021928	0.003136604	PREDICTED: glutaredoxin-C4-like isoform X1 [Apis florea]
820852550	0.003370954	PREDICTED: mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 [Apis florea]
328778804	0.001008265	PREDICTED: SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein homolog isoform X2 [Apis mellifera]
820853020	0.000145855	PREDICTED: protein argonaute-2 isoform X2 [Apis florea]
380023023	0.00268147	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-2 [Apis florea]
572265371	0.000898936	PREDICTED: integral membrane protein 2C-like isoform X2 [Apis dorsata]
820859777	0.001167008	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100865514 isoform X1 [Apis florea]

380020023	0.002861365	PREDICTED: clathrin light chain isoform X1 [Apis florea]
572266058	0.00049423	PREDICTED: syntaxin-12-like isoform X1 [Apis dorsata]
572263089	0.000218417	PREDICTED: restin homolog [Apis dorsata]
190360038	0.002058402	RecName: Full=Prohormone-3
328779207	0.000378188	PREDICTED: protein NDRG3-like isoformX1 [Apis mellifera]
110748994	0.00112576	PREDICTED: arrestin domain-containing protein 3 isoform X1 [Apis mellifera]
66499475	0.002686873	PREDICTED: receptor expression-enhancing protein 5-like isoform X2 [Apis mellifera]
380028799	0.001099771	PREDICTED: mitochondrial dicarboxylate carrier [Apis florea]
66555021	0.00181576	PREDICTED: apolipoprotein D-like isoform 2 [Apis mellifera]
820857278	0.000999745	PREDICTED: dnaJ protein homolog 1-like [Apis florea]
572258261	0.000728811	PREDICTED: TAR DNA-binding protein 43-like isoform X1 [Apis dorsata]
572312101	0.000156894	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102676065 [Apis dorsata]
572267535	0.00095364	PREDICTED: 5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1-like [Apis dorsata]
571506170	0.000574111	PREDICTED: carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial-like isoform 1, partial [Apis mellifera]
572310219	0.000934104	PREDICTED: protein LSM14 homolog A-like isoform X2 [Apis dorsata]
820861514	0.005306452	PREDICTED: AP-2 complex subunit sigma [Apis florea]
110750141	0.001082509	PREDICTED: mitochondrial coenzyme A transporter SLC25A42-like isoformX1 [Apis mellifera]
820860122	0.000492099	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ras-related protein Rab-39B [Apis florea]
820846153	0.001188217	PREDICTED: polyadenylate-binding protein 2-B [Apis florea]
48101936	0.002661116	PREDICTED: acyl-protein thioesterase 1-like [Apis mellifera]
380028805	0.0011387	PREDICTED: transmembrane protein 242 [Apis florea]
571571878	0.00254876	PREDICTED: succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial [Apis mellifera]
572268847	0.000460542	PREDICTED: antithrombin-III-like [Apis dorsata]
820851774	0.002443896	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa [Apis florea]
380022623	0.001951364	PREDICTED: CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 8 [Apis florea]
572297647	0.000543894	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102679326 isoform X1 [Apis dorsata]
572263770	0.00115576	PREDICTED: probable elongation factor 1-delta-like isoform X4 [Apis dorsata]
572259323	0.000393512	PREDICTED: MAGUK p55 subfamily member 7-like isoform X1 [Apis dorsata]
380019974	0.000296716	PREDICTED: guanylate cyclase soluble subunit beta-1 isoform X1 [Apis florea]

94400883	0.001094008	unzipped precursor [Apis mellifera]
571563645	0.001507693	PREDICTED: ras suppressor protein 1 isoform X1 [Apis mellifera]
820842359	0.001964259	PREDICTED: translocon-associated protein subunit gamma [Apis florea]
820854467	0.001596179	PREDICTED: ferrochelatase, mitochondrial [Apis florea]
571518621	0.002270656	PREDICTED: transmembrane protein 11, mitochondrial [Apis mellifera]
572268357	0.000414078	PREDICTED: multidrug resistance-associated protein 1-like [Apis dorsata]
66504157	0.000760775	PREDICTED: protein THEM6-like [Apis mellifera]
571568168	0.000794059	PREDICTED: COP9 signalosome complex subunit 7-like isoform X1 [Apis mellifera]
820844783	0.000918325	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C isoform X1 [Apis florea]
571520744	0.001230111	PREDICTED: uncharacterized protein LOC725167 [Apis mellifera]
820861754	0.000666955	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: retinol dehydrogenase 11-like [Apis florea]
380015872	0.000851555	PREDICTED: adenosylhomocysteinase [Apis florea]
820843403	0.001115786	PREDICTED: RISC-loading complex subunit tarbp2-like isoform X2 [Apis florea]
66561002	0.001370545	PREDICTED: translocator protein-like [Apis mellifera]
571544898	0.000586167	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3-like [Apis mellifera]
572265625	0.000110774	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog isoform X1 [Apis dorsata]
380029847	0.000358534	PREDICTED: protein FAM73B [Apis florea]
380024603	0.000969453	PREDICTED: heparanase-like isoform X1 [Apis florea]
571508080	0.000492479	PREDICTED: potassium voltage-gated channel protein Shal isoform X2 [Apis mellifera]
572308155	0.001507021	PREDICTED: L-xylulose reductase-like [Apis dorsata]
820860335	0.000419497	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase 3 isoform X1 [Apis florea]
373214729	0.000743804	Leucine carboxyl methyltransferase 1 [Apis cerana]
820864117	0.000966393	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H [Apis florea]
571554543	0.001454009	PREDICTED: pyridoxal kinase-like [Apis mellifera]
572300883	0.001197329	PREDICTED: protein arginine N-methyltransferase 8-like isoform X1 [Apis dorsata]
820855057	0.00393446	PREDICTED: 60S ribosomal protein L12 [Apis florea]
357374593	0.002485939	zeta-class glutathione S-transferase [Apis cerana cerana]
572316988	0.000442849	PREDICTED: actin-related protein 2-like isoform X1 [Apis dorsata]

820849253	0.000430888	PREDICTED: large proline-rich protein BAG6 isoform X1 [Apis florea]
571564699	0.000161653	PREDICTED: acetyl-CoA carboxylase-like isoform X4 [Apis mellifera]
571500581	0.000491214	PREDICTED: flocculation protein FLO11-like [Apis mellifera]
572258601	0.000290691	PREDICTED: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase-like isoform X1 [Apis dorsata]
572301748	0.001124616	PREDICTED: calcineurin B homologous protein 1-like [Apis dorsata]
572271839	0.00235757	PREDICTED: sarcalumenin-like isoform X2 [Apis dorsata]
380025404	0.000470727	PREDICTED: abhydrolase domain-containing protein 4 isoform X1 [Apis florea]
328778481	0.000683718	PREDICTED: thioredoxin domain-containing protein 5-like isoform 1 [Apis mellifera]
328793467	0.000301742	PREDICTED: golgin subfamily A member 2-like isoform X2 [Apis mellifera]
572261787	0.000100622	PREDICTED: MAP kinase-activating death domain protein-like isoform X1 [Apis dorsata]
820855848	8.95E-05	PREDICTED: MAP kinase-activating death domain protein isoform X8 [Apis florea]
572308576	0.000207998	PREDICTED: apoptosis-inducing factor 3-like isoform X1 [Apis dorsata]
380025442	0.00033959	PREDICTED: nucleoporin SEH1 [Apis florea]
571563419	0.001089263	PREDICTED: myosin regulatory light chain 2 [Apis mellifera]
572270566	0.004508865	PREDICTED: putative ATP synthase subunit f, mitochondrial-like [Apis dorsata]
572314214	0.000755839	PREDICTED: DEAD-box helicase Dbp80-like isoform X1 [Apis dorsata]
66514467	0.000974725	PREDICTED: GTP-binding protein 128up-like isoform 1 [Apis mellifera]
572271556	0.000208827	PREDICTED: transportin-1-like isoform X1 [Apis dorsata]
334883143	0.000952315	quinone oxidoreductase-like protein 2-like [Apis mellifera]
571520603	0.000105038	PREDICTED: uncharacterized protein LOC725508 isoform X3 [Apis mellifera]
820847144	0.002597979	PREDICTED: 60S ribosomal protein L23a [Apis florea]
820838994	0.000977374	PREDICTED: TBC1 domain family member 24 isoform X1 [Apis florea]
820857406	0.000164745	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X [Apis florea]
820846302	0.000748698	PREDICTED: amphiphysin isoform X4 [Apis florea]
820841420	0.000203214	PREDICTED: ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial isoform X1 [Apis florea]
571529120	0.00023672	PREDICTED: putative cysteine proteinase CG12163-like isoform X1 [Apis mellifera]
328789199	0.000423345	PREDICTED: cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase, isoforms N/G isoform X20 [Apis mellifera]
572309704	0.001729501	PREDICTED: ER membrane protein complex subunit 4-like [Apis dorsata]
572315383	0.000218063	PREDICTED: anion exchange protein 2-like isoform X1 [Apis dorsata]

380020344	0.000192646	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase [Apis florea]
380012858	0.000841587	PREDICTED: epimerase family protein SDR39U1 [Apis florea]
571556745	0.001045634	PREDICTED: geranylgeranyl pyrophosphate synthase-like isoform X2 [Apis mellifera]
572299205	0.001518271	PREDICTED: putative tricarboxylate transport protein, mitochondrial-like [Apis dorsata]
380023416	0.002388089	PREDICTED: 60S ribosomal protein L21 [Apis florea]
571549476	0.000782387	PREDICTED: putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
820837484	0.002525734	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 [Apis florea]
572267144	0.001074471	PREDICTED: casein kinase II subunit beta-like isoform X1 [Apis dorsata]
820860465	0.000911984	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 4H isoform X1 [Apis florea]
571575465	0.001644061	PREDICTED: nuclease-sensitive element-binding protein 1 isoform X1 [Apis mellifera]
572311848	0.001125422	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F-like [Apis dorsata]
66526670	0.000737742	PREDICTED: methionine aminopeptidase 2 [Apis mellifera]
820836518	0.001056254	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 5 [Apis florea]
571504099	0.000616912	PREDICTED: mitochondrial carrier homolog 2 isoform X2 [Apis mellifera]
820839730	0.002439583	PREDICTED: prostaglandin E synthase 3 [Apis florea]
820840540	0.000399422	PREDICTED: plastin-2 isoform X1 [Apis florea]
380019019	0.002419761	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 6 [Apis florea]
328790249	4.20E-05	PREDICTED: cytoskeleton-associated protein 5 isoform X2 [Apis mellifera]
572302959	0.00101015	PREDICTED: probable dolichol-phosphate mannosyltransferase-like [Apis dorsata]
820863825	0.000587695	PREDICTED: oxysterol-binding protein-related protein 2 isoform X2 [Apis florea]
572268643	0.000952284	PREDICTED: glycine-rich cell wall structural protein 1.8-like isoform X2 [Apis dorsata]
328790514	0.000141019	PREDICTED: alsin-like [Apis mellifera]
571558143	0.000763194	PREDICTED: serine hydroxymethyltransferase, cytosolic isoform X1 [Apis mellifera]
571508759	0.000929106	PREDICTED: long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2 isoform X3 [Apis mellifera]
571528324	0.00101741	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: calcium-independent protein kinase C-like [Apis mellifera]
253786862	0.000102519	unnamed protein product [Apis mellifera]
572263665	0.001406806	PREDICTED: proteasome inhibitor PI31 subunit-like isoform X1 [Apis dorsata]
380020594	0.000405823	PREDICTED: coatomer subunit beta' [Apis florea]

820840052	0.003241813	PREDICTED: 60S ribosomal protein L27a [Apis florea]
373208630	0.000412055	Cysteinyl-tRNA synthetase, cytoplasmic [Apis cerana]
572261991	0.00011653	PREDICTED: phosphatidylinositol phosphatase SAC2-like isoform X1 [Apis dorsata]
380027365	0.001995261	PREDICTED: proteasome subunit beta type-6 [Apis florea]
571515342	0.001558603	PREDICTED: MOSC domain-containing protein 2, mitochondrial-like [Apis mellifera]
571539513	0.000402736	PREDICTED: gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta isoform X3 [Apis mellifera]
571539411	5.76E-06	PREDICTED: titin isoform X14 [Apis mellifera]
571501639	0.000484414	PREDICTED: regulator of microtubule dynamics protein 2-like isoform X2 [Apis mellifera]
820838367	0.001115099	PREDICTED: transmembrane emp24 domain-containing protein-like [Apis florea]
313471717	0.001458802	RecName: Full=Venom serine carboxypeptidase
380030341	0.002244675	PREDICTED: surfeit locus protein 4 homolog [Apis florea]
572260643	0.000826745	PREDICTED: F-actin-capping protein subunit beta-like isoform X1 [Apis dorsata]
572259967	0.000178719	PREDICTED: regulating synaptic membrane exocytosis protein 1-like isoform X3 [Apis dorsata]
572304659	0.000885516	PREDICTED: ero1-like protein-like isoform X2 [Apis dorsata]
572258247	0.00037961	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: indole-3-acetaldehyde oxidase-like [Apis dorsata]
373195778	0.000294499	hypothetical protein ACCB00107.1 [Apis cerana]
571571820	0.00035426	PREDICTED: tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform X1 [Apis mellifera]
328785302	0.000184092	PREDICTED: microsomal triglyceride transfer protein large subunit isoform X2 [Apis mellifera]
571532679	0.000640459	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M [Apis mellifera]
380013711	0.012828305	PREDICTED: protein ROP isoform X1 [Apis florea]
328788272	0.006878163	PREDICTED: solute carrier family 12 member 7-like isoformX1 [Apis mellifera]
572314453	0.009339665	PREDICTED: synapse-associated protein of 47 kDa-like isoform X1 [Apis dorsata]
66512834	0.009481041	PREDICTED: uridine phosphorylase 2-like isoform X2 [Apis mellifera]
571506816	0.003345436	PREDICTED: delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase-like isoform X1 [Apis mellifera]
571546151	0.006237813	PREDICTED: UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase isoform X4 [Apis mellifera]
94400893	0.006225749	troponin T, skeletal muscle [Apis mellifera]
78101800	0.005765281	TPA_exp: troponin T isoform 4 [Apis mellifera]
571540760	0.001246812	PREDICTED: epidermal growth factor receptor pathway substrate clone 15 [Apis mellifera]

820846032	0.00185727	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1, partial [Apis florea]
66560290	0.004298176	PREDICTED: lysosomal aspartic protease [Apis mellifera]
572302488	0.000527026	PREDICTED: dmX-like protein 2-like isoform X1 [Apis dorsata]
572308633	0.002415365	PREDICTED: protein takeout-like [Apis dorsata]
571546907	0.002347177	PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform X3 [Apis mellifera]
66525576	0.005899153	PREDICTED: aldose reductase-like isoform 1 [Apis mellifera]
820865644	0.00052722	PREDICTED: fatty-acid amide hydrolase 2-B [Apis florea]
373210791	0.002981219	T-complex protein 1 subunit zeta [Apis cerana]
571566701	0.005012052	PREDICTED: protein N-terminal glutamine amidohydrolase [Apis mellifera]
328790731	0.006247513	PREDICTED: J domain-containing protein-like isoform 1 [Apis mellifera]
227262946	0.004705024	unnamed protein product [Apis mellifera]
571506184	0.002286447	PREDICTED: acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
571505774	0.00158882	PREDICTED: trehalose transporter 1 isoform X5 [Apis mellifera]
66509442	0.000694431	PREDICTED: dipeptidyl peptidase 3-like isoform 1 [Apis mellifera]
380029303	0.001126515	PREDICTED: U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2 [Apis florea]
820841788	0.006379641	PREDICTED: troponin C [Apis florea]
571579204	0.001620817	PREDICTED: catalase-like, partial [Apis mellifera]
820862618	0.002182963	PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like isoform X1 [Apis florea]
380029762	0.001447883	PREDICTED: dopamine N-acetyltransferase-like isoform X1 [Apis florea]
66525867	0.020097858	PREDICTED: phosphate carrier protein, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]
571554305	0.000893235	PREDICTED: four and a half LIM domains protein 2 isoform X2 [Apis mellifera]
328793120	0.000862516	PREDICTED: CAAX prenyl protease 1 homolog isoform X4 [Apis mellifera]
110756512	0.002804641	PREDICTED: very-long-chain enoyl-CoA reductase-like [Apis mellifera]
380022216	0.001258926	PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis florea]
399154148	0.003849819	cuticular protein 14 precursor [Apis mellifera]
572297495	0.000817752	PREDICTED: peptide methionine sulfoxide reductase-like isoform X1 [Apis dorsata]
237874274	0.001032919	calpain-B [Apis mellifera]
571575497	0.001668486	PREDICTED: ATPase family AAA domain-containing protein 3 isoform X1 [Apis mellifera]

820843327	0.000553221	PREDICTED: ATP-dependent RNA helicase p62-like isoform X1 [Apis florea]
571558981	0.000420504	PREDICTED: bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial isoform X1 [Apis mellifera]
571558323	0.001131651	PREDICTED: inositol polyphosphate 1-phosphatase-like isoform X1 [Apis mellifera]
820852760	0.001093097	PREDICTED: synaptobrevin-1 [Apis florea]
820853041	0.000419826	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]-like [Apis florea]
572312313	0.000836257	PREDICTED: lysophospholipase-like protein 1-like [Apis dorsata]
328788697	0.001292941	PREDICTED: muscle LIM protein Mlp84B-like isoformX1 [Apis mellifera]
328782499	0.000257152	PREDICTED: prosaposin isoformX1 [Apis mellifera]
572314770	0.00046154	PREDICTED: esterase FE4-like [Apis dorsata]
380022237	0.0012878	PREDICTED: short coiled-coil protein B [Apis florea]
572261532	0.001120611	PREDICTED: trehalase-like [Apis dorsata]
328790105	0.000468794	PREDICTED: lipase maturation factor 2-like isoform 1 [Apis mellifera]
820849501	0.002201307	PREDICTED: UMP-CMP kinase isoform X2 [Apis florea]
820860854	0.001308127	PREDICTED: coatomer subunit zeta-1 isoform X2 [Apis florea]
408717391	0.001503363	glutaredoxin 2 [Apis cerana cerana]
572311765	0.002326014	PREDICTED: pigment-dispersing hormone peptides-like [Apis dorsata]
380030337	0.000155368	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tRNA-splicing ligase RtcB homolog [Apis florea]
373214113	0.001316634	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase [Apis cerana]
571576066	0.000334089	PREDICTED: suppressor of variegation 3-9 isoform X1 [Apis mellifera]
572309050	0.001597294	PREDICTED: ATP synthase subunit e, mitochondrial-like [Apis dorsata]
572264643	0.000934351	PREDICTED: malectin-like [Apis dorsata]
110750077	0.000376314	PREDICTED: spermine synthase-like isoformX1 [Apis mellifera]
572260716	0.000832405	PREDICTED: CUE domain-containing protein 1-like [Apis dorsata]
572317980	0.00028387	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102672636 isoform X4 [Apis dorsata]
820842992	0.000161235	PREDICTED: dynactin subunit 1 isoform X1 [Apis florea]
328792207	8.68E-05	PREDICTED: diacylglycerol kinase 1 isoform X4 [Apis mellifera]
33521676	0.001603525	vacuolar H ⁺ ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit [Apis mellifera]
572316328	0.000492143	PREDICTED: importin subunit alpha-7-like [Apis dorsata]

820858718	6.64E-05	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC100865996, partial [Apis florea]
820859477	0.000136098	PREDICTED: importin-7 [Apis florea]
66556835	0.000919763	PREDICTED: toll-interacting protein [Apis mellifera]
110760326	0.000620978	PREDICTED: PDZ and LIM domain protein 3 isoform X1 [Apis mellifera]
628819963	0.000615175	cytochrome b (mitochondrion) [Apis mellifera mellifera]
571505987	0.000197248	PREDICTED: protein diaphanous isoform X2 [Apis mellifera]
820842651	8.50E-05	PREDICTED: nuclear pore complex protein Nup205 [Apis florea]
572306348	0.001372489	PREDICTED: carbonic anhydrase 6-like [Apis dorsata]
110757696	0.00153326	PREDICTED: estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-like [Apis mellifera]
373206173	0.00247184	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal [Apis cerana]
572310422	0.000491748	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: protein phosphatase 1 regulatory subunit 7-like [Apis dorsata]
571563982	8.78E-05	PREDICTED: glycogen debranching enzyme-like isoform X1 [Apis mellifera]
373214152	0.000716351	Transmembrane 9 superfamily member 4 [Apis cerana]
572309850	0.001300536	PREDICTED: D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis dorsata]
380029686	0.000447233	PREDICTED: nicotinate phosphoribosyltransferase isoform X2 [Apis florea]
572259054	0.000847237	PREDICTED: trafficking protein particle complex subunit 4-like [Apis dorsata]
572300721	0.004175907	PREDICTED: troponin C, isoform 1-like [Apis dorsata]
572259943	7.34E-05	PREDICTED: putative U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase-like [Apis dorsata]
572266680	0.001208166	PREDICTED: S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase-like [Apis dorsata]
328779540	0.000265269	PREDICTED: probable 4-coumarate--CoA ligase 3-like isoform X1 [Apis mellifera]
571526744	0.000171856	PREDICTED: ribosome-binding protein 1 [Apis mellifera]
380023386	0.001277372	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-1 [Apis florea]
380028615	0.004522619	PREDICTED: histone H2B-like [Apis florea]
66499530	0.002705455	PREDICTED: uncharacterized protein LOC551318 [Apis mellifera]
571545068	0.000365983	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C [Apis mellifera]
571538775	0.005900684	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch-like [Apis mellifera]
572308625	0.00362424	PREDICTED: microtubule-associated protein futsch-like [Apis dorsata]
328786330	0.004611509	PREDICTED: saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase-like isoform 1 [Apis mellifera]

380011256	0.00222563	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1-like [Apis florea]
571509351	0.003584612	PREDICTED: GABA neurotransmitter transporter-1A isoform X3 [Apis mellifera]
571578061	0.001804364	PREDICTED: intersectin-1 [Apis mellifera]
820864075	0.001422697	PREDICTED: intersectin-2 isoform X1 [Apis florea]
373199482	0.005867062	Photoreceptor dehydrogenase [Apis cerana]
571510554	0.002779059	PREDICTED: polyubiquitin-A-like [Apis mellifera]
571550616	0.001080008	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: protein still life, isoform SIF type 1-like [Apis mellifera]
48097314	0.003031215	PREDICTED: acetylcholinesterase isoform X2 [Apis mellifera]
66526470	0.003945841	PREDICTED: electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]
571573648	0.000682567	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: vinculin [Apis mellifera]
328785112	0.003798075	PREDICTED: proteasome subunit beta type-4-like [Apis mellifera]
380012034	0.001050261	PREDICTED: mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha-A [Apis florea]
66524764	0.000611191	PREDICTED: proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein-like [Apis mellifera]
572270787	0.00022549	PREDICTED: importin-11-like isoform X1 [Apis dorsata]
571574768	0.000162937	PREDICTED: multidrug resistance-associated protein 4-like [Apis mellifera]
571564565	0.002513419	PREDICTED: putative cystathionine gamma-lyase 2-like isoform X1 [Apis mellifera]
58585106	0.008840917	chemosensory protein 3 precursor [Apis mellifera]
571558447	0.001246138	PREDICTED: 60S ribosomal protein L32 isoform X2 [Apis mellifera]
328792580	0.003385919	PREDICTED: uncharacterized protein LOC725712 isoformX2 [Apis mellifera]
572263893	0.000239353	PREDICTED: beta-arrestin-1-like isoform X5 [Apis dorsata]
328786207	0.001069638	PREDICTED: mitochondrial pyruvate carrier 2-like [Apis mellifera]
820848507	0.001723206	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100871146 [Apis florea]
380021811	0.002948951	PREDICTED: 60S ribosomal protein L34 [Apis florea]
820855757	0.00065198	PREDICTED: ABC transporter G family member 20 isoform X2 [Apis florea]
328791588	0.003715795	PREDICTED: uncharacterized protein LOC724761 [Apis mellifera]
572307541	0.000182055	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: transmembrane GTPase Marf-like [Apis dorsata]
572300887	0.000206311	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: exocyst complex component 5-like [Apis dorsata]
572260581	0.001852211	PREDICTED: GTP-binding protein Di-Ras2-like [Apis dorsata]

166795901	0.002894735	apolipophorin-III-like protein precursor [Apis mellifera]
571571176	0.000170342	PREDICTED: probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial-like [Apis mellifera]
66564768	0.001765427	PREDICTED: autophagy 1 [Apis mellifera]
820853577	0.000366132	PREDICTED: lachesin isoform X2 [Apis florea]
571543905	0.005938988	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: apolipophorins [Apis mellifera]
328792071	0.009634992	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit H isoformX1 [Apis mellifera]
571529476	0.001365203	PREDICTED: neurofilament heavy polypeptide-like isoform X2 [Apis mellifera]
571530387	0.002714457	PREDICTED: alcohol dehydrogenase [NADP(+)]-like isoform X2 [Apis mellifera]
110763426	0.000875377	PREDICTED: coatomer subunit beta [Apis mellifera]
328780480	0.010231955	PREDICTED: 97 kDa heat shock protein isoformX1 [Apis mellifera]
328777202	0.004721353	PREDICTED: sex-regulated protein janus-A-like [Apis mellifera]
66507594	0.006023752	PREDICTED: trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial-like [Apis mellifera]
571577728	0.008745883	PREDICTED: probable pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
571532377	0.016007105	PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial [Apis mellifera]
571531698	0.006420198	PREDICTED: synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like [Apis mellifera]
572307760	0.005641068	PREDICTED: long-chain fatty acid transport protein 4-like isoform X1 [Apis dorsata]
571570402	0.002712632	PREDICTED: uncharacterized protein LOC725621 [Apis mellifera]
572297371	0.009893143	PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2-like [Apis dorsata]
571548000	0.001296839	PREDICTED: bruchpilot isoform X1 [Apis mellifera]
820842093	0.006915809	PREDICTED: elongation factor 1-gamma [Apis florea]
328787101	0.007158708	PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic isoform 2 [Apis mellifera]
328776272	0.00634278	PREDICTED: sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial-like isoform X1 [Apis mellifera]
571549122	0.003848432	PREDICTED: very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis mellifera]
380028257	0.006721391	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit delta [Apis florea]
48097876	0.005977681	PREDICTED: AP-2 complex subunit mu isoform 1 [Apis mellifera]
571527094	0.004800743	PREDICTED: uncharacterized protein LOC409781 isoform X1 [Apis mellifera]
572271387	0.002873749	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102673852 [Apis dorsata]
328781995	0.008249486	PREDICTED: probable trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial-like [Apis mellifera]

380017670	0.025112252	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P1 [Apis florea]
571575892	0.003811661	PREDICTED: retinal dehydrogenase 1-like isoform X2 [Apis mellifera]
571529264	0.000800121	PREDICTED: NACHT and WD repeat domain-containing protein 1-like isoform X2 [Apis mellifera]
820858159	0.000632066	PREDICTED: NACHT domain- and WD repeat-containing protein 1 [Apis florea]
572302737	0.014091496	PREDICTED: enolase-like [Apis dorsata]
373213447	0.012436207	Enolase [Apis cerana]
820853072	0.004609734	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: enolase-like [Apis florea]
33089104	0.023929406	CuZn superoxide dismutase [Apis mellifera ligustica]
571562115	0.010115328	PREDICTED: dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial-like, partial [Apis mellifera]
373201065	0.003906093	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex [Apis cerana]
66500205	0.007113673	PREDICTED: mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like [Apis mellifera]
66535742	0.004589788	PREDICTED: cytosolic non-specific dipeptidase-like isoform 1 [Apis mellifera]
571525250	0.004593707	PREDICTED: stress-induced-phosphoprotein 1-like [Apis mellifera]
110756571	0.009174921	PREDICTED: 40S ribosomal protein S16 [Apis mellifera]
380028391	0.011524926	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like [Apis florea]
295422209	0.00983621	unnamed protein product [Apis mellifera]
572261761	0.003686327	PREDICTED: succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial-like isoform X1 [Apis dorsata]
820856395	0.003680611	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC100865122 [Apis florea]
328790339	0.003420098	PREDICTED: actin-interacting protein 1 isoform X2 [Apis mellifera]
571550590	0.002533029	PREDICTED: glutaminase kidney isoform, mitochondrial isoformX1 [Apis mellifera]
328788384	0.004954052	PREDICTED: dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
48141571	0.008278904	PREDICTED: phosphoglycolate phosphatase-like [Apis mellifera]
328782037	0.010242665	PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit 7-like [Apis mellifera]
572303114	0.007814322	PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial-like [Apis dorsata]
820838627	0.00084685	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: unconventional myosin-Va [Apis florea]
66505792	0.003104453	PREDICTED: abhydrolase domain-containing protein 3 isoformX2 [Apis mellifera]

373211958	0.002844529	Abhydrolase domain-containing protein 3 [Apis cerana]
572266906	0.002214037	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B-like [Apis dorsata]
820851381	0.00468696	PREDICTED: dnaJ homolog subfamily A member 1 [Apis florea]
66534614	0.007582091	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial [Apis mellifera]
66530284	0.001565598	PREDICTED: programmed cell death 6-interacting protein isoform X2 [Apis mellifera]
328784654	0.001429572	PREDICTED: cyclin-G-associated kinase-like [Apis mellifera]
571578042	0.019392542	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2-like [Apis mellifera]
190360039	0.005158237	RecName: Full=Prohormone-4
110756296	0.007366701	PREDICTED: protein FAM151A-like isoform X1 [Apis mellifera]
380016161	0.005005133	PREDICTED: upstream activation factor subunit spp27 [Apis florea]
66566109	0.007909357	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10-like [Apis mellifera]
48107260	0.013802708	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9-like [Apis mellifera]
380013863	0.015143232	PREDICTED: neurocalcin homolog [Apis florea]
380028013	0.005604655	PREDICTED: ATP-dependent RNA helicase WM6 [Apis florea]
572259171	0.00626865	PREDICTED: translationally-controlled tumor protein homolog [Apis dorsata]
380023257	0.006711073	PREDICTED: cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase, mitochondrial-like [Apis florea]
820853951	0.010062377	PREDICTED: 40S ribosomal protein S2 [Apis florea]
380025542	0.002116272	PREDICTED: serine--tRNA ligase, cytoplasmic [Apis florea]
571513398	0.001460084	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like [Apis mellifera]
380029179	0.005490789	PREDICTED: N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 isoform X1 [Apis florea]
295849286	0.00901166	superoxide dismutase 2, mitochondrial [Apis mellifera]
571528252	0.008571188	PREDICTED: ras-related protein Rab-1A-like [Apis mellifera]
335892843	0.003035459	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 [Apis mellifera]
571565639	0.002145545	PREDICTED: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating [Apis mellifera]
380027749	0.00370462	PREDICTED: BAG family molecular chaperone regulator 2 [Apis florea]
820840944	0.001715175	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: threonine--tRNA ligase, cytoplasmic-like [Apis florea]
572266987	0.002526115	PREDICTED: 26S protease regulatory subunit 6A-like [Apis dorsata]
571576468	0.001062835	PREDICTED: uncharacterized protein C05D11.1-like isoform X2 [Apis mellifera]
380020375	0.006259681	PREDICTED: 60S ribosomal protein L31 [Apis florea]

380013972	0.002729798	PREDICTED: toll-like receptor 4 [Apis florea]
572263565	0.008244188	PREDICTED: 40S ribosomal protein S19a-like [Apis dorsata]
572300065	0.004651299	PREDICTED: probable NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12-like [Apis dorsata]
328792687	0.014716214	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12-like [Apis mellifera]
820837885	0.005521826	PREDICTED: 40S ribosomal protein S6 [Apis florea]
820859040	0.00463438	PREDICTED: CD151 antigen-like isoform X1 [Apis florea]
380014771	0.008280485	PREDICTED: 60S ribosomal protein L18 [Apis florea]
66499429	0.001953215	PREDICTED: probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis mellifera]
572299486	0.004939538	PREDICTED: heat shock protein beta-1-like isoform X1 [Apis dorsata]
571562296	0.003236626	PREDICTED: ras-related protein Ral-a-like isoform X1 [Apis mellifera]
380015101	0.00152719	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 [Apis florea]
572302099	0.003776811	PREDICTED: 60S ribosomal protein L4-like [Apis dorsata]
66535270	0.002063274	PREDICTED: succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial-like [Apis mellifera]
571544763	0.009683536	PREDICTED: putative acyl-CoA-binding protein-like [Apis mellifera]
572299164	0.00147919	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102679329 [Apis dorsata]
66551478	0.001950143	PREDICTED: coatomer subunit delta isoform 2 [Apis mellifera]
571575116	0.00201577	PREDICTED: 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial-like isoform X1 [Apis mellifera]
820837558	0.001648183	PREDICTED: digestive cysteine proteinase 1 [Apis florea]
571549174	0.001459679	PREDICTED: transmembrane protein 214-A-like [Apis mellifera]
380013705	0.002590789	PREDICTED: leucine-rich repeat-containing protein 57 [Apis florea]
380020450	0.00111441	PREDICTED: ruvB-like 1 [Apis florea]
571546600	0.001581961	PREDICTED: luciferin 4-monooxygenase-like isoform X1 [Apis mellifera]
572315320	0.00295311	PREDICTED: ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6-like [Apis dorsata]
380011078	0.001650002	PREDICTED: leucine-rich repeat protein soc-2 homolog [Apis florea]
380027464	0.00045833	PREDICTED: dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 isoform X1 [Apis florea]
571553455	0.000328463	PREDICTED: tripeptidyl-peptidase 2 [Apis mellifera]
299890788	0.005718896	cytochrome b-c1 complex subunit 10 [Apis mellifera]
380019194	0.00103008	PREDICTED: cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 [Apis florea]

572305236	0.009999386	PREDICTED: 40S ribosomal protein S20-like [Apis dorsata]
571525079	0.001403871	PREDICTED: protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase-like isoform X5 [Apis mellifera]
408717377	0.004783262	thioredoxin 1 [Apis cerana cerana]
110755333	0.008218257	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial [Apis mellifera]
66513180	0.006113969	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6-like [Apis mellifera]
572316037	0.007264429	PREDICTED: pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase-like [Apis dorsata]
48138568	0.004823489	PREDICTED: ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2-like isoform 1 [Apis mellifera]
380024592	0.005274462	PREDICTED: myophilin [Apis florea]
572307553	0.003538428	PREDICTED: actin-related protein 2/3 complex subunit 4-like [Apis dorsata]
820852494	0.004226893	PREDICTED: myophilin [Apis florea]
110750764	0.002704996	PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis mellifera]
820862549	0.002810502	PREDICTED: 60S ribosomal protein L18a [Apis florea]
373207985	0.002514766	60S ribosomal protein L19 [Apis cerana]
572264329	0.006787495	PREDICTED: muscle-specific protein 20-like [Apis dorsata]
373211781	0.001948265	Protein FAM54A (DUF729 domain containing protein 1) [Apis cerana]
820838063	0.002982936	PREDICTED: 60S ribosomal protein L6 [Apis florea]
328781481	0.001671502	PREDICTED: alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11-like isoform X2 [Apis mellifera]
380012028	0.003063827	PREDICTED: 60S ribosomal protein L3 [Apis florea]
571514744	0.003722689	PREDICTED: protein windbeutel-like [Apis mellifera]
820855126	0.001499407	PREDICTED: ras-related protein Rab-18-B [Apis florea]
380030510	0.011656525	PREDICTED: up-regulated during skeletal muscle growth protein 5-like [Apis florea]
572305810	0.001147798	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-3-like [Apis dorsata]
380018763	0.001836544	PREDICTED: stomatin-like protein 2, mitochondrial [Apis florea]
66542933	0.002516479	PREDICTED: 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase delta-like [Apis mellifera]
820859569	0.003301137	PREDICTED: thioredoxin-related transmembrane protein 1-like [Apis florea]
572266845	0.00134587	PREDICTED: protein canopy homolog 3-like [Apis dorsata]
380024522	0.004483696	PREDICTED: transmembrane emp24 domain-containing protein eca [Apis florea]
66526174	0.001023513	PREDICTED: aromatic-L-amino-acid decarboxylase [Apis mellifera]
328793508	0.000960134	PREDICTED: protein tumorous imaginal discs, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]

380020399	0.002372738	PREDICTED: protein SCO2 homolog, mitochondrial [Apis florea]
572298972	0.001433707	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13-like [Apis dorsata]
48124643	0.001991153	PREDICTED: alcohol dehydrogenase class-3 isoform X2 [Apis mellifera]
373213037	0.001138329	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha [Apis cerana]
820861829	0.001476227	PREDICTED: glycosylated lysosomal membrane protein A-like, partial [Apis florea]
571514405	0.00034354	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6-like [Apis mellifera]
380015815	0.000233337	PREDICTED: splicing factor 3B subunit 3 [Apis florea]
571566593	0.001207313	PREDICTED: putative gamma-glutamylcyclotransferase CG2811-like isoform X3 [Apis mellifera]
571530735	0.001590053	PREDICTED: fatty-acid amide hydrolase 2-like [Apis mellifera]
571560348	0.001768128	PREDICTED: FAS-associated factor 2 [Apis mellifera]
572313631	0.001044671	PREDICTED: nucleobindin-2-like isoform X1 [Apis dorsata]
572261388	0.000442076	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: protein transport protein Sec24C-like [Apis dorsata]
328782218	0.000275141	PREDICTED: mitochondrial import receptor subunit TOM70 [Apis mellifera]
572309287	0.000353318	PREDICTED: UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase-like isoform X1 [Apis dorsata]
66550870	0.000717176	PREDICTED: cytoplasmic aconitate hydratase-like isoform 1 [Apis mellifera]
571516237	0.000158876	PREDICTED: SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3-like [Apis mellifera]
572266849	0.007428604	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-e-like [Apis dorsata]
110751008	0.011256644	PREDICTED: cytochrome b-c1 complex subunit 8-like [Apis mellifera]
380013829	0.002440868	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 29 [Apis florea]
328792666	0.001539736	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K-like [Apis mellifera]
380018992	0.000587161	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: geranylgeranyl transferase type-2 subunit beta [Apis florea]
380011054	0.004938601	PREDICTED: dynein light chain roadblock-type 2 [Apis florea]
110765226	0.005190465	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2 [Apis mellifera]
572299231	0.005557393	PREDICTED: 40S ribosomal protein S27-like [Apis dorsata]
820843196	0.000244803	PREDICTED: phosphatidylinositol 4-kinase alpha isoform X1 [Apis florea]
571569180	0.002799418	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13-like [Apis mellifera]
380019134	0.001757383	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1 [Apis florea]
572257744	0.000672298	PREDICTED: d-3-phosphoglycerate dehydrogenase-like isoform X1 [Apis dorsata]

380013279	0.001468151	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100863203 isoform X1 [Apis florea]
66558956	0.006262257	PREDICTED: 60S ribosomal protein L23 [Apis mellifera]
820839048	0.000653706	PREDICTED: probable aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 isoform X1 [Apis florea]
240255421	0.005634918	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5 [Apis mellifera]
328789359	0.000556214	PREDICTED: alkaline phosphatase 4-like isoform X3 [Apis mellifera]
572303510	0.001567979	PREDICTED: derlin-1-like [Apis dorsata]
572303947	0.000165416	PREDICTED: 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component-like [Apis dorsata]
572310399	0.001150688	PREDICTED: NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial-like [Apis dorsata]
48094957	0.003441999	PREDICTED: microsomal glutathione S-transferase 1 isoform 1 [Apis mellifera]
572262101	0.00026527	PREDICTED: mannosyl-oligosaccharide glucosidase GCS1-like [Apis dorsata]
572312548	0.000329512	PREDICTED: dnaJ homolog subfamily B member 11-like [Apis dorsata]
820861878	9.05E-05	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC100870882 [Apis florea]
380026023	0.000219254	PREDICTED: neuroendocrine convertase 2 [Apis florea]
328779160	0.000780445	PREDICTED: myb-like protein X-like [Apis mellifera]
380011753	0.000968606	PREDICTED: peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase [Apis florea]
571552435	0.002552832	PREDICTED: tropinone reductase 2-like [Apis mellifera]
572265745	0.000406808	PREDICTED: cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 homolog [Apis dorsata]
66509537	0.000449125	PREDICTED: haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2-like [Apis mellifera]
571507816	0.000534056	PREDICTED: elongation factor G, mitochondrial-like [Apis mellifera]
48141273	0.00075739	PREDICTED: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 1 isoform X2 [Apis mellifera]
572272123	0.000745813	PREDICTED: excitatory amino acid transporter 3-like [Apis dorsata]
572314710	0.000189028	PREDICTED: sulfhydryl oxidase 1-like [Apis dorsata]
373210069	0.001280107	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform [Apis cerana]
380021861	0.000341475	PREDICTED: PTB domain-containing engulfment adapter protein 1-like [Apis florea]
571576863	0.001175119	PREDICTED: dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2-like [Apis mellifera]
373214380	0.003253755	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor [Apis cerana]
380018971	0.000247533	PREDICTED: tubulin-specific chaperone D [Apis florea]

380025693	0.000621001	PREDICTED: nucleolysin TIAR [Apis florea]
571526405	0.001886043	PREDICTED: ribonuclease Oy [Apis mellifera]
571555369	0.000700507	PREDICTED: ABC transporter F family member 4-like isoform X2 [Apis mellifera]
572259375	0.0002158	PREDICTED: protoporphyrinogen oxidase-like [Apis dorsata]
380027731	0.001276009	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: UV excision repair protein RAD23 homolog B [Apis florea]
328793593	0.000767526	PREDICTED: translocon-associated protein subunit alpha-like [Apis mellifera]
571519001	0.000232858	PREDICTED: protein transport protein Sec31A [Apis mellifera]
380013249	0.001120553	PREDICTED: putative ATP-dependent RNA helicase me31b [Apis florea]
820845142	0.00046952	PREDICTED: 5'-nucleotidase domain-containing protein 3 isoform X1 [Apis florea]
572298421	0.000736803	PREDICTED: ADP-ribosylation factor-like protein 2-like [Apis dorsata]
227295081	0.002667337	unnamed protein product [Apis mellifera]
190360037	0.000940105	RecName: Full=Prohormone-2
572312506	0.000217935	PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 30-like isoform X1 [Apis dorsata]
373215778	0.002778932	Single-stranded DNA-binding protein [Apis cerana]
571555259	0.001744982	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102656594 [Apis mellifera]
572307324	9.77E-05	PREDICTED: ubiquitin conjugation factor E4 B-like isoform X1 [Apis dorsata]
820849383	0.000369308	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cleavage and polyadenylation specificity factor subunit CG7185-like [Apis florea]
48104021	0.001736729	PREDICTED: signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A [Apis mellifera]
380022453	0.000940883	PREDICTED: obg-like ATPase 1 [Apis florea]
311818750	0.012628986	unnamed protein product [Apis mellifera]
380012993	0.009041536	PREDICTED: proline dehydrogenase 1, mitochondrial [Apis florea]
571539011	0.007750781	PREDICTED: aminopeptidase N-like isoform X1 [Apis mellifera]
572267593	0.067842505	PREDICTED: tubulin beta-1 chain-like [Apis dorsata]
380021994	0.020172329	PREDICTED: tubulin beta chain-like [Apis florea]
820853405	0.035877279	PREDICTED: tubulin alpha-1 chain [Apis florea]
571577612	0.013978707	PREDICTED: vesicle-fusing ATPase 1-like [Apis mellifera]
380019699	0.009145434	PREDICTED: vesicle-fusing ATPase 1-like [Apis florea]
66513092	0.029647265	PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]

373213601	0.027861743	Malate dehydrogenase [Apis cerana]
571559139	0.00999661	PREDICTED: delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X1 [Apis mellifera]
373215165	0.00735985	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [Apis cerana]
66503776	0.007397677	PREDICTED: transketolase isoform 2 [Apis mellifera]
227483339	0.008555957	unnamed protein product [Apis mellifera]
283436154	0.023196166	glutamine synthetase [Apis mellifera]
571563084	0.003328711	PREDICTED: uncharacterized protein LOC413428 [Apis mellifera]
66517414	0.011795336	PREDICTED: arrestin homolog isoform 2 [Apis mellifera]
380027220	0.009862201	PREDICTED: arrestin homolog [Apis florea]
572300358	0.015396885	PREDICTED: failed axon connections-like [Apis dorsata]
380030413	0.012884166	PREDICTED: failed axon connections [Apis florea]
571520556	0.005908301	PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial isoform X2 [Apis mellifera]
571545713	0.009035061	PREDICTED: chitinase-like protein Idgf4-like isoform X1 [Apis mellifera]
328789667	0.008279912	PREDICTED: cytochrome P450 9e2 [Apis mellifera]
66513481	0.004228698	PREDICTED: ubiquitin activating enzyme 1 isoform 1 [Apis mellifera]
328784984	0.005525293	PREDICTED: neutral and basic amino acid transport protein rBAT isoformX2 [Apis mellifera]
335892820	0.009916808	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial [Apis mellifera]
66561330	0.00769835	PREDICTED: phosphoglucomutase isoform X3 [Apis mellifera]
46847760	0.007510697	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory chain [Apis mellifera carnica]
571547729	0.00669441	PREDICTED: fasciclin-1-like isoform X2 [Apis mellifera]
571552393	0.000853093	PREDICTED: polyadenylate-binding protein 1-like isoform X1 [Apis mellifera]
328785850	0.00111933	PREDICTED: protein VAC14 homolog [Apis mellifera]
571504623	0.002423676	PREDICTED: neuroligin [Apis mellifera]
66550828	0.0072325	PREDICTED: NECAP-like protein CG9132-like isoform X2 [Apis mellifera]
571500813	0.00435354	PREDICTED: 40S ribosomal protein S17 [Apis mellifera]
572318801	0.000703839	PREDICTED: synaptogyrin-1-like [Apis dorsata]
328778152	0.000412791	PREDICTED: plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein-like isoform X2 [Apis mellifera]

373197248	0.000444131	hypothetical protein ACCB00296.3 [Apis cerana]
572300085	0.000695979	PREDICTED: cyclin-dependent kinase 10-like [Apis dorsata]
820862181	0.000191554	PREDICTED: membralin-like isoform X1 [Apis florea]
571525997	0.000787906	PREDICTED: protein croquemort isoform X2 [Apis mellifera]
571577147	0.003437592	PREDICTED: 60S ribosomal protein L10 isoform X3 [Apis mellifera]
571566248	6.14E-05	PREDICTED: CAD protein isoform 1 [Apis mellifera]
571573940	0.000627075	PREDICTED: interleukin enhancer-binding factor 2 homolog isoform X1 [Apis mellifera]
820837834	0.000420261	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 [Apis florea]
572258006	0.001938677	PREDICTED: 60S ribosomal protein L35-like isoform X2 [Apis dorsata]
571562354	0.0015932	PREDICTED: minor histocompatibility antigen H13-like [Apis mellifera]
820863950	0.000594488	PREDICTED: FK506-binding protein 2 isoform X1 [Apis florea]
110769776	0.001652215	PREDICTED: dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1-like [Apis mellifera]
572258187	0.004192475	PREDICTED: plasma membrane calcium-transporting ATPase 3-like isoform X7 [Apis dorsata]
48098073	0.003354263	PREDICTED: cytochrome P450 9e2 [Apis mellifera]
380029238	0.000315349	PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 [Apis florea]
66511337	0.000159661	PREDICTED: heat shock protein 75 kDa, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]
328788218	0.00407305	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3-like isoform 1 [Apis mellifera]
572301290	0.000261543	PREDICTED: ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial-like [Apis dorsata]
571573744	0.02028575	PREDICTED: probable aspartate aminotransferase, cytoplasmic-like [Apis mellifera]
380024335	0.013936426	PREDICTED: probable aspartate aminotransferase, cytoplasmic [Apis florea]
66523390	0.013451843	PREDICTED: glutamate dehydrogenase, mitochondrial isoformX1 [Apis mellifera]
571556395	0.008575915	PREDICTED: protein disulfide-isomerase [Apis mellifera]
328782596	0.016414059	PREDICTED: succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial [Apis mellifera]
66526646	0.009365144	PREDICTED: dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]
572298207	0.009702622	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: dihydropyrimidinase-like [Apis dorsata]
571525983	0.006098835	PREDICTED: protein turtle isoform X3 [Apis mellifera]

380013442	0.012414519	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: flotillin-2 [Apis florea]
571575401	0.010488567	PREDICTED: phosphoglycerate kinase isoform 1 [Apis mellifera]
110750754	0.028682525	PREDICTED: protein lethal(2)essential for life-like [Apis mellifera]
66519936	0.004569377	PREDICTED: trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial-like [Apis mellifera]
572272541	0.003074031	PREDICTED: trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial-like [Apis dorsata]
373215561	0.003471439	Trifunctional enzyme subunit alpha [Apis cerana]
571527273	0.011102326	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit C isoform X2 [Apis mellifera]
572302500	0.008179435	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: sorbitol dehydrogenase-like [Apis dorsata]
373212692	0.009178383	Rab GDP dissociation inhibitor beta [Apis cerana]
373212348	0.016671175	Nucleoside diphosphate kinase [Apis cerana]
58585090	0.006619805	glucose oxidase [Apis mellifera]
571511433	0.016642372	PREDICTED: ATP synthase subunit b, mitochondrial-like [Apis mellifera]
328778689	0.012321878	PREDICTED: probable enoyl-CoA hydratase, mitochondrial [Apis mellifera]
328775921	0.006894966	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]
328786450	0.023262133	PREDICTED: ATP synthase subunit delta, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]
572305491	0.003995206	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit eta-like [Apis dorsata]
373213977	0.009832245	ATP synthase subunit O [Apis cerana]
380026164	0.010785808	PREDICTED: 40S ribosomal protein S3 [Apis florea]
328784835	0.00364901	PREDICTED: dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit-like isoform 1 [Apis mellifera]
66506786	0.008701801	PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic-like isoform 1 [Apis mellifera]
380025946	0.008353367	PREDICTED: complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial [Apis florea]
571574521	0.00385009	PREDICTED: arrestin homolog isoform X2 [Apis mellifera]
571547498	0.00290485	PREDICTED: glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic-like isoform X1 [Apis mellifera]
820854399	0.009792529	PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein KCTD16 [Apis florea]
380026705	0.004733814	PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial [Apis florea]
820857481	0.003774647	PREDICTED: serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform [Apis florea]

571536514	0.019067647	PREDICTED: ATP synthase subunit g, mitochondrial-like [Apis mellifera]
48138741	0.015120939	PREDICTED: putative ATP synthase subunit f, mitochondrial-like [Apis mellifera]
380015000	0.00348433	PREDICTED: thioredoxin domain-containing protein [Apis florea]
571556448	0.000692549	PREDICTED: paraplegin-like [Apis mellifera]
66524760	0.003992496	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial isoform 2 [Apis mellifera]
571577978	0.001111106	PREDICTED: presequence protease, mitochondrial [Apis mellifera]
571550277	0.000809132	PREDICTED: sortilin-related receptor [Apis mellifera]
380016757	0.003945935	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 5 [Apis florea]
380028992	0.001204593	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L [Apis florea]
328788967	0.00436926	PREDICTED: enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial-like [Apis mellifera]
328781096	0.002128331	PREDICTED: juvenile hormone epoxide hydrolase 1 [Apis mellifera]
328776992	0.004266826	PREDICTED: sideroflexin-2-like [Apis mellifera]
572318327	0.002733891	PREDICTED: sideroflexin-2-like [Apis dorsata]
820856987	0.003929404	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-7 [Apis florea]
571559515	0.001095619	PREDICTED: elongation factor Ts, mitochondrial-like [Apis mellifera]
380027338	0.000633072	PREDICTED: sodium-coupled monocarboxylate transporter 1-like [Apis florea]
572261587	0.001460701	PREDICTED: ragulator complex protein LAMTOR5 homolog [Apis dorsata]
380019469	0.002237221	PREDICTED: actin-related protein 3 [Apis florea]
380019388	0.000898035	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A [Apis florea]
820863896	0.000105046	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nucleoprotein TPR [Apis florea]
66511756	0.000932908	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial-like [Apis mellifera]
820855454	0.005394937	PREDICTED: ATPase inhibitor mai-2, mitochondrial-like [Apis florea]
328782520	0.004004209	PREDICTED: protein QIL1-like isoform 2 [Apis mellifera]
571579376	0.000524108	PREDICTED: aldo-keto reductase yakc [NADP(+)]-like [Apis mellifera]
571522669	0.008685733	PREDICTED: 40S ribosomal protein S28-like [Apis mellifera]
571573277	0.003400135	PREDICTED: CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 homolog isoform X1 [Apis mellifera]
110760120	0.000707676	PREDICTED: ATP synthase subunit s, mitochondrial-like [Apis mellifera]

571566632	0.001106919	PREDICTED: histidine triad nucleotide-binding protein 1-like [Apis mellifera]
328783450	0.000881829	PREDICTED: short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like [Apis mellifera]
572270328	0.000652935	PREDICTED: chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2-like [Apis dorsata]
328785731	0.000925455	PREDICTED: serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial-like [Apis mellifera]
328783193	0.000443916	PREDICTED: dehydrogenase/reductase SDR family member 11-like isoform X1 [Apis mellifera]
572267910	0.004185427	PREDICTED: 60S ribosomal protein L36-like isoform X2 [Apis dorsata]
820852862	0.000524286	PREDICTED: glycerylpeptide N-tetradecanoyltransferase [Apis florea]
571550032	8.00E-05	PREDICTED: lysosomal alpha-glucosidase-like [Apis mellifera]
328788537	0.000922238	PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5-like [Apis mellifera]
820857527	0.00016022	PREDICTED: probable helicase with zinc finger domain [Apis florea]
572310316	0.001718164	PREDICTED: dephospho-CoA kinase domain-containing protein-like [Apis dorsata]
571524301	0.017887766	PREDICTED: pyruvate kinase-like isoform X1 [Apis mellifera]
66560172	0.005862079	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit alpha-like isoform 1 [Apis mellifera]
110758517	0.001068766	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7-like [Apis mellifera]
571525107	0.002010529	PREDICTED: protein bcn92-like [Apis mellifera]
145386569	0.004887868	apidermin 2 precursor [Apis mellifera]
328792640	0.000566504	PREDICTED: uncharacterized protein LOC408641 isoformX1 [Apis mellifera]
820850353	0.000414961	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC100872058 [Apis florea]
66516093	0.001443881	PREDICTED: alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2-like [Apis mellifera]
328787116	0.001178822	PREDICTED: mannose-1-phosphate guanyltransferase beta-like [Apis mellifera]
48097100	0.006437385	PREDICTED: 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial-like isoform X2 [Apis mellifera]
110749420	0.002985628	PREDICTED: AFG3-like protein 2-like [Apis mellifera]
328779619	0.005286651	PREDICTED: glutamate decarboxylase-like isoformX1 [Apis mellifera]
571572991	0.029762582	PREDICTED: ATP synthase subunit d, mitochondrial [Apis mellifera]
66504662	0.000806183	PREDICTED: coatomer subunit alpha isoform 1 [Apis mellifera]
328791498	0.003157294	PREDICTED: dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial-like [Apis mellifera]
328784314	0.003279001	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: adipocyte plasma membrane-associated protein [Apis mellifera]
571571489	0.00771999	PREDICTED: protein DJ-1-like [Apis mellifera]

380025784	0.000972502	PREDICTED: arylsulfatase B-like [Apis florea]
110773269	0.005012849	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial-like [Apis mellifera]
572308981	0.0082791	PREDICTED: acyl carrier protein, mitochondrial-like [Apis dorsata]
48120572	0.014584267	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 [Apis mellifera]
110749017	0.006149421	PREDICTED: dehydrogenase/reductase SDR family member 11-like [Apis mellifera]
145386509	0.001330824	apidermin 3 precursor [Apis mellifera]
66547891	0.003957726	PREDICTED: actin-like protein 87C-like [Apis mellifera]
380024841	0.001240829	PREDICTED: WD repeat and FYVE domain-containing protein 2 [Apis florea]
399154150	0.005058581	cuticular protein 22 precursor [Apis mellifera]
820855868	0.002636984	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine/arginine-rich splicing factor 1A [Apis florea]
296010819	0.000403466	catalase [Apis mellifera]
373203164	0.003308794	Cysteine string protein [Apis cerana]
571511986	0.002064871	PREDICTED: THO complex subunit 4-like [Apis mellifera]
380016877	0.001705197	PREDICTED: probable phosphatase phospho2 [Apis florea]
66519875	0.000365397	PREDICTED: clavesin-2-like [Apis mellifera]
571559437	0.00097146	PREDICTED: mitochondrial inner membrane protein OXA1L-like [Apis mellifera]
571502355	0.000991123	PREDICTED: multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like [Apis mellifera]
110755553	0.010186443	PREDICTED: aspartate aminotransferase, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]
571550343	0.003836775	PREDICTED: fatty acid synthase-like [Apis mellifera]
328790551	0.011773629	PREDICTED: 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial-like isoformX1 [Apis mellifera]
66521738	0.01322558	PREDICTED: probable citrate synthase 1, mitochondrial-like [Apis mellifera]
66546657	0.010930249	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A3 isoform 2 [Apis mellifera]
62526114	0.01705321	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Apis mellifera]
66530423	0.012042876	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 [Apis mellifera]
66550890	0.012236628	PREDICTED: phosphoglycerate mutase 2-like [Apis mellifera]
66518853	0.009679485	PREDICTED: elongation factor Tu, mitochondrial-like isoform 1 [Apis mellifera]
571541990	0.009374688	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial [Apis mellifera]
66551889	0.009557008	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A6-like isoform 1 [Apis mellifera]

Fonte: criado pelo autor, 2016.