

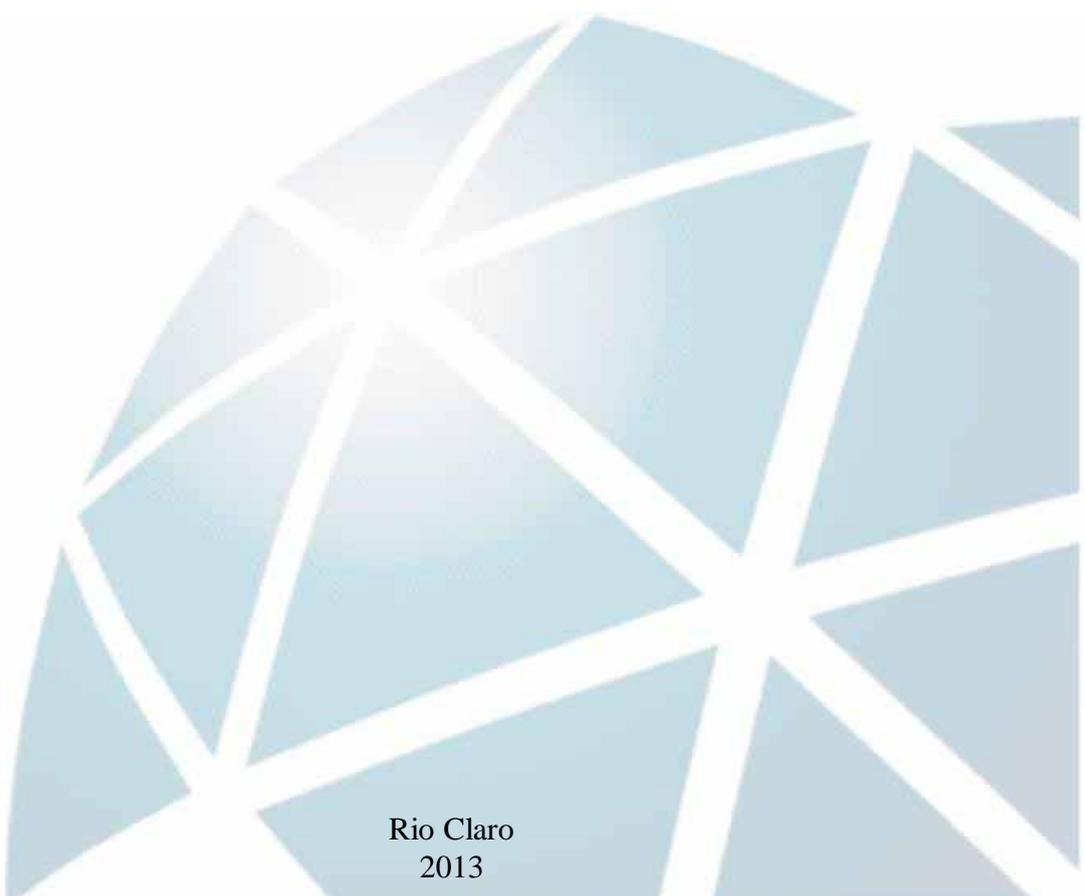
---

## **CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

---

**MARCEL PRATAVIEIRA**

# **DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA ANALÍTICA PARA AQUISIÇÃO DE IMAGENS MOLECULARES EM TECIDOS ANIMAIS**



Rio Claro  
2013

MARCEL PRATAVIEIRA

DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA ANALÍTICA PARA  
AQUISIÇÃO DE IMAGENS MOLECULARES EM TECIDOS ANIMAIS

Orientador: Mario Sergio Palma

Co-orientadora: Anally Ribeiro da Silva Menegasso

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

Rio Claro  
2013

547.75 Pratavieira, Marcel  
P912d Desenvolvimento de uma plataforma analítica para aquisição de  
imagens moleculares em tecidos animais / Marcel Pratavieira. - Rio Claro,  
2013  
110 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Mario Sergio Palma  
Coorientador: Anally Ribeiro da Silva Menegasso

1. Proteínas. 2. Imageamento molecular. 3. Neuropeptídeos. 4.  
Espectrometria de massas. 5. MALDI MSI. 6. Apis mellifera. 7.  
Neurobiologia. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

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

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Manoel e Meire, que são meus maiores exemplos. Todo o carinho e apoio que vocês me deram foram fundamentais para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradeço especialmente ao meu irmão Murilo, sem dúvidas, o meu melhor amigo. Obrigado por me ouvir, por estar sempre junto me apoiando e incentivando. Obrigado por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos.

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

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

Agradeço a Anally, pelo afeto, amor e carinho. Obrigado por estar sempre ao meu lado me apoiando. Você me ensina a cada dia como amar e a importância de se ter uma companheira para todas as horas.

Agradeço a toda a galera do CBI09. Agradeço pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos. Vocês ficarão para sempre em minha memória.

Agradeço especialmente aos meus melhores amigos, Laranja, Boi e Noé, sem vocês a faculdade não teria sido a experiência maravilhosa que foi. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos, pelas festas, almoços, jantares, baladas, pelas risadas (que foram MUITASSSS!). Espero ter a amizade de vocês pelo resto da minha vida.

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

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

Agradeço também ao grupo do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (Anally, Ana Maria, Franciele, Beto, Diego, Bibiana, Paulo, Helen, Nathalia, Eduardo, Marcela, Keni e Fernando) por toda ajuda direta ou indiretamente concedida. Agradeço em especial a Anally e Ana Maria que sempre me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Universidade pela infraestrutura e pelo apoio acadêmico.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro concedido durante o desenvolvimento deste projeto.

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

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

“A arte de interrogar não é tão fácil como se pensa. É mais uma arte de mestres do que de discípulos; é preciso ter aprendido muitas coisas para saber perguntar o que não se sabe.”

*Jean-Jacques Rousseau*

## RESUMO

Avanços na espectrometria de massas oferecem atualmente uma ótima oportunidade para estudos na investigação de interações moleculares em amostras de tecido. Um exemplo destes avanços foi o desenvolvimento da técnica MALDI *Mass Spectral Imaging* (MALDI MSI) voltada para a análise da distribuição espacial de compostos químicos em cortes histológicos. Essa técnica utiliza a sensibilidade e a especificidade da espectrometria de massas para mapear e produzir imagens bidimensionais, uma “fotografia química”, de moléculas presentes em cortes histológicos, proporcionando o estudo da interação molecular, complexidade e abundância relativa de biomoléculas. Neste trabalho, foi desenvolvida uma nova plataforma analítica para MALDI MSI em cérebro de abelhas *Apis mellifera*, que possibilitasse o estudo da distribuição espacial de alguns neuropeptídeos (Nps) importantes fisiologicamente (alatostatina – AST e taquicinina – TRP). Esses Nps foram estudados no cérebro de abelhas operárias com 20 dias de idade, comparando indivíduos que tiveram o comportamento agressivo estimulado (indivíduos “agressivos”) e indivíduos que não exerceram o comportamento agressivo (indivíduos controle). Após as análises de espectrometria de massas, os espectros de massas foram convertidos em imagens, gerando mapas de densidade de distribuição para cada relação massa/carga. Nesse estudo foram identificadas duas proteínas precursoras de Nps e alguns Nps pertencentes à classe das ASTs e TRPs. Os resultados sugerem que os precursores AST e TRP sofreram uma rápida clivagem e sucessivo transporte dos Nps maduros, para diferentes regiões do cérebro. Um perfil diferente de Nps foi observado em diferentes regiões do cérebro, incluindo diferenças qualitativas e quantitativas relativas entre os grupos não-agressivo e agressivo. Essas diferenças demonstram a complexidade do cérebro desses insetos, e a distribuição heterogênea dos Nps estudados, indicando que essas moléculas atuem em regiões específicas do cérebro e que possam atuar na modulação do comportamento agressivo. Pode-se concluir que a plataforma analítica desenvolvida foi muito sensível à detecção de Nps, proporcionando a visualização da distribuição espacial de proteínas e Nps *in situ* no cérebro de abelhas *A. mellifera*, em um curto espaço de tempo, utilizando-se um protocolo experimental de preparação de amostra muito simples e de fácil execução. Os resultados obtidos demonstram o enorme potencial da técnica para a melhor compreensão de processos biológicos, tal como a atuação de Nps na modulação do comportamento agressivo em abelhas. No futuro, a técnica estabelecida poderá ser utilizada para a compreensão de processos biológicos complexos, tais como a aprendizagem, memória e a modulação do comportamento social em *A. mellifera*.

PALAVRAS CHAVE: Espectrometria de Massas. MALDI MSI. Neuropeptídeos. *Apis mellifera*. Neurobiologia.

## ABSTRACT

New developments in mass spectrometry offer currently new opportunities for studies involving the specific localization of molecular ions directly in tissue samples. An example of recent advances in mass spectrometry was the development of technique Mass Spectral Imaging (MALDI MSI) that allows spatial analysis of chemical distribution patterns in intact tissues. This technique uses the sensitivity and specificity of mass spectrometry for mapping compounds distribution and to produce stereo spatial images, like a "chemical photography", of molecules present in histological sections. Thereby, it's possible to study molecular interactions, complexity and relative abundance of biomolecules. In this work, it was developed a new analytical platform for MALDI MSI in honeybee *Apis mellifera* brain, which make possible to study the spatial distribution of some physiologically important neuropeptides (Nps) – allatostatin (AST) and tachykinin (TRP). These Nps were studied in the honeybee brain with 20 days of age, comparing individuals who had aggressive behavior excited ("aggressive" individuals) and individuals who have not exercised aggressive behavior (control individuals). After mass spectrometer analysis, the mass spectra were converted into images, creating density maps for each mass/charge ratio distribution. In this study, it was identified two Nps protein precursor and some Nps belonging to ASTs and TRPs classes. The results suggest that AST and TRP precursors underwent a rapid cleavage and subsequent transport of mature Nps for different brain regions. A different Nps profile was observed in different brain regions, including qualitative and quantitative relative differences between non-aggressive and aggressive groups. These differences demonstrate the brain complexity of the studied insects and the Nps heterogeneous distribution, indicating that these molecules act in specific brain regions and that they can act in aggressive behavior modulation. It can be concluded that the analytical platform developed was very sensitive for Nps detection, providing *in situ* spatial distribution visualization of proteins and Nps in honeybee brain, in a short space of time and using a simple and easy to perform experimental sample preparation. The results demonstrate the enormous potential of the technique for better understanding of biological processes, such as the roles of Nps in aggressive behavior modulation in bees. In the future, the technique now established will be used in an attempt to contribute to a better understanding of complex biological processes such as learning and memory process and social behavioral modulation.

**Keywords:** Mass spectrometry. MALDI MSI. Neuropeptides. *Apis mellifera*. Neurobiology.

## SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO.....10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....13
2.1	Modelo biológico .....13
2.2	Neuropeptidômica .....14
2.3	Espectrometria de massas .....15
2.4	Imageamento molecular .....18
2.4.1	Imageamento molecular por técnicas de ionização ambiente .....19
2.4.1.1	Ionização de dessorção por eletrospray – DESI .....19
2.4.1.2	<i>Laser ablation electrospray ionization</i> – LAESI .....22
2.4.2	Imageamento molecular por técnicas de ionização sob vácuo .....24
2.4.2.1	Espectrometria de massa de íons secundários – SIMS .....24
2.4.2.2	Dessorção a laser assistida por matriz – MALDI .....29
2.4.2.2.1	Preparação de amostra .....31
2.4.2.2.2	Aplicações .....38
2.4.2.2.3	MALDI <i>imaging</i> na neurociência .....41
3	OBJETIVOS .....45
4	MATERIAL E MÉTODOS .....46
4.1	Material biológico .....46
4.2	Sequenciamento de neuropeptídeos .....46
4.3	Obtenções dos cortes de cérebro de <i>Apis mellifera</i> .....48
4.4	Histoquímica .....48
4.5	MALDI <i>imaging</i> revelando o perfil protéico dos tecidos via digestos tríplicos .....49
4.6	Identificações de Proteínas e Neuropeptídeos .....50
4.7	MALDI <i>imaging</i> revelando o perfil peptídico dos tecidos .....50
4.8	Análises das imagens .....51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....53
5.1	Desenvolvimento do método de preparação de amostra .....53
5.2	Sequenciamentos de neuropeptídeos em cérebro de <i>Apis mellifera</i> .....54
5.3	Da neuromorfologia à imagem molecular .....60
5.4	Proteínas como precursores de neuropeptídeos .....63

<b>5.5</b>	<b>Da imagem molecular ao comportamento .....</b>	<b>73</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Alatostatinas .....</b>	<b>77</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Taquicininas .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a espectrometria de massas (MS) representa uma das técnicas analíticas mais versáteis e sensíveis disponíveis aos cientistas e é uma ferramenta valiosa utilizada em diversos estudos nas áreas de Química, Biologia, Ciências Médica e Ciências Tecnológicas. Através de sua utilização é possível obter informações sobre: a estrutura da molécula, constituição química dos analitos, composição quantitativa e qualitativa de misturas complexas e a composição química de superfícies sólidas, bem como fornecer informações para a investigação entre as interações moleculares.

Um exemplo dos recentes avanços da espectrometria de massas foi o desenvolvimento da técnica denominada MALDI *Imaging* (MALDI-MSI), voltada para análise espacial da distribuição química de macro/micro-moléculas em tecidos intactos, o que pode auxiliar no estudo desafiador de importantes biomoléculas com alto grau de complexidade, presentes em baixa abundância em um determinado tecido. Essa técnica de imageamento químico utiliza a sensibilidade e a especificidade da MS para mapear e produzir imagens bidimensionais, como se fosse uma “fotografia química”, de moléculas presentes em um corte histológico, proporcionando o estudo da interação molecular, complexidade e abundância relativa de biomoléculas em células, bem como o estudo da estrutura molecular e localização espacial de moléculas como, por exemplo, os peptídeos.

A tecnologia normalmente utilizada nesse tipo de estudo envolve o uso de um *spray* que umedece completamente o tecido, provocando grandes alterações na osmolalidade de diferentes compartimentos histológicos, e de pressão osmótica local, que por sua vez levam à “ruptura dos compartimentos teciduais”, ocasionando a deslocalização das moléculas de proteínas (ELSNER et al., 2012). Como alternativa a isso, utilizamos uma nova tecnologia de preparação de amostras, baseada na aplicação “a seco” de solventes, matriz analítica, enzimas digestivas e demais reagentes, através do efeito piezoelétrico gerado por ponteiros ultrassônicas, que constituem o diferencial tecnológico para estudos de imageamento molecular por abordagem MALDI. Isso se tornou possível pelo uso de uma “impressora química” de alta performance. Esta tecnologia, desenvolvida em parceria com a empresa Shimadzu Biotechnology, permite análise de proteínas e peptídeos *in situ* em cortes histológicos de diferentes tipos de tecidos, mantendo intactos os compartimentos celulares (ESQUENAZI et al., 2009; GROSECLOSE et al., 2007).

A peptidômica é uma área do conhecimento altamente dinâmica que, se aliada com estudos proteômicos, tanto funcionais quanto estruturais, e aos dados de outras plataformas

“*omicas*” como a genômica, podem proporcionar um melhor entendimento da complexidade e interação entre biomoléculas induzidas por situações fisiológicas específicas. Estas diferentes situações fisiológicas podem estar associadas à síntese diferencial e às variações na abundância de peptídeos e proteínas (HERNÁNDEZ et al., 2012; BOERJAN et al., 2010; BROCKMANN et al., 2009; ALAUX et al., 2009) que, se forem devidamente estudadas e compreendidas, podem gerar implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia.

Levando-se em conta a importância do estudo de peptídeos e os avanços da análise de moléculas *in situ* através da espectrometria de massas, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma analítica para o estudo de neuropeptídeos que possam atuar na modulação do comportamento agressivo em cérebro de *Apis mellifera*. As abelhas são organismos caracterizados por apresentarem um sistema nervoso estruturado de forma simples, com poucos neurônios, por apresentarem uma riqueza comportamental e uma impressionante capacidade cognitiva (MENZEL e GIURFA, 2001). Equipados com um cérebro de menos de 1 mm cúbico, as abelhas apresentam aproximadamente 950.000 neurônios e, apesar de parecerem ter uma capacidade cognitiva limitada, esses organismos apresentam um repertório comportamental extremamente complexo, plástico e rico, no qual a memória e a aprendizagem desempenham um papel fundamental na adaptação desses animais ao meio ambiente (MENZEL, LÉBOULLE e EISENHARDT, 2006).

As abelhas são muito conhecidas por apresentarem uma estrutura social extremamente complexa, que é dividida em castas (rainhas, operárias e zangões), que por sua vez realizam tarefas especializadas para uma função particular, e que podem variar, em alguns casos, de acordo com a idade das abelhas. A natureza social e sua grande habilidade em regular as diferentes funções como um conjunto de indivíduos, em função de eventos que acontecem dentro e fora da colônia, fornecem a chave para seu sucesso e grande capacidade de adaptação (WINSTON, 2003). Dentro dessa complexa sociedade podemos destacar um grupo por sua notável importância: as abelhas guardiãs. Esse grupo é formado por algumas abelhas operárias que patrulham a entrada da colônia, depois de terem completado as tarefas do ninho, porém, antes de iniciarem a atividade de forrageamento, e são responsáveis por proteger a colônia (FREE, 1980).

A colônia de *Apis* contém estoques de mel e de pólen, e frequentemente uma abundância de cria, o que atrai a atenção de muitos saqueadores/predadores potenciais, inclusive o homem. Isso faz com que o comportamento agressivo desempenhado pelas abelhas responsáveis pela defesa da colônia frente a tais invasores, seja de fundamental

importância para a sobrevivência da colônia (FREE, 1980). Nesse contexto, a abordagem de MALDI *Imaging* oferece um enorme potencial para a análise simultânea de várias espécies moleculares presentes no cérebro de abelhas que possam estar associadas com o comportamento defensivo (agressividade) desses animais.

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 funcionam como neuro-hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores (BROCKMANN et al., 2009). Dentre as principais famílias de neuropeptídeos descritas atualmente na literatura estão: alostatina, apidaecina, corazonina, MVPV, miosupressina, NPLP-1, orcocinina, PBAN, perivisco, taquicinina (BROCKMANN et al., 2009). Constituindo esses grupos, alguns peptídeos já são conhecidos por serem bioativos na modulação do comportamento, como por exemplo, os peptídeos APMGFQGM<sub>Ra</sub> (taquicinina), SPSLRLRF<sub>a</sub> (sNPF), e IYLPLFASRL<sub>a</sub> (PBAN) que estão relacionados com a regulação da alimentação em insetos sociais (BROCKMANN et al., 2009).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Modelo biológico

Décadas de estudos com invertebrados têm estabelecido alguns animais como modelos robustos, confiáveis e influentes para o estudo da neurobiologia. Ao longo das últimas décadas, 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 no nível comportamental, neural e molecular, o que tem proporcionado à adoção de novas ideias e conceitos no estudo do comportamento e da neurobiologia. Parte desse incrível avanço só está sendo possibilitado devido à adoção de novas ferramentas que estão permitindo aos pesquisadores trilharem caminhos inovadores de pesquisa que permitem análises cada vez mais complexas do sistema nervoso de invertebrados. Depois de um prolongado ceticismo, podemos observar que o tipo de contribuição de alguns invertebrados para o desenvolvimento da neurociência está mudando e ganhando importância (MENZEL e ERBER, 1978; MENZEL e GIURFA, 2001; SATTELLE e BUCKINGHAM, 2006).

Os invertebrados são caracterizados, em geral, por apresentarem células grandes e acessíveis, sistema nervoso bem particionado e estruturado de forma simples, com comportamentos bem caracterizados e definidos, o que os tornam alvos de estudos neurocientíficos. Estudos com muitos invertebrados tais como os moluscos, gafanhotos, caranguejos, anelídeos, medusas e, em especial, as abelhas (*Apis mellifera*), têm ajudado no desenvolvimento de conceitos importantes na neurociência (SATTELLE e BUCKINGHAM, 2006).

As abelhas (*A. mellifera*) são organismos caracterizados por apresentarem um sistema nervoso estruturado de forma simples, com poucos neurônios, por apresentarem uma riqueza comportamental e uma impressionante capacidade cognitiva (MENZEL e GIURFA, 2001). Equipados com um cérebro de menos de 1 mm cúbico, as abelhas apresentam aproximadamente 950.000 neurônios e, apesar de parecerem ter uma capacidade cognitiva limitada, esses organismos apresentam um repertório comportamental extremamente complexo, plástico e rico (MENZEL, LEBoulLE e EISENHARDT, 2006).

Apresentando um sofisticado sistema sensorial e uma boa capacidade de aprendizagem e memória, as abelhas possuem mecanismos essenciais de funcionamento do sistema nervoso que não diferem drasticamente daqueles de vertebrados. Essas características conferem às

abelhas uma capacidade impressionante de processar informações e de se adaptar ao ambiente. Processos comportamentais que variam da coleta de informações através da percepção e da tomada de decisão até a adoção de ações adequadas permitem ao animal lidar com um ambiente em mudança, corroborando para o grande sucesso evolutivo desses animais.

Dentre todos os insetos, as abelhas são os animais que apresentam a estrutura social melhor organizada, de modo que as interações entre os indivíduos produzem uma estruturada divisão de trabalho, que se correlaciona com a idade do indivíduo e com mudanças na fisiologia e na expectativa de vida. Apresentando uma estrutura social extremamente complexa, esses organismos, assim como os demais animais sociais, necessitam de uma refinada capacidade cognitiva, que por sua vez é fundamental para a intensa comunicação entre os indivíduos da colônia, para o reconhecimento espacial, para a navegação durante o comportamento de exploração, para o forrageamento, para a defesa da colônia, dentre outras funções executadas por esses animais. Em suma, esses organismos são considerados como sistemas modelo para o estudo da cognição em um nível intermediário de complexidade.

## **2.2 Neuropeptidômica**

A expressão "peptidoma" e "peptidômica" começou a ser utilizado em 2001 e é análogo ao termo "proteoma" e "proteômica" (WILKINS et al., 1996; SCHULZ-KNAPPE et al., 2001; VERHAERT et al., 2001). Em contraste com a proteômica, que foca no estudo de proteínas (> 10 kDa) e suas interações, a peptidômica envolve o estudo de peptídeos endógenos (< 10 kDa) contidos em células, órgãos, fluídos e organismos, tais como hormônios e neuropeptídeos.

Os neuropeptídeos são moléculas mensageiras de ampla 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). 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.

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. Nesses insetos, as principais famílias de neuropeptídeos descritas atualmente na literatura são: *Allatostatin*, *Apidaecin*, *Corazonin*, *MVPV*, *Myosuppressin*, *NPLP-1*, *Orcokinin*, *PBAN*, *Perivisc*, *Tachykinin* (BROCKMANN et al., 2009). Diversos neuropeptídeos já foram descritos por atuarem na modulação do comportamento social desses insetos, tais como os peptídeos *APMGFQGMRA* (tachykinin), *SPSLRLRFa* (sNPF), e *IYLPLFASRLa* (PBAN) que estão relacionados com a regulação da alimentação em insetos sociais (BROCKMANN et al., 2009; BOERJAN et al., 2010).

### 2.3 Espectrometria de massas

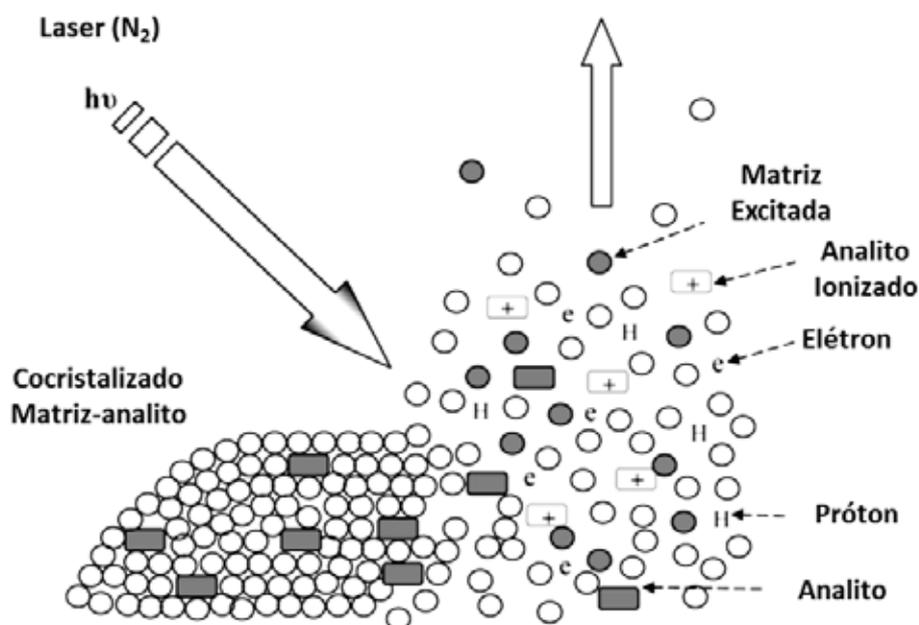
Um espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes de uma amostra em íons gasosos (carregados positiva ou negativamente) e mede suas massas, podendo fornecer informações importantes sobre os analitos, incluindo a sua estrutura, pureza e composição (EL-ANEED et al., 2009). Esse instrumento isola os íons gasosos de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ). Um espectrômetro de massas é formado basicamente de cinco componentes principais: sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador, detector e processador de dados. As amostras (sólida, líquida ou gasosa) são introduzidas no espectrômetro através do sistema de injeção. Na fonte de íons os componentes da amostra são convertidos em íons, de acordo com o método de ionização do equipamento. Como resultado do processo de ionização temos a formação de uma nuvem de íons, que deixam a fonte de ionização e são acelerados para dentro do analisador de massas. Uma vez separados no analisador de massas, os íons vão direto ao detector e os sinais gerados são processados e analisados por modernos computadores.

A espectrometria de massas é um dos métodos mais precisos, rápidos e confiáveis disponíveis para determinar a massa molecular de analitos com uma alta precisão em uma única medição. Todavia, essa técnica analítica não é recente, ela teve seu início em 1886 com a descoberta do íon positivo por Goldstein (GOLDSTEIN, 1886). O primeiro espectro de massas foi obtido por Thomson em 1912, e o primeiro espectrômetro foi desenvolvido por Dempster em 1918 (DEMPSTER, 1918). A partir desta data vários tipos de espectrômetros foram desenvolvidos para diversas finalidades, mas o grande avanço da espectrometria de massas no campo biológico ocorreu a partir da década de 80 com o desenvolvimento das técnicas de ionização MALDI (HILLENKAMP et al., 1987) e ESI (FENN et al., 1989).

Com o advento das fontes de ionização suaves (MALDI e ESI) houve uma revolução na extensão das aplicações da espectrometria de massas, que passaram a abranger a análise de proteínas, peptídeos, biopolímeros, polímeros sintéticos, pequenas moléculas polares, dentre outras moléculas (EL-ANEED et al., 2009; KOLLIPARA et al., 2011) . Essas técnicas de ionização são consideradas suaves, pois formam íons com baixa energia interna, permitindo a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação durante o processo. Por exemplo, a ionização do tipo ESI se baseia no princípio da formação de um “spray” eletrolítico (FENN et al., 1989). Nesse processo, o solvente vai evaporando até que os íons sejam expelidos para a fase gasosa e passem através de placas carregadas, chegando ao analisador de massas. Esta técnica utiliza um campo elétrico para a produção do “spray” de gotículas carregadas, podendo produzir íons positivos ou negativos, dependendo da preparação da amostra e tipo de análise (EL-ANEED et al., 2009).

Na técnica MALDI, os íons são desorvidos da fase sólida. Esse processo resulta na passagem não espontânea de moléculas não voláteis da fase sólida para a fase gasosa e na ionização dos analitos (EL-ANEED et al., 2009). A amostra é inicialmente misturada a um solvente e incorporada a uma estrutura cristalina de pequenos compostos orgânicos (matriz) em excesso molar, para que ocorra o processo de co-cristalização entre os analitos e a matriz (KOLLIPARA et al., 2011; JURINKE et al., 2004). Os componentes dessa mistura são trazidos para a fase gasosa através da utilização da radiação laser, que é absorvido pela matriz causando uma decomposição estrutural dos cristais irradiados (EL-ANEED et al., 2009). Esse processo gera uma nuvem de partículas, através da qual os íons são extraídos por um campo elétrico. A figura 1 representa os processos através dos quais os íons são formados durante uma análise de espectrometria de massas do tipo MALDI (EL-ANEED et al., 2009).

**Figura 1.** Representação esquemática do processo de ionização MALDI. O cocrystalizado de matriz-analito é bombardeado com um laser UV que excita a matriz, que, por sua vez, transfere energia aos analitos. Esse processo resulta na ionização e dessorção dos analitos.



Fonte: EL-ANEED et al. (2009), tradução nossa.

Após o processo de ionização, os íons são direcionados para um analisador de massas e separados de acordo com suas relações massa/carga ( $m/z$ ). O analisador de massas comumente associado ao MALDI é conhecido como Tempo de Vôo – ToF (Time-of-Flight). Essa metodologia de separação de íons é uma das mais simples e, apesar de ter sido descrita pela primeira vez em meados do século XX por Stephens (1946), ela só foi redescoberta na década de 90 (BROWN e LENNON, 1995). Em um analisador ToF, os íons voam livremente sob vácuo em um tubo de 1-2 metros de comprimento, até atingirem o detector. A relação  $m/z$  é determinada através da medida do tempo de vôo das moléculas ionizadas, o qual é maior para moléculas maiores do que para moléculas menores – considerando que as suas energias iniciais sejam iguais – (JURINKE et al., 2004; CANTÚ et al., 2008). As massas são acessíveis como dados numéricos para processamento direto e subsequente análise.

De acordo com Cunha (2006), a compatibilidade dos diferentes tipos de analisadores de massas aos diferentes métodos de ionização pode variar muito, de modo que as diferentes possibilidades de associações possam ser empregadas para a análise de diferentes moléculas. Nesse contexto, espectrômetros de massas do tipo MALDI-ToF têm sido utilizados para a análise de peptídeos e proteínas de alto peso molecular (KOLLIPARA, et al., 2011).

Atualmente, esses espectrômetros têm sido utilizados para a análise de proteínas e

peptídeos em várias amostras biológicas, tais como plasma, soro, saliva, leite, urina e, mais recentemente, para a análise direta de tecido, através da técnica denominada MSI (VOORTMAN et al., 2008; RYU et al., 2006; MELTRETTER et al., 2008; M'KOMAA et al., 2007; REYZER e CAPRIOLI, 2005).

## 2.4 Imageamento molecular

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).

Atualmente, 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). Essa ferramenta tem sido aplicada em diversas áreas, como nas ciências biológicas, biomédica, química, farmacêutica, de materiais, forense, dentre outras, devido à sua alta especificidade química e relativa facilidade de aplicação (PACHOLSKI e WINOGRAD, 1999; MCDONNELL e HEEREN, 2007; VIDOVA et al., 2009; CHUGHTAI e HEEREN, 2010 ; VICKERMAN, 2011).

Os métodos de ionização sob vácuo mais utilizados para análises de MSI são a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*matrix assisted laser desorption ionization* - MALDI) e a espectrometria de massas de íons secundários (*secondary ion mass spectrometry* - SIMS) (PACHOLSKI e WINOGRAD, 1999; MCDONNELL e HEEREN, 2007; VIDOVA et al., 2009; CHUGHTAI e HEEREN, 2010; VICKERMAN, 2011;

WATROUS, ALEXANDROV e DORRESTEIN, 2011). Outra técnica de ionização sob vácuo utilizado para o imageamento químico é o NIMS (*nanostructure-initiator mass spectrometry*), introduzida por Siuzdak e colaboradores (2007), que não utiliza matriz, gera uma fragmentação reduzida por ser uma técnica de ionização suave e apresenta alta resolução espacial e sensibilidade (NORTHEN et al., 2007; WOO et al., 2008; WU et al., 2013). Essa tecnologia vem sendo aplicada para a análise de biofluidos (urina, saliva e sangue) no estudo de xenobióticos e metabólitos, para a análise de células isoladas e imageamento químico de tecidos (YANES et al., 2009; WU et al., 2013).

Além dos métodos de ionização sob vácuo utilizados para análises de MSI, recentemente foram desenvolvidas técnicas de ionização ambiente, que são realizadas sob pressão atmosférica. Nessas técnicas as amostras são submetidas a pouca ou nenhuma preparação, a ionização ocorre fora do espectrômetro de massas, e somente os íons são introduzidos no interior do espectrômetro, e não toda a amostra (COOKS et al., 2006; WU et al., 2013). Mais de trinta métodos de ionização ambiente têm sido desenvolvidos nos últimos anos (VAN BERKEL, PASILIS e OVCHINNIKOVA, 2008; VENTER, NEFLIU e COOKS, 2008; CHEN, GAMEZ e ZENOBI, 2009; ALBERICI et al., 2010; HUANG et al., 2010; HUANG et al., 2011; IFA et al., 2010; WESTON, 2010; HARRIS, GALHENA e FERNANDEZ, 2011), alguns dos quais têm sido utilizados em análises de MSI. Dentre esses métodos temos: DESI - *desorption electrospray ionization* (IFA et al., 2007), LAESI - *laser ablation electrospray ionization* (NEMES e VERTES, 2007), DAPPI - *desorption atmospheric pressure photoionization* (POL et al., 2009), PESI - *probe electrospray ionization* (CHEN et al., 2009a), fs-LDI - *femtosecond laser desorption ionization* (COELLO et al., 2010), IR-LAMICI - *infrared laser ablation metastable-induced chemical ionization* (GALHENA et al., 2010), dentre outros.

## **2.4.1 Imageamento molecular por técnicas de ionização ambiente**

### **2.4.1.1 Ionização de dessorção por eletrospray – DESI**

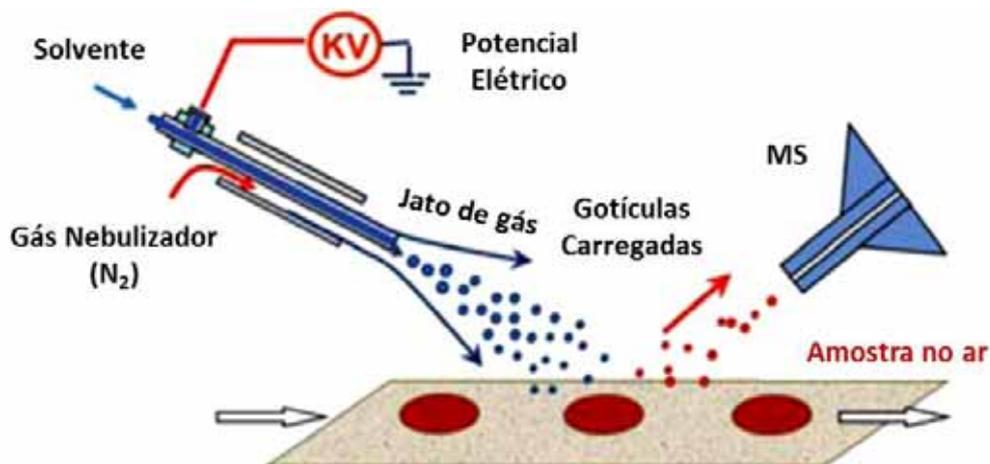
O método de ionização DESI surgiu como uma técnica de ionização ambiente alternativa em 2004 (TAKÁTS et al., 2004). Essa técnica apresentou uma perspectiva inovadora para a realização de análises químicas quantitativas e qualitativas através da espectrometria de massas. A ideia central era que a superfície de objetos tais como um pedaço de couro, uma semente de planta cortada ao meio, um tomate intacto, a ponta de um dedo,

dentre outros, pudessem ser analisadas diretamente por MS sem que houvesse a necessidade da extração das moléculas de interesse, ou um pré-tratamento da amostra. A sua primeira aplicação para o imageamento químico foi descrito por Ifa e colaboradores (2007) que utilizaram a técnica para o estudo de lipídeos em secções cerebrais de ratos.

No método de ionização DESI, gotículas primárias carregadas geradas por ESI causam um impacto de solvente na superfície da amostra para dessorver o analito em gotículas secundárias (VENTER, SOJKA e COOKS, 2006; WU et al., 2013). Simulações do processo de DESI mostram a liberação de dezenas de microgotículas com o impacto de uma única gota primária de alta velocidade atingindo a amostra (COSTA e COOKS, 2008). As microgotículas secundárias contendo os analitos são geradas externamente, sugadas para dentro da entrada do espectrômetro de massa e analisadas – Figura 2 – (WU et al., 2013). Esse processo pode ser basicamente subdividido em três etapas: na primeira um spray de solvente incide sobre a amostra formando uma fina camada de líquido; na segunda etapa a camada de líquido formada sobre a amostra auxilia na extração dos analitos; a última etapa do processo é iniciada por consecutivas colisões de gotículas primárias oriundas do ESI com a fina camada de líquido, gerando um processo contínuo que produz gotículas secundárias contendo os analitos extraídos da amostra (MONGE et al., 2013). Estudos da energia interna corroboram com a hipótese de que o último passo da liberação dos íons é idêntico ao processo que ocorre na ionização do tipo ESI (NEFLIU et al., 2008).

Os parâmetros que influenciam o desempenho geral de uma análise por DESI são os ângulos de incidência das gotículas primárias e o ângulo da amostra, a distância da entrada do espectrômetro de massas, a distância entre o *spray* capilar e a amostra, dentre outros (TAKÁTS, WISEMAN e COOKS, 2005). Uma fonte independente do ângulo foi desenvolvida por Venter e Cooks (2007). A resolução espacial alcançável depende, dentre outros parâmetros, do tipo de substrato e da composição do solvente, atingindo, normalmente, 200  $\mu\text{m}$  (TAKÁTS, WISEMAN e COOKS, 2005; GREEN et al.; 2010). Durante o imageamento químico a integridade espacial é mantida de modo que não ocorra a difusão dos analitos através da superfície úmida ou a redistribuição química após o tecido ser submetido ao *"spray"* eletrolítico (WISEMAN et al.; 2008).

**Figura 2.** Representação esquemática dos princípios de operação no método de ionização por DESI. Um jato de gotículas primárias atinge a superfície da amostra causando a dessorção dos analitos em gotículas secundárias (gotículas carregadas), que são sugadas para dentro do espectrômetro de massas e analisadas.



Fonte: WU et al. (2013), tradução nossa.

A maioria dos focos recentes de estudo está na análise de amostras biológicas tais como plantas, tecidos animais, culturas bacterianas e fluidos biológicos, que são realizadas através de experimentos de MS ou MSI. No entanto, existem muitas utilizações em análises de rotina, como, por exemplo, para análises farmacêuticas de alto rendimento, análise de alimentos e de fragrâncias (MONGE et al., 2013).

Dentre essas áreas temos a sua utilização para a realização de imageamento químico direto de metabólitos em folhas e pétalas de *Hypericum perforatum* (LI, HANSEN e JANFELT, 2013). Nesse estudo foi possível localizar importantes metabólitos, tais como alguns ácidos graxos de cadeia longa (VLCFAs - *very long chain fatty acids*), *hypericin* ( $m/z$  503), *hyperforin* ( $m/z$  535), *rutin* ( $m/z$  609), dentre outros metabólitos. Essa técnica de ionização também foi descrita para o estudo de drogas e metabólitos em tecidos animais (WU et al., 2010; GREER; STURM e LI, 2011; VISMEH et al., 2012). Vismeh e colaboradores (2012) descreveram a aplicação de DESI-MSI para a análise de secções coronais (6  $\mu$ m) de cérebro de rato que receberam a administração de 2,5 mg/kg de clozapina, um antipsicótico atípico utilizado no tratamento de esquizofrenia, que é capaz de se ligar a vários tipos de receptores do sistema nervoso central. A clozapina foi localizada e quantificada em secções individuais do cérebro dos organismos tratados (45 minutos após a administração da droga). A quantificação por DESI-MSI revelou 0,2-1,2 ng de clozapina em secções individuais do cérebro, que foram posteriormente confirmadas por extração e análise por espectrometria de massa do tipo LC-MS/MS.

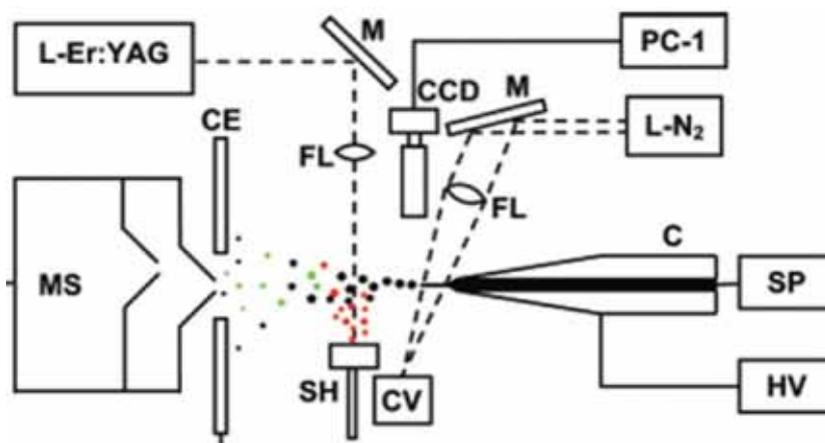
A abordagem DESI-MSI também vem sendo utilizada para o estudo de diversos tipos de câncer, tais como: oligodendroglioma, astrocitoma, oligoastrocitoma, meningiomas, adenocarcinomas, dentre outros (EBERLIN et al., 2010; EBERLIN et al., 2012; EBERLIN et al., 2013). Eberlin e colaboradores (2010) utilizaram a abordagem de imageamento por DESI para a análise do perfil lipídico de 68 secções de câncer de próstata e tecidos de próstata normais; esse estudo identificou o sulfato de colesterol como um possível marcador para o câncer de próstata. Estudos mais recentes demonstram a aplicação de DESI-MSI na elucidação do perfil lipídico e caracterização molecular intra-operatória de tumores cerebrais, podendo ser aplicada à detecção molecular dos limites entre os tecidos normais e neoplásicos durante procedimentos cirúrgicos (EBERLIN et al., 2013). Nesse estudo foi elaborada uma classificação para discriminar gliomas e meningiomas, baseados em 36 amostras de gliomas e 19 de meningiomas. O modelo de classificações proposto foi testado e validado através da sua aplicação na análise de 32 amostras cirúrgicas obtidas de cinco sujeitos de pesquisa submetidos a cirurgias cerebrais. Foram estudados diferentes tumores, tais como oligodendroglioma, astrocitoma e meningioma de diferentes graus e concentrações celulares. Os diagnósticos moleculares oriundos da MSI correspondem aos diagnósticos histopatológicos com pouquíssimas exceções, demonstrando o elevado potencial da técnica para guiar cirurgias cerebrais e fornecer um diagnóstico rápido aos médicos.

#### **2.4.1.2 Laser ablation electrospray ionization – LAESI**

O método de ionização LAESI desenvolvido por Nemes e Vertes (2007) é caracterizado por produzir moléculas ionizadas sob condições atmosféricas normais (ionização ambiente) de amostras contendo água. LAESI é um método de ionização híbrido baseado na dessorção a laser dos analitos, seguida pela ionização dos mesmos através de colisões com gotículas carregadas (“spray”), produzidas por uma fonte de ionização do tipo ESI (NEMES e VERTES, 2007). Nesse processo um feixe de laser (*mid-infrared*) de 2940 nm incide sobre a amostra excitando ligações do tipo O-H em moléculas de água, o que causa uma mudança de fase dos analitos e uma extração e ejeção (dessorção) de partículas neutras (CHEN, BOGAERTS e VERTES, 2006; VERTES et al., 2008; CHEN e VERTES, 2008; TRIM et al., 2012); desse modo, a água age como uma matriz intrínseca (WU et al., 2010). Os analitos desorvidos sofrem, então, uma interação com gotículas carregadas produzidas por ESI, de modo que partes dessas moléculas sejam convertidas em íons gasosos – Figura 3 (NEMES, WOODS e VERTES, 2010; TRIM et al., 2012). O imageamento químico por

LAESI MS é realizado através da varredura da superfície do tecido com os feixes de laser, que incidem sob áreas previamente selecionadas, enquanto os íons gerados são analisados por MS e os espectros de massa são gerados (NEMES, WOODS e VERTES, 2010).

**Figura 3.** Diagrama esquemática com os principais essenciais da instrumentação LAESI – C, capilar; SP, seringa; HV, suplemento de energia de alta voltagem; L-N<sub>2</sub>, Laser (N<sub>2</sub>); M, espelhos; FL, lentes focalizadoras; CV, cubeta; CCD, câmera com microscópio de curta distância; CE, contra eletrodo; OSC, osciloscópio digital, SH, suporte de amostras; L-Er:YAG, laser Er:YAG; MS, espectrômetro de massas; PC-1, computador.



Fonte: WU et al. (2013).

A aplicação da técnica de ionização LAESI em IMS foi introduzida por Vertes e colaboradores em 2008 (NEMES et al., 2008). Nesse trabalho foram identificados metabólitos característicos das regiões verdes e amarelas de folhas de *Aphelandra squarrosa*, na qual pode ser observada a distribuição diferencial de metabólitos como, por exemplo, o *methoxykaempferol glucoronide* ( $m/z$  493) que foi identificado apenas nas regiões amarelas e o *kaempferol* ( $m/z$  663) encontrado em ambas as regiões. Foram criadas imagens com resolução lateral e em profundidade, com resoluções de 350  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. As distribuições moleculares de alguns metabólitos endógenos demonstraram um contraste químico entre as regiões (verdes e amarelas); também foram observadas mudanças quantitativas conforme as análises atingiam regiões da epiderme e mesofilo foliar. Desse modo, Nemes e colaboradores (2008) demonstraram com a tecnologia LAESI MSI, um novo caminho para o imageamento químico por técnicas de ionização ambiente e uma nova plataforma para a análise em profundidade de metabólitos em organismos vivos.

A criação de imagens 3D baseadas nas análises em profundidade foi explorada em um estudo subsequente, no qual foram criadas imagens de metabólitos em folhas de

*Spathiphyllum lynise* e *Aphelandra squarrosa* (Nemes, Barton e Vertes, 2009). Para a criação de imagens tridimensionais foi utilizado a combinação de imagens em diferentes profundidades. Essas imagens mostraram padrões específicos de acumulação de metabólitos, que se relacionam com as funções bioquímicas destas biomoléculas na fotossíntese e defesa da planta. Avanços na técnica LAESI MSI também possibilitaram sua aplicação no imageamento molecular a nível celular (*single-cell imaging*). Shrestha e colaboradores (2011) realizaram com sucesso o imageamento químico de células epidérmicas individuais de cebola (*Allium cepa*) e de aglomerados celulares aclorofilados em folhas de *Citrus aurantium*.

Com o desenvolvimento da técnica LAESI MSI e de metodologias relacionadas, foi possível estender a aplicação da técnica que inicialmente era utilizada para a análise de tecidos vegetais e que agora é aplicada, também, para a análise de tecidos animais. Após superar desafios técnicos associados à desidratação potencial de alguns tecidos animais no ambiente, Nemes e colaboradores (2010) demonstraram a viabilidade da aplicação da técnica para a análise de lipídeos e metabólitos em secções de cérebro de ratos (sem tratamento químico) à pressão atmosférica (NEMES, WOODS e VERTES, 2010). Essa tecnologia também foi utilizada para monitorar a distribuição de proteínas endógenas em secções de tecidos biológicos (TRIM et al., 2012), para a análise *in vitro* de metabólitos no órgão elétrico de arraias *Torpedo californica* (SRIPADI et al., 2009), dentre outras aplicações.

## **2.4.2 Imageamento molecular por técnicas de ionização sob vácuo**

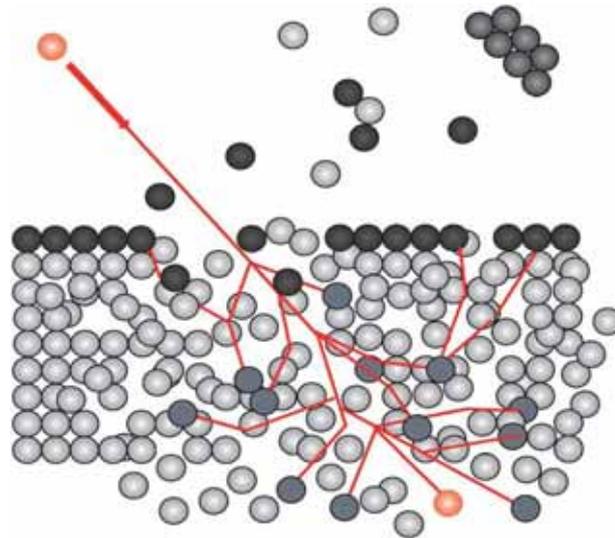
### **2.4.2.1 Espectrometria de massa de íons secundários – SIMS**

A análise química em nano escala de organismos vivos ou a análise de objetos artificiais é uma tarefa analítica altamente desafiadora e relevante para a ciência e tecnologia atuais (SENONER e UNGER, 2012). Impulsionado pelo desempenho do imageamento químico, em especial a resolução lateral de superfícies, diversos métodos analíticos foram melhorados durante as últimas décadas (ADAMS, VAECK e BARRETT, 2005; ADAMS, 2008; WU e BECKER, 2011). Diferentes métodos de espectrometria de massas tais como as técnicas MALDI, DESI e LAESI permitem o imageamento químico (IFA et al. 2007; VICKERMAN, 2011; SENONER e UNGER, 2012; EBERLIN et al., 2013), mas apenas a espectrometria de massas de íons secundários (SIMS) é capaz de resolver a composição química em nível de nano escala (SENONER e UNGER, 2012).

A história de SIMS desde o seu princípio no início dos anos 60 foi recentemente revisada por um de seus pioneiros, Werner (2003). Nessa revisão fica claro que o desenvolvimento da SIMS ocorreu inicialmente devido as necessidades da indústria de eletrônica e de semicondutores, e que o primeiro instrumento comercial de imageamento, que fornecia informações elementares (10  $\mu\text{m}$  de resolução lateral), estava disponível no mercado no final da década de 60 (WERNER, 2003). O imageamento por SIMS-MSI é, de fato, a mais antiga técnica de MSI (CASTAING e SLODZIAN, 1962; BENNINGHOVEN, 1970), todavia, apenas nas últimas décadas foi possível criar imagens bi e tridimensionais (PACHOLSKI e WINOGRAD, 1999; TOUBOUL et al., 2005; SJÖVALL, JOHANSSON e LAUSMAA, 2006; VAIDYANATHAN et al., 2008). Atualmente, essa técnica tem sido aplicada a diversas áreas, tais como na geologia, cosmoquímica, pesquisa de materiais, biologia, ecologia, pesquisas médicas, dentre outras (SENONER e UNGER, 2012). A história mais detalhada do imageamento químico através da SIMS foi apresentada em uma série de revisões (CHABALA et al., 1995; GUERQUIN-KERN et al., 2005; BOXER, KRAFT e WEBER, 2009).

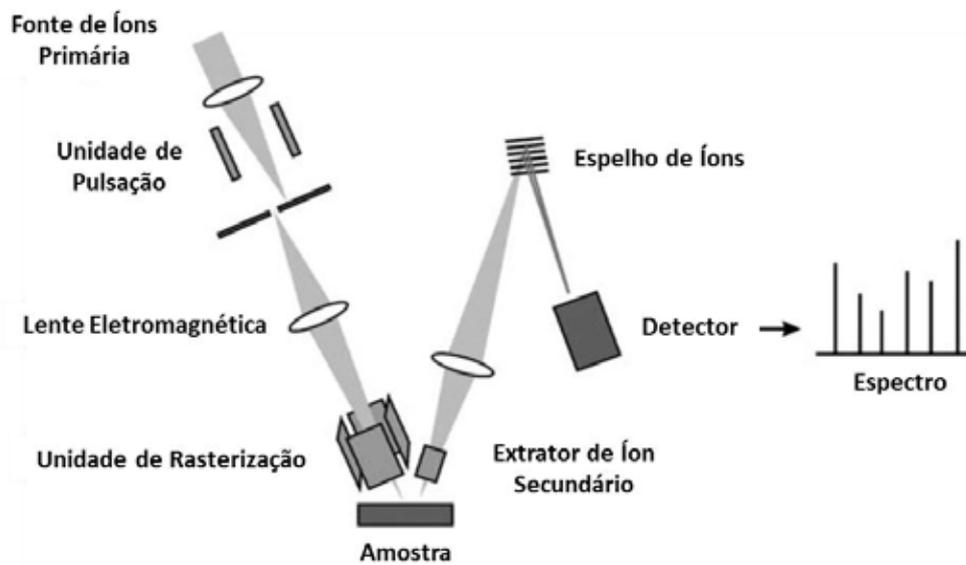
A técnica SIMS é baseada na utilização de um feixe primário de íons energéticos (normalmente de 5 a 40 keV) gerados por uma fonte de íons (primária), que incidem sobre a superfície sólida da amostra, induzindo uma cascata de colisões abaixo da mesma - Figura 4 - (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009; TRIM et al., 2012; SENONER e UNGER, 2012). Nessa cascata de colisões a energia é dissipada a partir das partículas energéticas primárias para os constituintes da amostra, quebrando as ligações e fazendo com que as partículas deixem a superfície bombardeada (íons secundários) devido à transferência de momento (*momentum*) (Figura 5) – esse processo é conhecido com pulverização catódica (SENONER e UNGER, 2012). A maioria das partículas secundárias é neutra, e apenas uma pequena parte dessas partículas é ionizada ( $\sim 1\%$ ) e detectada por espectrômetros de massas (SENONER e UNGER, 2012).

**Figura 4.** Cascata de colisões em uma amostra sólida, coberta por uma monocamada, iniciada pelo impacto de um íon energético primário – vermelho.



Fonte: SENONER e UNGER (2012).

**Figura 5.** Esquema simplificado com os componentes essenciais de um espectrômetro de massas de íons secundários (SIMS). Os componentes comuns para todos os instrumentos SIMS são: a fonte de íons primária, uma câmara de amostra com uma lente de extração de íons secundários e um espectrômetro de massas.



Fonte: SALEEM e GALLA (2010), tradução nossa.

A espectrometria de massa de íons secundários pode ser realizada basicamente de dois modos, denominados SIMS dinâmico e SIMS estático. Para o SIMS dinâmico, o termo “dinâmico” refere-se à erosão substancial da superfície da amostra por um fluxo de alta

densidade de íons primários, aplicado normalmente para a análise de compostos em profundidade e para o mapeamento desses compostos (SENONER e UNGER, 2012). No SIMS estático os íons secundários são originados exclusivamente de regiões não danificadas sobre a superfície da amostra analisada (SENONER e UNGER, 2012). Para atingir esse objetivo, a densidade de fluxo de íons primários tem que ser menor do que o “limite estático” de  $10^{12}$  íons primários por  $\text{cm}^2$ , e a produção de íons secundários devem ser bem menores (SENONER e UNGER, 2012). Esse baixo fluxo de íons primários garante estatisticamente que cada íon primário atinja uma região “virgem” da amostra, que ainda não sofreu danos por impactos anteriores (SENONER e UNGER, 2012).

Atualmente, existem duas abordagens fundamentalmente diferentes para a análise SIMS de amostras biológicas baseadas no modelo do instrumento: ToF-SIMS e SIMS dinâmico utilizando espectrômetro de massas de setor magnético (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009). Para o ToF-SIMS, os íons secundários gerados são analisados pelos analisadores de massa do tipo tempo-de-vôo, permitindo que um amplo espectro de massas seja monitorado durante as análises. O objetivo da utilização do ToF-SIMS é a dessorção e detecção de espécies moleculares (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009). Por outro lado, o SIMS dinâmico utiliza feixes de íons primários contínuos e um conjunto pré-selecionado de íons é detectado com um espectrômetro de massas de setor magnético (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009).

De modo geral, as principais razões que fizeram com que a técnica SIMS não tenha sido amplamente adotada para o estudo de amostras biológicas são: a sensibilidade e resolução espacial insuficientes, os desafios apresentados quanto a identificação molecular, e os desafios da preservação de amostras biológicas submetidas a análises sob alto vácuo (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009). Todavia, atualmente devido aos avanços tecnológicos e melhorias nos protocolos experimentais, as aplicações da técnica SIMS-MSI vêm expandindo enormemente. Após 2006, quando Heeren e colaboradores publicaram um artigo intitulado “*Why don't biologists use SIMS?*”, foi possível observar um aumento crescente no número de artigos que descrevem a aplicação de SIMS-MSI para análises biológicas (SENONER e UNGER, 2012).

Dentre as recentes aplicações da técnica SIMS-MSI, temos a sua utilização para o estudo da distribuição química em membranas biológicas (COLLIVER et al., 1997; PACHLOSKI et al., 1998; RODDY et al., 2002; ALTELAAR et al., 2006; TOUBOUL et al., 2007). Embora a bicamada lipídica seja o elemento estrutural universal das membranas biológicas, pouco se sabe sobre a organização lateral dos lipídeos e das proteínas associadas à

membrana (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009). Acredita-se que os microdomínios proteicos, por exemplo, desempenham um papel central na organização do sistema fluido, permitindo que a membranas das células possam realizar processos celulares essenciais, incluindo o recrutamento de proteínas e de transdução de sinal (HANCOCK, 2006; ZHENG et al., 2008).

Um dos mais impressionantes exemplos que demonstra o potencial da técnica SIMS-MSI foi descrito por Ostrowski e colaboradores (2004), que descreveram uma diminuição na abundância de fosfatidilcolina e um aumento de *aminoethylphosphonolipid* detectados em sítios de fusão (conjugação) na membrana plasmática entre células de *Tetrahymena*. Gunnarson et al. e colaboradores (2010) também realizaram um trabalho importante ao aplicarem a técnica ToF-SIMS no imageamento da bicamada lipídica. Nesse estudo foi possível identificar vesículas lipídicas submicrométricas com separações menores do que 1 µm e com uma resolução lateral de 60 nm. Se esses resultados puderem ser generalizados, isso significaria uma oportunidade única de analisar a composição de regiões específicas das membranas plasmáticas com resoluções submicrométricas em outros processos celulares importantes (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009).

O imageamento químico por espectrometria de íons secundários é utilizada, também, para a detecção e mapeamento de pequenas moléculas em amostras biológicas. Bich e colaboradores (2013) utilizaram a técnica ToF-SIMS para mapear ácidos graxos, colesterol e vitamina E nas regiões do giro denteado e do córtex em de secções de cérebro de rato. Nesse estudo foram realizadas análises de reprodutibilidade do método aplicado, que atingiram um coeficiente global de variação de 10 % através de experimentos realizados com cérebro de quatro ratos diferentes. De acordo com os modelos matemáticos adotados, os dados foram considerados com boa reprodutibilidade.

A análise por SIMS-MSI têm sido utilizada em estudos de ecologia relacionados com a contaminação ambiental. O transporte de plutônio, urânio e netúnio têm sido analisados em águas subterrâneas próximas a usinas de processamentos nucleares (NOVIKOV et al., 2006; KALMYKOV et al., 2007; BOULYGA, 2011). Através da aplicação da técnica foi possível provar a absorção e localização de radionuclídeos (partículas de plutônio, urânio e netúnio adsorvidas em nanopartículas de ferro hidratado coloidal) presentes em plantas e células bacterianas (NOVIKOV et al., 2006; KALMYKOV et al., 2007; DUHUTREL et al., 2010; BYRNE et al., 2010; BOULYGA, 2011). O imageamento de alta resolução por SIMS também tem sido utilizado para pesquisas médicas, tal como no estudo da localização de ferro, ferritina e hemossiderina em cérebros patológicos de pacientes com doença de

Alzheimer (QUINTANA et al., 2006; QUINTANA et al., 2007), dentre outras inúmeras aplicações para amostras biológicas.

Com o desenvolvimento da técnica SIMS-MSI e de metodologias relacionadas, foi possível estender a aplicação da mesma, que era voltada para a análise de componentes eletrônicos e semicondutores, e agora, é aplicada também, para diversas análises biológicas. Todavia, apesar dessa técnica possibilitar uma análise precisa de amostras biológicas, ainda existe muitos desafios que devem ser resolvidos antes desse objetivo de longo prazo se tornar uma realidade (BOXER, KRAFT e WEBER, 2009). Como exemplo dos desafios, temos a quantificação por SIMS, que muitas vezes é dificultada em decorrência da produção de íons secundários dependerem especificamente de parâmetros como a pulverização catódica e a probabilidade de ionização dos analitos, que são consequências diretas das características inerentes ao material em análise e dos íons primários utilizados (SENONER e UNGER, 2012).

#### **2.4.2.2 Dessorção a laser assistida por matriz - MALDI**

O imageamento químico por espectrometria de massas utilizando a técnica de dessorção a laser assistida por matriz (MALDI MSI) é uma das mais versáteis abordagens para a análise de biomoléculas *in situ* (HILLENKAMP et al., 1987; TANAKA et al., 1988; ENTHALER et al., 2013). Embora o conceito de imageamento molecular tenha sido introduzido há mais de 50 anos, inicialmente utilizando a técnica SIMS-MSI (CASTAING e SLODZIAN, 1962; LIEBL, 1967), a disseminação das aplicações biológicas e clínicas para MSI se deram após a introdução da técnica de MALDI MSI por Caprioli e colaboradores em 1997 (CAPRIOLI, FARMER e GILE, 1997). Essa técnica – também chamada de MALDI *imaging* – é caracterizada por permitir o estudo molecular de amostras biológicas complexas, tais como secções de tecido e por possibilitar a análise tanto de moléculas de baixa massa molecular como de alta massa molecular, tais como proteínas com massas maiores do que 100 kDa (CAPRIOLI, FARMER e GILE, 1997; SEELEY e CAPRIOLI, 2008; SCHWAMBORN e CAPRIOLI, 2010a).

A técnica de MALDI MSI é baseada na utilização de laser para dessorver e ionizar os analitos misturados à solução de matriz, que auxilia extraindo os analitos e é fundamental nos processos de dessorção e ionização, como descrito anteriormente na seção de espectrometria de massas (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Resumidamente, o processo de ionização é influenciado pelas propriedades químicas dos analitos, da matriz e pela absorção da energia

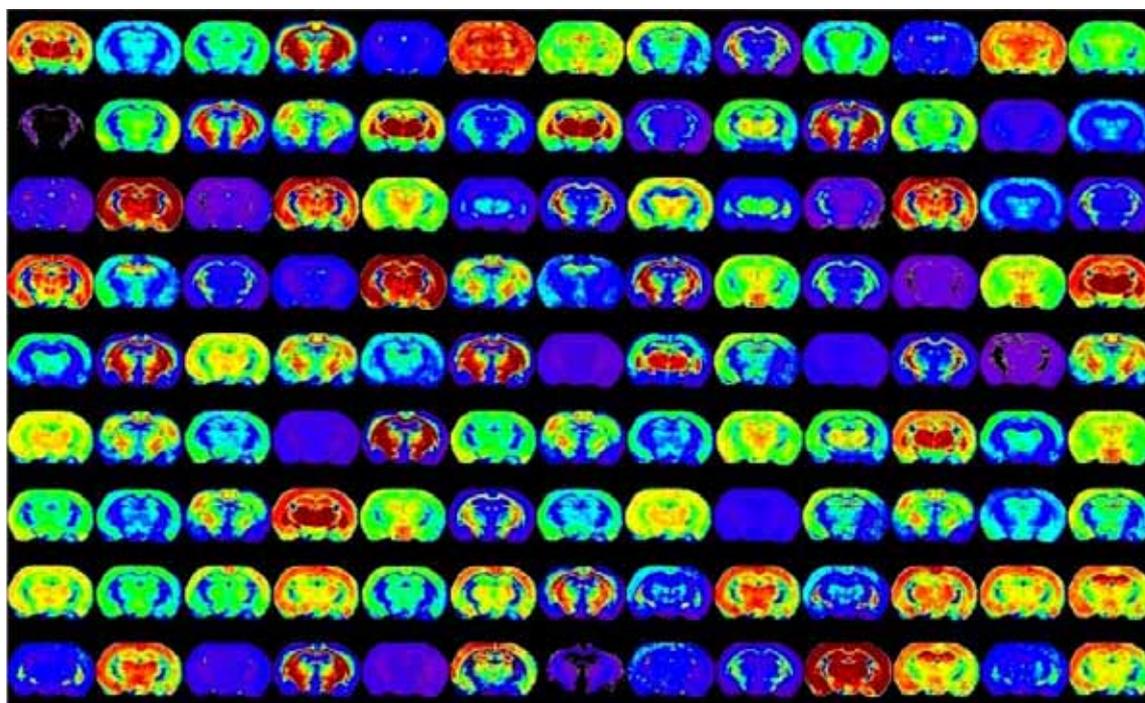
do laser; os analitos são desorvidos e ionizados para a fase gasosa (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Para o imageamento químico por MALDI, a matriz é aplicada na amostra biológica que foi colocada sobre a superfície plana de uma placa. Os dados de espectrometria de massa são adquiridos pela análise direta do tecido, realizada através da varredura da amostra por um feixe de laser, utilizando um padrão de linhas (resolução) com um número predefinido de disparos de laser por coordenada. O processo completo de funcionamento do MALDI e seu mecanismo de ionização foram descrito em detalhes em várias revisões (KARAS e KRUGER, 2003; JASKOLLA e KARAS, 2011).

O imageamento químico por MALDI oferece inúmeras vantagens em relação às demais técnicas de imageamento desenvolvidas até o momento, o que a torna ideal para a análise de amostras biológicas. Primeiro, MALDI é caracterizada como uma técnica de ionização suave, o que permite a análise de uma ampla variedade de massas moleculares (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Segundo, os espectros de massa MALDI são compostos predominantemente de relações  $m/z$  de moléculas monoprotonadas, o que simplifica a análise de misturas complexas de proteínas (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Terceiro, a dessorção e ionização são realizadas utilizando-se um laser, o que permite a realização de análises direcionadas a regiões distintas e muito específicas da amostra ao direcionar o feixe de laser direto para essas regiões – abordagem denominada de imageamento químico direcionado por histologia (CORNETT et al., 2006). Por último, a capacidade dos instrumentos modernos de análise de massas tem aumentado muito nos últimos anos, devido à utilização de uma variedade de analisadores de massas com maior resolução de massa, velocidade e sensibilidade (JONES et al., 2013; NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

Experimentos de imageamento químico por MALDI podem ser realizados através de duas abordagens diferentes: *imaging* (STOECKLI et al., 2001) e *profiling* (CORNETT et al., 2006). No modo *profiling* os espectros de massa são obtidos apenas de pequenas áreas de interesse do tecido que são analisadas individualmente através da seleção dessas áreas por microscopia ou por outras modalidades de imagem (SCHWAMBORN e CAPRIOLI, 2010b; NORRIS e CAPRIOLI, 2013) – abordagem denominada de imageamento químico direcionado por histologia (CORNETT et al., 2006). Embora essa abordagem não produza mapas moleculares de todo o tecido, ela produz dados moleculares de regiões específicas, o que reduz muito o tempo de aquisição e o tamanho dos dados gerados. O modo *profiling* é utilizado normalmente para análises de tecidos heterogêneos no qual apenas uma determinada região ou grupos de células específicas (como por exemplo, células cancerosas e células normais) são de interesse primordial (SCHWAMBORN e CAPRIOLI, 2010b).

Na abordagem *imaging*, por outro lado, é medida a distribuição total dos analitos através de todo o tecido seccionado. Nesse modo pode ser gerados mapas de distribuição de valores de  $m/z$  de interesse, cujas distribuições são correlacionadas com características histológicas da amostra (SCHWAMBORN e CAPRIOLI, 2010b). O conjunto de dados completo é composto por milhares de valores de  $m/z$ , e a intensidade de cada íon pode ser plotada utilizando-se uma escala de cores. Nessa abordagem, o conjunto resultante das imagens dos íons pode ser utilizado para retratar com precisão a distribuição espacial das moléculas que compõem a amostra (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). A Figura 6 mostra as imagens selecionadas a partir de um único experimento de MALDI MSI em uma secção de cérebro de rato; a elaboração de mais de 100 imagens moleculares demonstra a elevada especificidade da técnica de discriminar valores de  $m/z$  únicos.

**Figura 6.** Conjunto de imagens oriundas de MALDI MSI. As imagens representadas abaixo são oriundas de uma única varredura de secção de cérebro de rato. Cada imagem é a representação de um único valor de  $m/z$ , que tem uma distribuição singular no cérebro; essas imagens representam menos de 10 % das imagens criadas pelos autores, demonstrando a complexidade dos dados gerados pela técnica (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).



Fonte: NORRIS e CAPRIOLI (2013).

#### 2.4.2.2.1 Preparação de amostra

Em um experimento de MALDI MSI um dos passos mais importantes é a preparação de amostra, uma vez que esse processo interfere diretamente na boa qualidade dos espectros de massa e na reprodutibilidade (SEELEY e CAPRIOLI, 2008); a otimização desse processo implica diretamente no aumento da sensibilidade e na resolução espacial para analitos específicos de interesse (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Os passos mais comuns da preparação de amostra para experimentos de MSI são: a manipulação da amostra (aquisição, armazenamento, secção e montagem da lâmina), coloração (seleção da técnica histoquímica), tratamento do tecido (processo de lavagem da lâmina e digestão do tecido) e a aplicação de matriz (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

Experimentos de imageamento químico por MALDI começam com a coleta da amostra. De modo diferente da maioria das tecnologia analíticas que levam em consideração a preservação molecular ou a integridade histológica da amostra, na técnica MALDI MSI ambas as propriedades são importantes (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Quanto a preservação da amostra, o tempo é um fator extremamente importante, portanto é necessário minimizar o máximo possível o tempo entre a coleta da amostra e a preservação correta da mesma. Falhas na preservação expõe a amostra a mudanças na morfologia celular devido a degradação enzimática dos analitos, podendo comprometer a análise do tecido (FRANZEN et al., 2003; FERRER et al., 2007; SKOLD et al., 2007; CRECELIUS et al., 2008).

O primeiro processo para a preservação da amostra é o congelamento da mesma, expondo o tecido a uma substância criogênica, tal como nitrogênio líquido, pentano líquido ou gelo seco. Nas condições de congelamentos a temperaturas abaixo de  $-80^{\circ}\text{C}$  grande parte das amostras biológicas podem ser armazenadas por um ano, sem que ocorra diminuição na qualidade dos dados de MALDI MSI (SCHWARTZ, REYZER e CAPRIOLI, 2003; LEMAIRE et al., 2006); todavia, as amostras biológicas variam muito, e o teste para assegurar que as condições de armazenamento estabilizem adequadamente a amostra é recomendado (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

O próximo passo na preparação da amostra é a secção dos tecidos obtidos. O processo de secção dos tecidos é muito simples, todavia existem algumas peculiaridades para a análise de MALDI MSI, em especial quanto a temperatura e a espessura do corte que são fundamentais para a produção de secções de alta qualidade para o imageamento químico. As secções dos tecidos são realizadas normalmente entre 3 a 20  $\mu\text{m}$ , dependendo da amostra, o que garante que a maioria das células sejam rompidas pela lâmina do criostato expondo o conteúdo celular para ser extraído e analisado (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Assim como a espessura, a temperatura para a secção dos tecidos também varia significativamente de acordo

com o tecido a ser analisado; tecidos com o fígado e linfonodo são seccionados normalmente a  $-14^{\circ}\text{C}$ , já secções em tecido adiposo são realizadas a  $-30^{\circ}\text{C}$  ou menos (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

As secções de tecidos podem ser montadas por descongelamento em superfícies sólidas, que são arrefecidas até a mesma temperatura de secção do tecidos, e posteriormente, aquecidas lentamente pelo lado de baixo ainda dentro do criostato. Esse processo auxilia para que haja alterações mínimas no tecido e uma boa qualidade dos espectros; a omissão desse processo fará com que condense água na placa assim que ela for removida do criostato, prejudicando a qualidade das análises e a integridade do tecido. É importante ressaltar que a maioria dos espectrômetros de massa do tipo MALDI-ToF requerem que a lâmina utilizada para o suporte do tecido (normalmente metálica) seja condutiva elétrica, para que possa ser aplicado o potencial elétrico necessário para acelerar os íons para o analisador de massas (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

Após os passos iniciais de manipulação da amostra, pode-se empregar um passo opcional no processo de MALDI MSI: a coloração histológica. Esse abordagem auxiliar na correlação da localização dos analitos encontrados após a aquisição dos dados de MALDI MSI contra os dados de morfologia do tecido, para que possa ser realizado correspondência entre os resultados moleculares e a morfologia do tecido (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). O método mais comum utilizado para a localização das regiões de interesse é a realização de secções seriais, seguido pela correspondência entre as secções utilizando-se pontos de referência que se encontram tanto no tecido que foi realizado a coloração histológica quanto no tecido que será submetido a análise por MS (CORNETT et al., 2006). Uma vez que a secção submetida a coloração histológica é analisada por técnicas de microscopia, esses dados são correlacionados com a secção não corada a fim de transferir as coordenadas obtidas para auxiliar no processo de aplicação de matriz e análise do tecido (CORNETT et al., 2006). Apesar de ser opcional, a realização de coloração histológica é quase sempre necessária para que se possa marcar com confiança as regiões do tecido que são de interesse.

Após a montagem das lâminas o material a ser analisado pode ser submetido a pouco ou nenhum pré-tratamento de amostra antes da aplicação de matriz, com a finalidade de favorecer a análise dos analitos de interesse (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Ganhos significativos em sensibilidade e reprodutibilidade podem ser obtidos através da adaptação do protocolo de pré-tratamento da amostra aos analitos de interesse. Os passos mais comuns de pré-tratamento são a lavagem das lâminas para a remoção de sais, lipídeos e contaminantes, e a digestão *in situ*.

Tecidos biológicos são caracterizados por conter um grande número e uma enorme variedade de espécies química, variando em concentração em diferentes ordens de grandeza. Essa característica faz com que as espécies químicas mais abundantes no tecido possam causar problemas para a medição de alta sensibilidade de analitos menos abundantes, como, por exemplo, sais e lipídeos que podem afetar negativamente a análise de proteínas e peptídeos (CASTAING e SLODZIAN, 1962; BORNSEN, 2000; GOODWIN, PENNINGTON e PITT, 2008). Dentre os aspectos que afetam negativamente a análise temos a cristalização não homogênea, a supressão de íons de interesse e a formação de aductos na fase gasosa (NORRIS e CAPRIOLI, 2013); tais problemas podem ser superados com a aplicação de protocolos otimizados de lavagem dos tecidos.

Em uma preparação ideal, o procedimento de lavagem deve remover todas as espécies químicas do tecido que sejam indesejadas sem afetar as moléculas de interesse. O procedimento mais comum utilizado para a análise MALDI MSI de proteínas é o processo de fixação e desidratação em altas concentrações de etanol (SCHWARTZ, REYZER e CAPRIOLI, 2003; CHAURAND et al., 2004; CHAURAND et al., 2006; AERNI, CORNETT e CAPRIOLI, 2006; SEELEY et al., 2008). Caprioli e colaboradores utilizam como protocolo padrão uma lavagem com etanol 70%, seguido por uma lavagem com etanol 90% e uma última de etanol 95%, durante 30 segundos em cada solução; esse protocolo gera a menor deslocalização das proteínas e melhora significativamente a relação sinal/ruído dos espectros de massa para as amostras testadas (SCHWARTZ, REYZER e CAPRIOLI, 2003).

Procedimentos de lavagens das lâminas também são utilizados para a análise de moléculas de baixa massa molecular, tais como peptídeos (GROSECLOSE et al., 2007; ANDERSSON et al., 2008; HANRIEDER et al., 2011; LJUNGDAHL et al., 2011) e lipídeos (WANG, LIU e WU 2011; ANGEL et al., 2012; WANG et al., 2012). Tem sido demonstrado, por exemplo, que lavagens em diferentes concentrações de etanol são úteis para a remoção de lipídeos, enquanto preserva a organização espacial de neuropeptídeos relacionados com a doença de Parkinson (ANDERSSON et al., 2008; HANRIEDER et al., 2011; LJUNGDAHL et al., 2011).

Um outro passo comum do pré-tratamento de amostra é a digestão *in situ*, no qual é realizada a digestão das proteínas presentes na superfície do tecido. Esse procedimento pode, em muitos casos, melhorar a análise das proteínas através da análise dos peptídeos oriundos da digestão. Essa abordagem envolve normalmente a aplicação da solução de tripsina no tecido, utilizando-se impressoras químicas ou equipamentos de sprays, seguido pela incubação do tecido em um ambiente úmido a elevada temperatura (37–50°C) por tempo

suficiente para a reação de digestão ocorrer – aproximadamente 2 horas (GROSECLOSE et al., 2007; GUSTAFSSON et al., 2010; CASADONTE e CAPRIOLI, 2011). Uma vez que a digestão *in situ* foi realizada, é aplicada matriz sobre o tecido para facilitar a análise dos fragmentos peptídicos produzidos.

O passo que procede a montagem das lâminas ou o pré-tratamento de amostra, caso este seja necessário, é a aplicação de matriz, que auxilia no processo de dessecamento e ionização dos analitos (KARAS e KRUGER, 2003; JASKOLLA e KARAS, 2011). A escolha da matriz desempenha um papel crucial para o sucesso da análise de um analito específico (NORRIS e CAPRIOLI, 2013; GUSTAFSSON et al., 2011). As matrizes têm sido desenvolvidas para uma variedade de classe de moléculas, e cada uma tem pontos positivos e negativos tanto para a preparação de amostra, quanto para a classe de analitos para a qual elas foram otimizadas. Dentre as matrizes mais comumente utilizadas em MALDI MSI temos o ácido sinapínico (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) (BEAVIS E CHAIT, 1989) utilizado para análise de proteínas; o DHB (ácido 2,5-diidroxibenzóico) (STRUPAT, KARAS e HILLENKAMP, 1991) e o CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxibenzóico) (BEAVIS, CHAUDHARY e CHAIT, 1992) utilizados para análise de proteínas, peptídeos, lipídeos e drogas. Temos, também, outras matrizes menos utilizadas, tais como o 3-HPA (ácido 3-hidroxipicolínico) utilizados para análise de peptídeos e oligonucleotídeos (THOLEY e HEINZLE, 2006; TANG, ALLMAN e CHEN, 1993; PAN et al., 2007); o THAP (4,6-trihidroxiacetofenona) utilizada para análise de lipídeos, oligonucleotídeos e drogas (PAPAC, WONG e JONES, 1996; THOLEY e HEINZLE, 2006); o DHA (GORMAN, FERGUSON e NGUYEN, 1996; THOLEY e HEINZLE, 2006) e o DAN (THOMAS et al., 2012) utilizada para análise de lipídeos.

O sistema de solvente na aplicação de matriz desempenha um papel muito importante na preparação da amostra para análise. Em uma análise de MALDI MS convencional, os analitos são preparados através da mistura da solução de analito com a matriz e, posteriormente, é realizado a secagem da mistura para o estado cristalino, antes da irradiação do laser (BEAVIS e CHAIT, 1996; COHEN e CHAIT, 1996); todavia, esse método não é aplicado facilmente a análise de tecidos (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Normalmente, no imageamento químico por MALDI a secção do tecido contendo os analitos é montada na placa do MALDI antes da aplicação da matriz (NORRIS e CAPRIOLI, 2013), embora existam metodologias inovadoras na qual a aplicação de matriz é realizada antes da montagem das lâminas (YANG e CAPRIOLI, 2013). Nas condições convencionais, para que ocorra a

cocristalização entre os analitos e a matriz é necessário que a solubilidade dos analitos e os solventes utilizados sejam compatíveis, promovendo a mistura e cristalização de ambos.

Dentre os solventes mais comuns utilizando em MALDI MSI temos o etanol, metanol, acetonitrila e água, normalmente na presença de ácidos (tais como o ácido trifluoracético). A escolha do solvente para a aplicação da matriz causa diferenças significativas nas propriedades de cristalização no tecido (COHEN e CHAIT, 1996; BORNSEN, 2000); de modo geral, alguns dos fatores que influenciam na formação dos cristais é a concentração de lipídeos e sais, e a presença de alguns aditivos à solução de matriz, como o ácido acético ou o ácido trifluoracético (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). A aplicação de matriz deve produzir uma camada uniforme de cristais de matriz, de modo que haja densidade de cristais suficientes no tecido para permitir a análise da superfície sem que ocorra ausência de sinais em algumas regiões.

De modo similar a escolha da matriz ou dos solventes a serem utilizados, o método de deposição de matriz também é determinante em um experimento de MALDI MSI (GUSTAFSSON et al., 2011). Dentre os métodos de aplicação de matriz temos a utilização do *spray* manual, que é o sistema mais barato e mais fácil de ser aplicado nos laboratórios (GUSTAFSSON et al., 2011; NORRIS e CAPRIOLI, 2013). O dispositivo mais utilizado para a pulverização manual é um pulverizador de vidro. A matriz é mantida em um reservatório, e o tecido é levemente pulverizado, ficando minimamente umedecido em cada pulverização. Após a secagem da matriz na superfície o processo é repetido de 10 a 20 vezes, até que haja matriz suficiente para a análise dos analitos. Dentre as desvantagens dessa técnica podemos ressaltar a subjetividade do processo, uma vez que a preparação da amostra é manual, dificultando a padronização da preparação através de várias amostras e laboratórios (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Nesse processo, o excesso do umedecimento do tecido, ou alterações nas condições de secagem da matriz entre os passos, tais como mudanças na umidade atmosférica e temperatura, podem levar a deslocalização dos analitos e diminuição na qualidade das imagens (SCHWARTZ, REYZER e CAPRIOLI, 2003).

Um outro método de deposição de matriz é a pulverização por dispositivos robotizados. Esse processo faz com que a matriz seja aplicada sobre o tecido de modo automático e controlado. Dentre os instrumentos presentes no mercado mais comumente utilizados para pulverização robotizada temos o ImagePrep (Bruker Daltonics) (SCHUERENBERG et al., 2007a; SCHUERENBERG et al., 2007b; RAUSER et al., 2010) e o TM Sprayer (HTX Technologies) (NYE, NORRIES e NICKERSON, 2006). O princípio básico de funcionamento desses instrumentos é o mesmo, baseado na aplicação de um *spray* de

matriz na forma de aerossol ou de uma névoa muito fina que se deposita sobre a superfície do tecido. A camada de matriz que se forma é submetida ao processo de secagem, e novos passos de pulverização são realizados até que haja matriz suficiente para um análise bem sucedida. Esses equipamentos, apesar de serem caros e dependerem da experiência dos usuário, supera algumas desvantagens do sistema manual, uma vez que as condições de nebulização podem ser sistematicamente ajustados afim de otimizar o processo (NORRIS e CAPRIOLI, 2013). Após a otimização do processo para um determinado tecido, essas condições podem ser aplicadas para outras amostras e uma boa reprodutibilidade pode ser obtida (NORRIS e CAPRIOLI, 2013).

Hankin e colaboradores (2007) descreveram um método alternativo para a aplicação de matriz utilizando a sublimação, empregado para a análise de lipídeos. Utilizando a sublimação é possível criar uma cobertura uniforme de matriz sobre a amostra. Essa técnica permite a obtenção dos menores cristais dentre as técnicas de deposição de matriz, sendo ideal para a criação de imagens com alta resolução espacial. Todavia, esse processo leva a uma incorporação deficitária de moléculas grandes tais como proteínas, uma vez que o tecido é exposto a pouco solvente para extrair os analitos (GUSTAFSSON et al., 2011). Como resultado, essa técnica é normalmente empregada para o imageamento de moléculas pequenas tais como lipídeos e metabólitos (HANKIN, BARKLEY e MURPHY 2007; DEKKER et al., 2009; GUSTAFSSON et al., 2011).

Processos ainda mais sofisticados de deposição de matriz são conseguido através da espotagem automática de matriz utilizando-se impressoras químicas. Esses equipamentos permitem o controle do espaçamento entre as gotas, definindo melhor resolução da imagem. Na literatura podem ser encontrados diversos equipamentos que são adaptados para a aplicação de matriz, como impressoras comuns de jato de tinta (BALUYA, GARRETT e YOST, 2007), todavia existem equipamentos disponíveis no mercado que são dedicados a esse propósito, tais como o Portrait 630 Spotter (Labcyte, Inc.) (AERNI, CORNETT e CAPRIOLI, 2006) e a ChIP-1000 (*Chemical Inkjet Printer*) (Shimadzu Scientific Instruments) (FRANCK et al., 2009). Os equipamentos comerciais dedicados a espotagem de matriz combinam *scanners* com *softwares* que podem ser utilizados para controlar a região específica de deposição de matriz, bem como a quantidade de solução a ser depositada.

A impressora química ChIP-1000 foi adaptada para a utilização com diversos tipos de matrizes (SUGIURA, SHIMMA e SETOU, 2006; GROSECLOSE et al., 2007; GROSECLOSE et al., 2008; ANDERSSON et al., 2008; GUSTAFSSON, MCCOLL e HOFFMANN, 2008; DELVOLVE e WOODS, 2011). Esse equipamento apresenta um

reservatório para soluções que localiza-se no topo do dispensador; gotículas que variam de 100 a 200 pL em volume são dispensadas através da utilização de força (pressão) que geram um fluxo de corrente através do material piezoelétrico. Esse sistema garante que os experimentos de imageamento químico *in situ* sejam realizados de modo automatizado e com elevada reprodutibilidade. A principal desvantagem desse sistema é que o orifício de saída de solvente que se encontra na ponta do *piezo* pode entupir com cristais de matriz, em especial quando soluções concentradas de matriz são utilizadas, o que faz com que seja necessário a limpeza frequente e completa do sistema.

Após essas etapas de preparação de amostra é realizado a aquisição dos dados através de espectrômetros de massas e análise dos dados gerados por meio do uso de ferramentas de bioinformática.

#### **2.4.2.2 Aplicações**

Por décadas, a coloração histológica e a imunoistoquímica (IHC) foram as principais ferramentas para visualizar e entender a morfologia e estrutura dos tecidos biológicos. Através da IHC, por exemplo, a distribuição espacial de proteínas específicas *in situ* pode ser obtida. Todavia, é necessária a utilização de anticorpos específicos para cada proteína, e uma análise multicomplexa é extremamente dificultada, de modo que raramente são visualizadas mais de duas proteínas simultaneamente. Com o advento da tecnologia de imageamento químico por MALDI foi possível produzir imagens que representam visualmente a distribuição química *in situ* de diferentes moléculas, tais como lipídeos, proteínas, peptídeos, drogas, metabólitos, dentre outras, em uma ampla gama de tecidos. Desde a introdução dessa tecnologia há mais de uma década as aplicações da técnica para o estudo biológico e clínico têm crescido exponencialmente.

Originalmente desenvolvida por Caprioli e colaboradores em 1997 (CAPRIOLI, FARMER e GILE, 1997), a técnica MALDI MSI foi empregada para o estudo de proteínas e peptídeos em glândula pituitária e pâncreas de rato. Após a introdução da técnica, muitos estudos vêm sendo realizados para a análise de proteínas e peptídeos nas mais diversas estruturas e tipos de organismos. Chaurand e colaboradores (2003), por exemplo, utilizaram a técnica para identificar proteínas em regiões específicas do epidídimo de rato que possam estar envolvidas com a maturação dos espermatozoides; nesse estudo mais de 400 proteínas foram monitoradas, das quais mais de 50 foram identificadas.

Dentre as aplicações da técnica podemos citar, também, a utilização do imageamento molecular para o estudo da fisiologia molecular do olho, que tem trazido grandes contribuições para o melhor entendimento do órgão. Han e Schey (2006) estudaram o proteoma do olho utilizando a técnica MALDI MSI. Foi possível identificar uma variedade de modificações pós-traducionais nas proteínas do cristalino que ocorrem ao longo dos anos; com a idade, proteínas modificadas podem acumular-se no olho e ser correlacionadas com diversas condições clínicas, tais como a formação de catarata (HAN e SCHEY, 2006; GREY e SCHEY, 2009).

Atualmente, um dos principais focos do imageamento de proteínas através da técnica de MALDI MSI tem sido para estudos oncológicos. Nesse contexto, basicamente três diferentes tipos de estudo podem ser distinguidos: estudo diagnóstico comparando diferentes tipos de tecido (como, por exemplo, tecido tumoral e tecido sadio) visando auxiliar no diagnóstico patológico; estudos prognósticos; e estudos de resposta a drogas, que visam prever a resposta de um paciente a um determinado tratamento. Através da técnica MALDI MSI diversos estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar o perfil protéico em diferentes tipos e graus de tumores, incluindo: tumores cerebrais (SCHWARTZ et al., 2005), oral (PATEL et al., 2009), pulmonar (YANAGISAWA et al., 2003; GROSECLOSE et al., 2008), mamário (RAUSER et al., 2010; BAUER et al., 2010), gástricos (ZAIMA, MATSUYAMA e SETOU 2010), pancreático (DJIDJA et al., 2009), renal (OPPENHEIMER et al., 2010), ovariano (LEMAIRE et al., 2007; KANG et al., 2010) e de prostate (CAZARES et al., 2009). Esses estudos estão, em sua maioria, focados na identificação de assinaturas moleculares das doenças ou do grau dos tumores.

Estudos realizados utilizando o imageamento por MALDI MS tem revelado a diferença de expressão de proteínas entre o tecido tumoral e o tecido normal imediatamente adjacente (HERRING, OPPENHEIMER e CAPRIOLI, 2006; CALDWELL et al., 2006). Nesses estudos, a avaliação das amostras de carcinoma de células renais (ccrCC – *Clear cell renal cell carcinoma*), contendo o tumor e tecido adjacente normal na mesma secção, revelaram alterações moleculares no tecido normal (adjacente ao tumor) semelhantes as alterações encontradas no próprio tumor (OPPENHEIMER et al., 2010). Como exemplo, proteínas envolvidas com o sistema de transporte de elétron mitocondrial, tal como o citocromo C, estava consideravelmente subexpresso tanto no tecido tumoral quanto no tecido adjacente histologicamente normal. Esses resultados, juntamente com dados estatísticos que demonstram a alta reincidência de ccrCC em pacientes operados, sugerem que os métodos histológicos convencionais utilizados para determinar as margens do tumor estão

ultrapassados. Tem sido sugerido, também, que existe uma população de células no microambiente do tumor que estão submetidas à transformação maligna em algum nível, mas que ainda não sofreram modificação histológica total. De modo geral, esses estudos demonstram a aplicação da técnica no estudo diagnóstico entre tecidos tumorais e saudáveis, visando auxiliar na avaliação molecular das margens cirúrgicas do tumor.

Uma das abordagens recentes na pesquisa de câncer é a determinação do nível de HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) em tecidos tumorais (RAUSER et al., 2010; BALLUFF et al., 2010). Desde 2006, a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e o *College of American Pathologists* (CAP) recomendam que o nível da proteína HER2 sejam determinados para todos os tipos de câncer de mama invasivos (WOLF et al., 2007). A expressão da proteína HER2 caracteriza uma população de pacientes que apresentam alta probabilidade de responder ao tratamento com trastuzumab (Herceptin®). Os dois testes para medir os níveis da proteína HER2, IHC e hibridação fluorescente *in situ* (FISH), são eficientes, todavia, esses métodos sofrem uma interpretação subjetiva, são caros e demorados de serem realizados. Utilizando a tecnologia de imageamento molecular por MALDI, os pesquisadores conseguiram caracterizar os níveis da proteína HER2 em tumores mamários e gástricos diretamente de seções do tecido. Através dessa abordagem foi possível, também, construir um modelo para a classificação de tumores de mama baseado no nível de HER2 (RAUSER et al., 2010). Esse modelo, baseado na utilização dos espectros de massa oriundos do imageamento químico, classificou os tumores estudados com 83% de sensibilidade e 92% de especificidade. Esses estudos demonstram a aplicação da técnica no estudo de resposta a drogas, no estudo da progressão e classificação de tumores.

Desde o desenvolvimento da técnica MALDI MS, esta vem sendo amplamente utilizada para a análise de proteínas e de compostos com alto peso molecular devido à interferência dos sinais da matriz na região de baixa massa. Recentemente, um grande número de compostos químicos utilizados como matrizes vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de ionizar pequenas moléculas, superando antigas limitações da técnica MALDI MS. Nesse contexto, diversos trabalhos utilizando novas matrizes e estratégias diferentes vêm sendo descritos. Shanta e colaboradores (2012), por exemplo, desenvolveram um método analítico que permite a análise de drogas e metabólitos em fígado, rim e cérebro de ratos tratados com donepezil; foi possível criar imagens para alguns aminoácidos (alanina, treonina, metionina, e triptofano) e algumas drogas, incluindo gefitinib e donepezil. Através do imageamento molecular foi possível observar a presença da droga donepezil, utilizada no tratamento da doença de Alzheimer, intacta na região cortical do cérebro, após 60 minutos da administração

oral. Esses resultados comprovaram que esse medicamento pode efetivamente atingir seu local alvo, e estar ativo 60 minutos após a administração.

Utilizando uma abordagem semelhante, Ye e colaboradores (2013) utilizaram a técnica MALDI MSI para estudar a distribuição de metabólitos em raízes e nódulos radiculares durante a fixação de nitrogênio na simbiose *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium melilotisymbiosis*. A fixação biológica eficiente de nitrogênio depende dos metabólitos produzidos e trocados entre ambos os organismos (YE et al., 2013a). Através da técnica foi possível observar a distribuição de uma grande variedade de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, lipídeos, flavonoides, dentre outras moléculas. Com esse estudo foi possível observar diferenças na distribuição de metabólitos entre as raízes e os nódulos, e, também, entre nódulos que realizavam e que não realizavam a fixação de nitrogênio produzida pela interação entre a planta e bactérias mutantes. De modo geral, esses estudos demonstram os benefícios da utilização da técnica na obtenção de informações valiosas sobre a identidade e distribuição espacial de uma ampla gama de moléculas em diferentes organismos.

#### **2.4.2.2.3 MALDI *imaging* na neurociência**

O sistema nervoso é caracterizado por manter a sua funcionalidade através de inúmeras substâncias químicas que orquestram os processos neurobiológicos. Tanto processos biológicos complexos quanto processos patológicos no sistema nervoso envolvem a translocação de um grande número de compostos químicos. O monitoramento da dinâmica espaço-temporal dos processos bioquímicos em curso é, portanto, essencial para aprofundar a nossa compreensão de mecanismos biológicos complexos. Nesse contexto, a técnica MALDI MSI, que permite a análise química de tecidos com uma alta especificidade e alta resolução espacial, emerge como uma tecnologia analítica de grande potencial para a investigação de processos moleculares no campo da neurociência.

Atualmente, a técnica de MSI vem sendo aplicada para o estudo de diferentes substâncias químicas, visando investigar os mais diversos mecanismos neurobiológicos existentes. Sugiura e colaboradores (2011), por exemplo, utilizaram a técnica de MALDI MSI no estudo de metabólitos para investigar o metabolismo energético na região do hipocampo em cérebro de rato. Foram analisados os padrões de distribuição do ATP (trifosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina) e AMP (monofosfato de adenosina) em neurônios do hipocampo, assim como as mudanças na concentração relativa e distribuição dessas moléculas em ratos com convulsão induzida por Kainate (potente estimulador do

sistema nervoso central). Os resultados demonstram uma redução considerável dos níveis de ATP e ADP (especialmente em células da camada CA3), e uma diminuição na recuperação da energia após as convulsões, sugerindo um metabolismo específico das células CA3. Nesse estudo, a abordagem MALDI MSI revelou com sucesso a relação espaço-temporal do metabolismo energético no hipocampo de ratos com uma resolução celular, quantitativa e qualitativamente.

A técnica MSI também foi utilizada no estudo lipídeos. A importância dos lipídeos em mecanismos neurofisiológicos, tais como a sinalização de lipídeos biogênicos ou a modulação da curvatura da membrana em processos de comunicação celular, estão bem estabelecidos (INOUE et al., 2004; HANRIEDER et al., 2013). Nesse contexto, o imageamento molecular vem sendo utilizado para o monitoramento da produção localizada de lipídeo biogênico, lisofosfatidilcolina, em ratos submetidos à lesão (oclusão arterial) para a indução da isquemia cerebral (KOIZUMI et al., 2010). Outros estudos utilizando a técnica MSI vêm sendo aplicados para a investigação da regulação anormal de fosfolipídeos no córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia (MATSUMOTO et al., 2011), no estudo de edema cerebral (KOIZUMI et al., 2012), assim como no estudo de doenças neurodegenerativas, tais como a distrofia neuroaxonal infantil – doença de Seitelberger (BECK et al., 2011).

Na neurociência, o descobrimento, quantificação e mapeamento *in situ* de neuropeptídeos são de interesse central (HANRIEDER et al., 2013; NORRIS e CAPRIOLI, 2013), uma vez que essas moléculas constituem o maior e mais diverso grupo de sinalizadores endócrinos no sistema nervoso, responsáveis por diversos processos fisiológicos essenciais (JIA et al., 2012; YE et al., 2013b). O mapeamento da distribuição espacial dessas biomoléculas por MALDI MSI têm sido alvo de diversos estudos (KUTZ, SCHMIDT e LI, 2004; DEKEYSER et al., 2007; CHEN et al., 2009b; HERBERT et al., 2010; HANRIEDER et al., 2011; LJUNGDAHL et al., 2011; HUI et al., 2011; ZIMMERMAN, RUBAKHIN e SWEEDLER, 2011; CHANSELA et al., 2012; HANRIEDER, LJUNGDAHL e ANDERSSON, 2012; YE, GREER e LI, 2012).

Muito desses trabalhos com neuropeptídeos só foram possibilitados através do desenvolvimento de metodologias para análise dessas biomoléculas descritas por Sweedler e colaboradores (KRUSE e SWEEDLER, 2003; RUBAKHIN et al., 2007). Em um estudo inicial, a técnica MALDI MSI foi empregada para o mapeamento de neuropeptídeos em tecidos neuronais do crustáceo *Cancer borealis* (DEKEYSER et al., 2007). Nesse estudo foram investigados isoformas peptídicas pertencentes a 10 diferentes famílias de neuropeptídeos, o que permitiu elucidar a relação entre múltiplas isoformas de neuropeptídeos

da mesma família, e a distribuição das diferentes famílias de neuropeptídeos no sistema nervoso do crustáceo *C. borealis*. Em estudo subsequente, foi realizado o imageamento químico tridimensional para lipídeos e neuropeptídeos no mesmo modelo animal (CHEN et al., 2009b). Recentemente, a técnica de MALDI MSI foi utilizada para identificar uma nova taquicinina no crustáceo *Callinectes sapidus* (HUI et al., 2011).

Andersson e colaboradores, por exemplo, têm explorado a técnica MALDI MSI para localizar e quantificar relativamente o peptídeo prodinorfina em ratos com discinesia induzida por L-DOPA (LID – L-DOPA-induced dyskinesia), em modelo experimental da doença de Parkinson (HANRIEDER et al., 2011; LJUNGDAHL et al., 2011). Devido à falta de anticorpos específicos para o estudo dos peptídeos oriundos da prodinorfina, os resultados obtidos por esses estudos realçam ainda mais a importância do imageamento molecular no estudo da dinâmica molecular em doenças neurobiológicas (LUNDBLAD et al., 2004; HANRIEDER et al., 2011; LJUNGDAHL et al., 2011; HANRIEDER, LJUNGDAHL e ANDERSSON, 2012).

Outro estudo recente utilizou o imageamento químico por MALDI na investigação da distribuição de várias famílias de neuropeptídeos, tais como as taquicininas, alatostatinas, *periviscerokinin*, piroquinina, FLRFamida e neuropeptídeos F na região do complexo central do sistema nervoso do inseto *Schistocerca gregaria* (HERBERT et al., 2010). Os resultados sugerem que a expressão e distribuição das diferentes famílias de neuropeptídeos estavam presentes de modo único no complexo central, e que diferentes níveis de expressão são encontrados nos diferentes estágios de desenvolvimento embriológico. Desse modo, esse estudo representa um importante passo na caracterização molecular do desenvolvimento do complexo central.

De modo geral, a contribuição da tecnologia de MSI aplicada à neurociência encontra-se esparsa. Essa área tem gerado um grande número de informações da distribuição química de biomoléculas, e, em geral, uma correlação com a função neurobiológica é difícil de ser realizada (HANRIEDER et al., 2013), muito embora existam vários exemplos de trabalhos que produziram informações valiosas utilizando a técnica. Não obstante o potencial da técnica tenha sido demonstrado com sucesso por inúmeros trabalhos, um grande número de desafios ainda precisa ser superado para que a tecnologia seja mais amplamente utilizada, facilitando a sua aceitação e conscientização na pesquisa em neurociência e biologia molecular. Em suma, o imageamento químico por espectrometria de massa é uma técnica poderosa com grande potencial para a investigação da dinâmica espaço-temporal dos processos bioquímicos em

curso nos sistemas neurobiológicos, e, embora ainda esteja em desenvolvimento, essa técnica mantém a promessa de inúmeras novas aplicações nas pesquisas neurocientíficas.

### 3 OBJETIVOS

Considerando as inúmeras aplicações da tecnologia emergente de MALDI MSI, bem como o seu elevado potencial para a análise investigativa de amostras complexas, os objetivos do presente estudo foram:

a) Desenvolver uma nova plataforma analítica para estudos de MALDI *Imaging* em tecidos animais, especificamente em cérebros de abelhas *A. mellifera*;

b) O estudo da distribuição espacial de alguns neuropeptídeos importantes fisiologicamente, presentes no cérebro de operárias *A. mellifera* com 20 dias de idade, que não exerceram o comportamento agressivo (indivíduos controle). Dentre os peptídeos, foram investigados, principalmente, os neuropeptídeos pertencentes às famílias das: allostatinas e taquicininas.

c) A análise da distribuição diferencial de peptídeos (allostatinas e taquicininas) com potencial neuroativo, no cérebro de indivíduos diretamente envolvidos no comportamento agressivo (indivíduos denominados “agressivos”, ou seja, que ferroaram um alvo experimental). Foram utilizadas abelhas de 20 dias de idade submetidas ao teste de agressividade de Stort (1974), para a estimulação do comportamento agressivo.

d) A formação de recursos humanos na área de desenvolvimento de novas tecnologias em imageamento molecular, com aplicações em Análise Proteômica e Peptidômica *in situ*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

Para o desenvolvimento de uma plataforma analítica de aquisição de imagens moleculares em tecidos animais, foram utilizadas secções do cérebro de abelhas da espécie *A. mellifera*, que são mantidas em um apiário no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), UNESP – Rio Claro. A colônia utilizada para os experimento apresentava-se livre de doenças, bem alimentadas e com uma rainha em franca postura.

Inicialmente, um favo da colônia livre de abelhas foi coletado e mantido em uma incubadora por 24 horas. Após esse período, todas as abelhas que nasceram foram marcadas com uma tinta atóxica de cor branca (Posca PC-5M, 1.8-2.5 mm) e devolvidas à colônia de origem e recoletadas após 20 dias para os testes de agressividade (defesa da colônia). Foram selecionadas abelhas de 20 dias, pois essa é a idade aproximada que algumas abelhas exercem a função de guarda, permanecendo na entrada da colônia com uma postura alerta típica (ZAYED e ROBINSON, 2012). As abelhas guardiãs que são alertadas por distúrbios físicos e encontros agonísticos, normalmente ferream o alvo e liberam feromônio de alarme, recrutando outras abelhas operárias para atuarem na defesa da colônia.

Para a estimulação do comportamento agressivo em abelhas foi utilizado uma adaptação do teste de agressividade de Stort (1974), que consiste na suspensão e movimentação de uma bola de camurça preta, com 2-3 cm de diâmetro, a uma distância de aproximadamente 5 centímetros da entrada da colônia. Esse teste estimula o comportamento agressivo das operárias guardiãs por simular a presença de um inimigo, incitando um ataque das abelhas à bola de camurça; após os ataques as abelhas permanecem presas ao alvo, através do ferrão que penetra no tecido de couro e não pode ser removido. O grupo de operárias responsáveis pelos ataques iniciais à bola de camurça foi coletado, sendo utilizadas nos estudos apenas as operárias marcadas com a tinta especial mencionada acima (com 20 dias de vida). Esse grupo de indivíduos foi considerado como “agressivo”. Como grupo controle foi utilizado abelhas da mesma idade, que não atacaram a bola de camurça – grupo denominado “não agressivo”.

### 4.2 Sequenciamento de neuropeptídeos

Para a confirmação da presença dos neuropeptídeos a serem estudados por imageamento químico (MALDI MSI), os cérebros foram macerados e extraídos em solução

de Acetonitrila (MeCN - grau HPLC) 50% (v/v) em água ultrapura, a fim de extrair preferencialmente os componentes peptídicos. Em seguida, o material solubilizado foi centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos em micro centrífuga (Centrífuga Eppendorf - 5415D).

Os neuropeptídeos extraídos foram analisados por um espectrômetro de massas do tipo LCMS-IT-ToF, através da injeção direta da amostra no equipamento.

O equipamento utilizado para a obtenção dos espectros de  $MS^2$  é equipado com fonte de ionização “*electrospray*” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas “*ion-trap*” e “*Time-of-Flight*” (IT-TOF) (Shimadzu). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento. O software LCMS solution (Shimadzu) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200° C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 200 a 2500, com uma resolução de aproximadamente 15000.

Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica em condições de dissociação induzida por colisão (CID) ( $MS^2$ ) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de  $MS^1$ , exceto a varredura que foi feita num intervalo entre 50 e 2500 m/z. Foi utilizado argônio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 msec no “*ion trap*”, utilizando-se energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz.

Os espectros de massas obtidos foram analisados primeiramente com as ferramentas do software LCMS solution (Shimadzu), utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Para a interpretação dos espectros foi realizado a subtração sucessiva dos picos, com a finalidade de se chegar a uma série de íons. Com a sequência encontrada em mãos utilizou-se o software MassLynx (v3.2) para verificação e validação da sequência obtida. Os cálculos realizados para a obtenção das sequências foram feitos utilizando uma tolerância de massa de 0,1 u.m.a.

### 4.3 Obtenções dos cortes de cérebro de *Apis mellifera*

A partir da obtenção dos tecidos frescos, eles foram seccionados utilizando-se um micrótomo por congelamento (LEICA, CM1850) para a aquisição de cortes de 14  $\mu\text{m}$  de espessura. Tais cortes foram obtidos no plano sagital da cabeça de cada operária, na região do eixo maior da capsula cefálica. Posteriormente, os cortes foram desidratados em álcool etílico 70% (v/v) e 95% (v/v), respectivamente, durante 10 segundos na primeira solução, e duas vezes por 30 segundos na segunda solução, com um intervalo de aproximadamente 30 segundos entre as desidratações sucessivas; tal processo possibilita a eliminação de componentes indesejáveis da amostra, tais como sais e lipídeos, que produzem ruído analítico prejudicando a ionização dos peptídeos (SEELEY et al., 2008). Esse procedimento foi padronizado após diversos testes para definir as condições experimentais ideais de manipulação e preparação de amostra para o tecido em questão.

### 4.4 Histoquímica

A coloração com hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para comparação do método histoquímico com a técnica de MALDI MSI e para a interpretação dos dados gerados. As lâminas foram submersas em etanol 95% (v/v) por vinte minutos, lavadas com água corrente sem deixar que o material se soltasse 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. Cortes subsequentes aos utilizados para a análise por MSI foram armazenados em lâminas de vidro para futuras comparações entre as imagens histoquímicas e moleculares. As histologias dos tecidos cerebrais corados com HE serviram de orientação para se traçar “mapas de contorno” de cada região do cérebro, para melhor descrever as localizações espaciais do neuropeptídeos detectados.

#### 4.5 MALDI *imaging* revelando o perfil protéico dos tecidos via digestos trípticos

Para a análise de proteínas foi realizado a secagem do tecido a vácuo durante 15 minutos, posteriormente, realizou-se a deposição automática de uma solução de tripsina por meio da impressora química ChIP-1000 (Shimadzu). Com este equipamento foi programado a preparação da amostra num microarranjo de 484 pontos/mm<sup>2</sup>, onde cada ponto de aplicação de amostra foi espaçado um do outro por 200 µm de centro a centro, perfazendo cerca de 27 pontos/mm<sup>2</sup> de corte histológico. Em cada ponto foram aplicados 500 pL (5 gotas de 100 pL) de solução de tripsina/ciclo (12.5 pg/nL em tampão NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 8.0), sendo realizados 24 ciclos/ponto. Desta maneira, aplicou-se uma concentração total de 150 pg de tripsina/ponto. As secções dos tecidos foram então incubadas por 2 horas sob atmosfera úmida a 37 °C. Em seguida, aplicou-se a matriz de análises MALDI, constituída de uma solução de ácido cinâmico (CHCA) a uma concentração de 10 mg/mL em solução acetonitrila 40% (v/v) e isopropanol 10% (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)]. A aplicação da matriz procedeu-se de maneira semelhante àquela descrita acima para a tripsina, perfazendo-se um volume total de 10 nL/ponto. Após a secagem da matriz sob vácuo durante 10 minutos, foram adquiridos os espectros MALDI-TOF.

Os espectros de MALDI MS foram obtidos no modo positivo por um instrumento MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu), equipado com um laser *SmartBeam* e controlado pelo *software* Launchpad v2.8 (Shimadzu), utilizando-se o dispositivo *reflectron*. Espectros de MALDI MS foram adquiridos no intervalo de m/z 700 – 4000, com um total de 250 disparos de laser/ponto de preparação da amostra.

Os disparos de laser foram efetuados a partir do centro de cada ponto, até uma distância de 100 µm em linha reta, com cerca de 100 disparos a cada movimento, perfazendo uma média de 250 disparos/ponto de preparação de amostra. Assim, foram realizados cerca de 121000 disparos de laser, sendo que para cada disparo, se adquiriu um espectro. Para obtenção dos espectros MS/MS foram utilizadas as seguintes condições experimentais: os valores de m/z dos picos de maior intensidade de cada espectro MS foram selecionados para aquisição de espectros MS/MS. Tipicamente, entre 250 e 500 disparos de laser foram utilizados para aquisição dos espectros CID, na faixa de valores de m/z 700 – 4000, com voltagem de aceleração de 20 kV, potência do laser ajustada para 80 %, e uma densidade de 50 picos a cada 200 Da, para aqueles picos que apresentaram uma relação S/N ≥ 10. Após a aquisição dos dados, as imagens moleculares foram reconstruídas a partir dos dados bruto,

utilizando-se tolerância de massa de  $\pm 0.3$  Da, com auxílio do software Launchpad v2.8 (Shimadzu).

#### **4.6 Identificações de Proteínas e Neuropeptídeos**

O *software* Launchpad v2.8 (Shimadzu) conectado ao Mascot 2.2.0.3 foi utilizado para submeter os dados utilizando o banco de dados de proteínas Swiss-Prot (UniProtKB). Os parâmetros de pesquisa que foram utilizados são: inexistência de restrições à massa molecular da proteína, uma perda de clivagem tríptica, modificação fixa de oxidação da metionina. O erro de tolerância utilizado nas buscas foi de 0,8 Da para os espectros de MS e de 0,5 Da para os espectros MS/MS. As proteínas identificadas por meio da busca no banco de dados foram submetidas ao software Scaffold (versão 2.04.00, Proteome Software Inc., Portland, OR) para a validação dos peptídeos identificados e para a verificação de falso-positivo (FDR – false discovery rate) inferior a 1 %. As identificações de proteínas foram atribuídas pelo algoritmo Protein Prophet, e aceitas se as probabilidades fossem  $\geq 99.0\%$  e pelo menos dois peptídeos fossem identificados. Os neuropeptídeos em suas formas nativas foram identificados pela interpretação manual dos espectros MS e MS/MS, obtidos em condições de CID.

#### **4.7 MALDI *imaging* revelando o perfil peptídico dos tecidos**

Para a análise dos neuropeptídeos (não oriundos da digestão enzimática) os cortes de tecido foram submetidos a um processo de secagem a vácuo durante 15 minutos e, posteriormente, foi realizado a deposição automática da matriz [solução contendo 10 mg/mL de ácido cinâmico (CHCA) em acetonitrila 40% (v/v) e isopropanol 10% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v)] por meio da impressora química ChIP-1000 (Shimadzu). O volume total de 10 nL de matriz foi aplicado em cada ponto, da mesma maneira já descrita acima para as análises de identificação de proteínas. Da mesma maneira, os neuropeptídeos foram identificados por suas sequências primárias características, utilizando o protocolo descrito no item 4.5, para o sequenciamento por espectros CID.

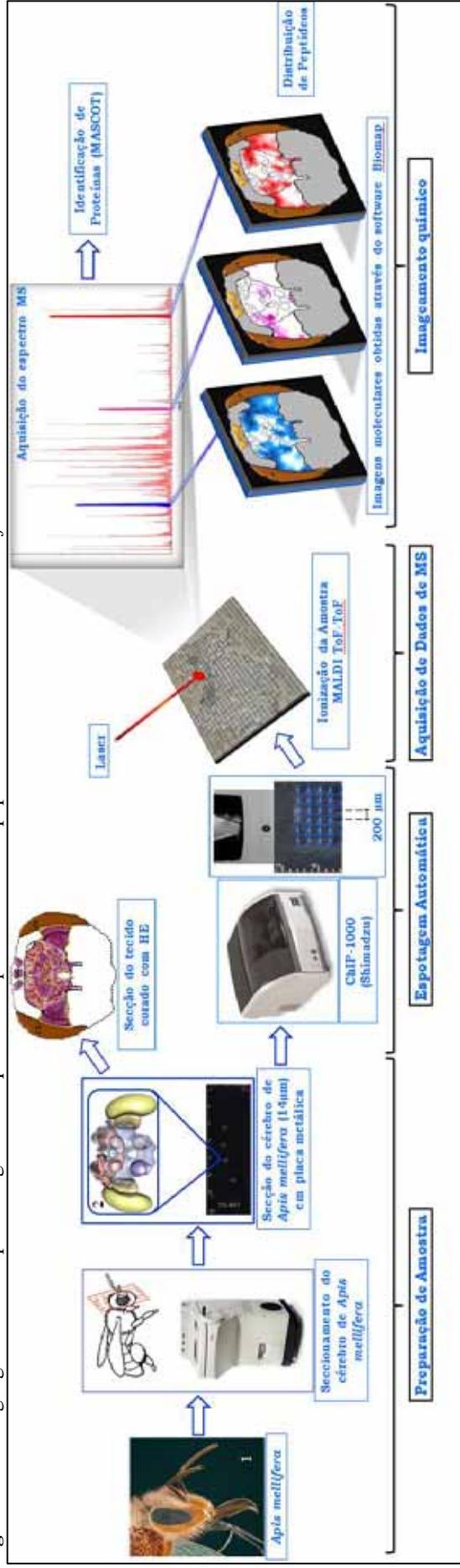
#### 4.8 Análises das imagens

As imagens correspondentes às proteínas identificadas foram reconstruídas utilizando-se o *software* Launchpad v2.8 (Shimadzu). As proteínas identificadas por meio do banco de dados (SwissProt) foram submetidas à digestão teórica através da ferramenta de bioinformática ProteinProspector, com o auxílio do programa MS-Digest, (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>). Portanto, as imagens de distribuição espacial de cada proteína identificada foram realizadas a partir da detecção experimental de cada um dos peptídeos trípticos virtuais, cujos valores de m/z foram então localizados nas respectivas posições espaciais dentro do corte. A imagem final de cada proteína foi obtida pela superposição das imagens individuais de distribuição de cada peptídeo tríptico (típico de cada proteína) na superfície do corte analisado.

Já para os neuropeptídeos, as imagens foram reconstruídas a partir de valores da razão massa/carga (m/z) de íons moleculares na forma monoprotionada ( $[M+H]^+$ ) das sequências peptídicas descritas em literatura (BROCKMANN et al., 2009; BOERJAN et al., 2010) utilizando-se o *software* Launchpad v2.8 (Shimadzu).

A estratégia geral adotada pode ser visualizada na Figura 7.

**Figura 7.** Estratégia geral adotada para imageamento químico de proteínas e neuropeptídeos em cérebro de *A. mellifera*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do método de preparação de amostra

Em um experimento de MALDI MSI um dos passos mais importantes é a preparação de amostra, uma vez que esse processo interfere diretamente na boa qualidade dos espectros de massa e na reprodutibilidade do experimento (SEELEY e CAPRIOLI, 2008). Um dos passos mais importantes é a deposição da matriz; o uso do *spray* por toda a superfície do corte pode ocasionar “encharcamento” dos compartimentos histológicos, levando a mudança de osmolalidade do tecido, seguido do rompimento dos comportimentos celulares, e a conseqüente deslocalização das moléculas presentes na amostra. Nesse contexto, utilizamos um processo extremamente sofisticados de deposição de matriz, conseguido através da espotagem automática de da mesma utilizando-se de uma impressora química. O equipamento combina a função de varredura de superfície com um algoritmo utilizado para controlar a região específica de deposição de matriz, bem como a quantidade de solução a ser depositada (a nível de pL). Além disso, esse sistema garante que os experimentos de aquisição de imagem molecular sejam realizados de modo automatizado, com elevada reprodutibilidade, mantendo intactos os compartimentos celulares. Outra vantagem do método é o acoplamento do equipamento com o espectrômetro de massas, que permite a aquisição de uma enorme quantidade de dados em um curto espaço de tempo (obtenção de aproximadamente 121000 espectros/análise em 10 minutos).

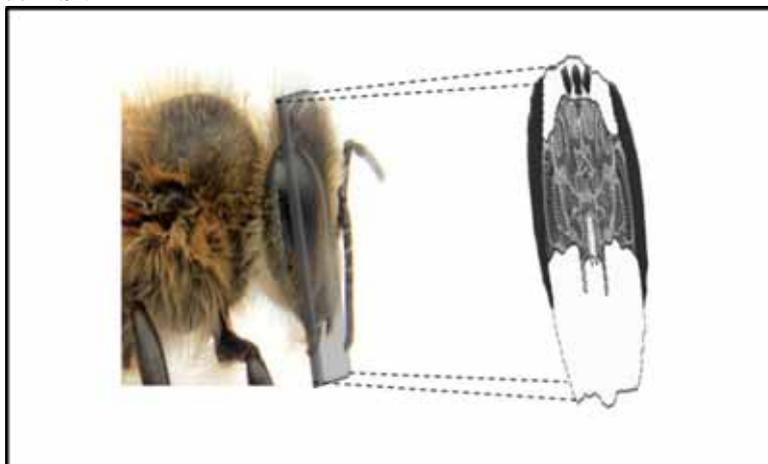
As abelhas são importantes modelos na neurobiologia. Esses organismos são caracterizados por apresentarem um sistema nervoso estruturado de forma simples, com poucos neurônios e por apresentarem uma impressionante capacidade cognitiva (MENZEL e GIURFA, 2001). Desde o século XIX, a anatomia e função do cérebro de abelhas têm sido estudadas através da dissecação do cérebro da cápsula da cabeça (DUJARDIN, 1850). Todavia, a estrutura tridimensional e a estereo geometria é alterada por essa manipulação e pela subsequente fixação do cérebro fora da cabeça, o que pode acarretar na perda de informações biológicas relevantes, tais como informações que correlacionem a estrutura e a função do cérebro (HADDAD et al., 2004; BRANDT et al., 2005).

Nesse contexto, foi desenvolvida uma metodologia de preparação de amostra que permitisse o estudo de imageamento molecular por abordagem MALDI *in situ* do

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

A partir da obtenção dos tecidos frescos, foram realizadas secções no plano sagital da cabeça de cada operária, na região do eixo maior da cápsula cefálica (Figura 8), visando obter uma secção que contenha todas as estruturas do cérebro. Para definir o plano de secção foi utilizado como referência o atlas digital 3D do cérebro da abelha *A. mellifera* desenvolvido por Rybak e colaboradores (2010), disponível em <http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/beebrain/>. O atlas padrão para o cérebro de abelha (Honeybee Standard Brain Atlas – HSB atlas) foi calculado a partir de 20 cérebros individuais, corados por técnica de imunohistoquímica; as imagens foram geradas a partir de microscopia confocal e segmentadas ao longo das fronteiras de 22 centros nervosos; por último, um foi reconstruído um modelo de superfície tridimensional a partir dos dados obtidos (RYBAK et al., 2010).

**Figura 8.** Exemplificação do plano de secção adotado para o estudo de proteínas e peptídeos no cérebro de *A. mellifera* por meio da tecnologia de MSI.



Fonte: Elaborado pelo autor.

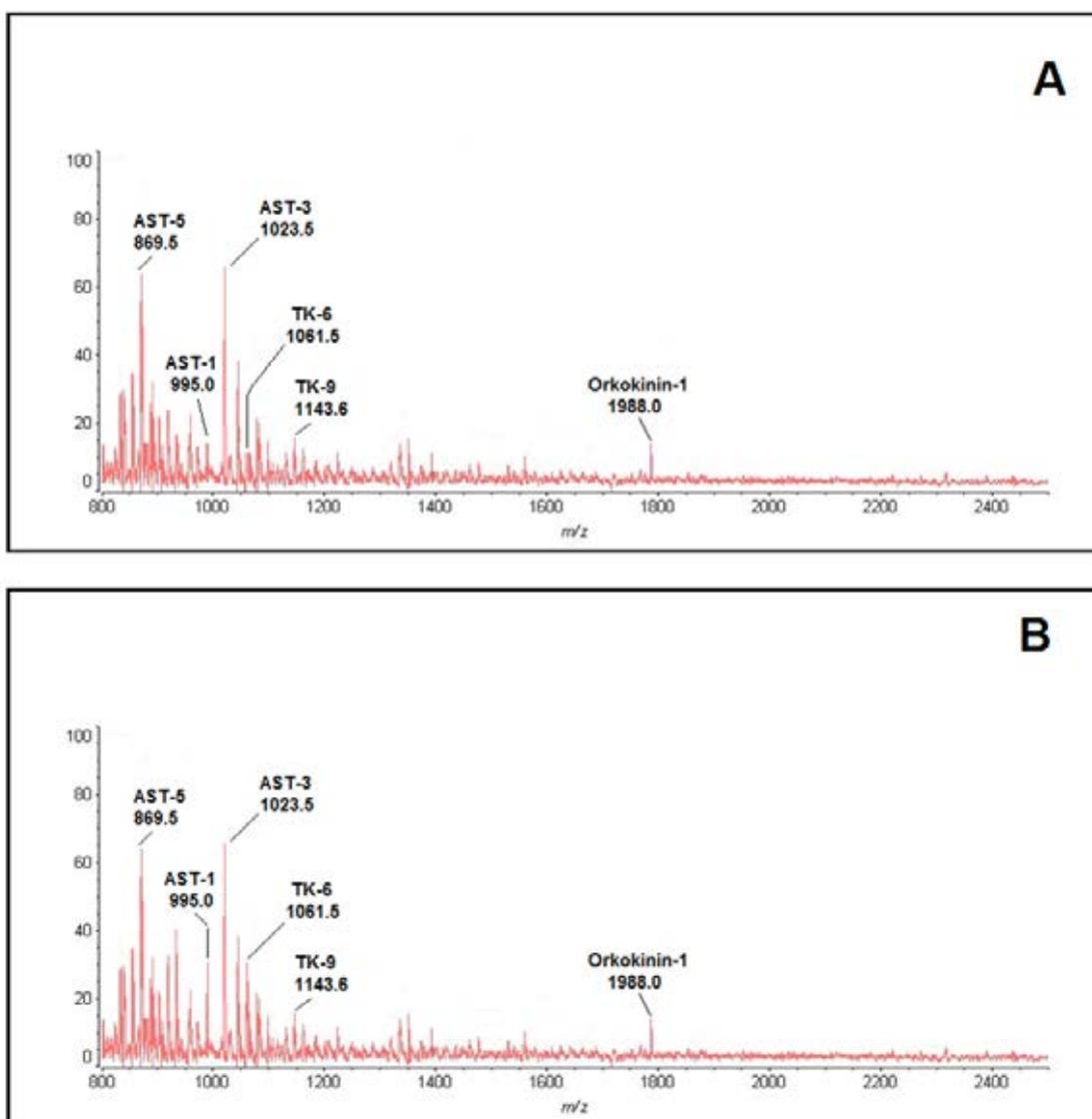
## 5.2 Sequenciamentos de neuropeptídeos em cérebro de *Apis mellifera*

Os peptídeos objetos de estudo no presente trabalho foram escolhidos por se apresentarem pouco abundantes nos espectros MALDI-ToF/MS dos vários cortes de

cérebro de abelhas antes do estímulo agressivo, e muito abundantes após a estimulação do comportamento (Figura 9).

A fim de se obter uma maior seletividade e especificidade na identificação de cada neuropeptídeo, cada um deles foi confirmado pela realização de análises de espectrometria de massas sequenciais ( $MS^2$ ) para confirmação de suas sequências (já descritas em literatura). Foram apresentados espectros  $MS/MS$  de apenas dois neuropeptídeos (Figura 10 e 11), com a finalidade de economizar espaço no texto, a despeito de vários deles terem sido identificados por este tipo de análise.

**Figura 9.** Espectro de massas MALDI-ToF/MS obtido em modo positivo com dispositivo *reflectron* de cérebro de abelha *A. mellifera* com vinte dias de idade: A. não submetidas ao ensaio de agressividade e B. submetidas ao ensaio de agressividade.

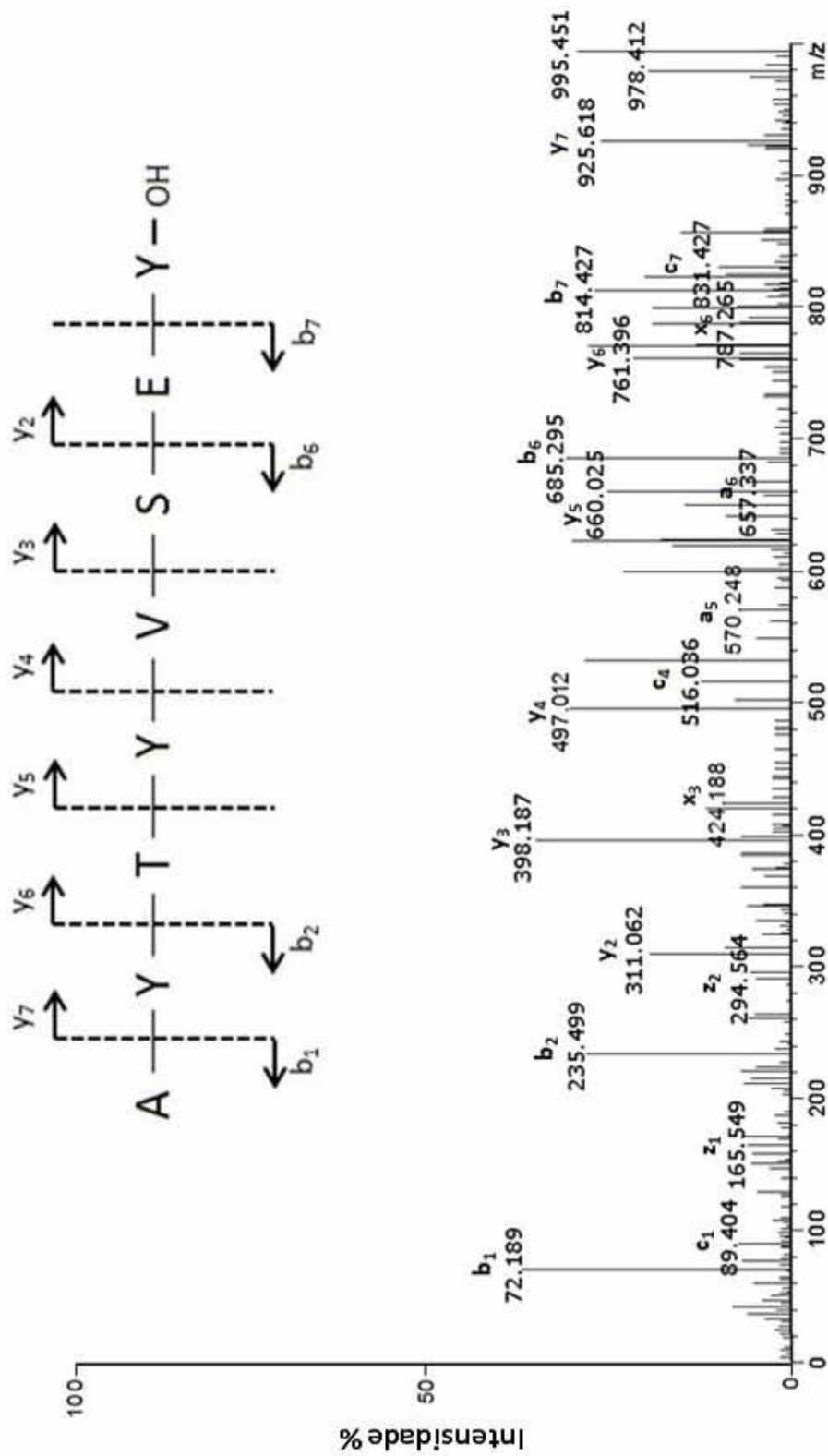


Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 10 pode-se observar o espectro MS<sup>2</sup> do neuropeptídeo de massa molecular 994.43 Da. O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 10) como sendo o íon de m/z 995.451 na forma [M+H]<sup>+</sup>. A perda do grupo hidroxila (17 Da) à partir do íon molecular resultou no íon de m/z 978.412. Uma série quase completa de íons y pode ser observada no espectro: m/z 925.618 (y<sub>7</sub>), m/z 761.396 (y<sub>6</sub>), m/z 660.025 (y<sub>5</sub>), m/z 497.012 (y<sub>4</sub>), m/z 398.187 (y<sub>3</sub>), m/z 311.062 (y<sub>2</sub>). Devido à ausência de um íon da série y (y<sub>1</sub>), utilizou-se também a série b; através da subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons y e sobreposição das duas séries de íons, foi possível a determinação da sequência do peptídeo. A sequência determinada para o peptídeo 994.43 Da, levando em consideração as séries de íons y e b foi: **A – Y – T – Y – V – S – E – Y**. A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença do resíduo C-terminal na forma de ácido livre; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte: **A – Y – T – Y – V – S – E – Y – OH**.

Este peptídeo pertence à classe das alostatinas A, e já foi encontrado em cérebro de *A. mellifera* em outro trabalho (BROCKMANN et al., 2009). Através da sequência obtida foi realizada uma comparação com as sequências depositadas no banco de dados BLAST (NCBI – blast.ncbi.nlm.nih.gov), na qual observou-se que a mesma sequência primária obtida está predita na sequência do precursor de alostatina A em outros insetos, tais como o *Bombus impatiens*, *Bombus terrestris*, *Apis florea* e *Megachile rotundata*. Além disso, uma revisão minuciosa da literatura foi realizada para verificar se já havia sido descrito alguma função específica para o neuropeptídeo sequenciado. Por enquanto, contudo, não existem informações funcionais para o mesmo.

**Figura 10.** Espectro de massas  $MS^2$  em condições CID no modo positivo, já desconvolvido na forma  $[M+H]^+$ , com a respectiva interpretação de sequência do neuropeptídeo de massa molecular 994,43 Da pertencente à classe das allostatinas. Foi selecionado o íon precursor de  $m/z$  995,451 na forma  $[M+H]^+$ . O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo  $y$  a partir do íon molecular de  $m/z$  995,451 na forma  $[M+H]^+$ , bem como a sua interpretação.

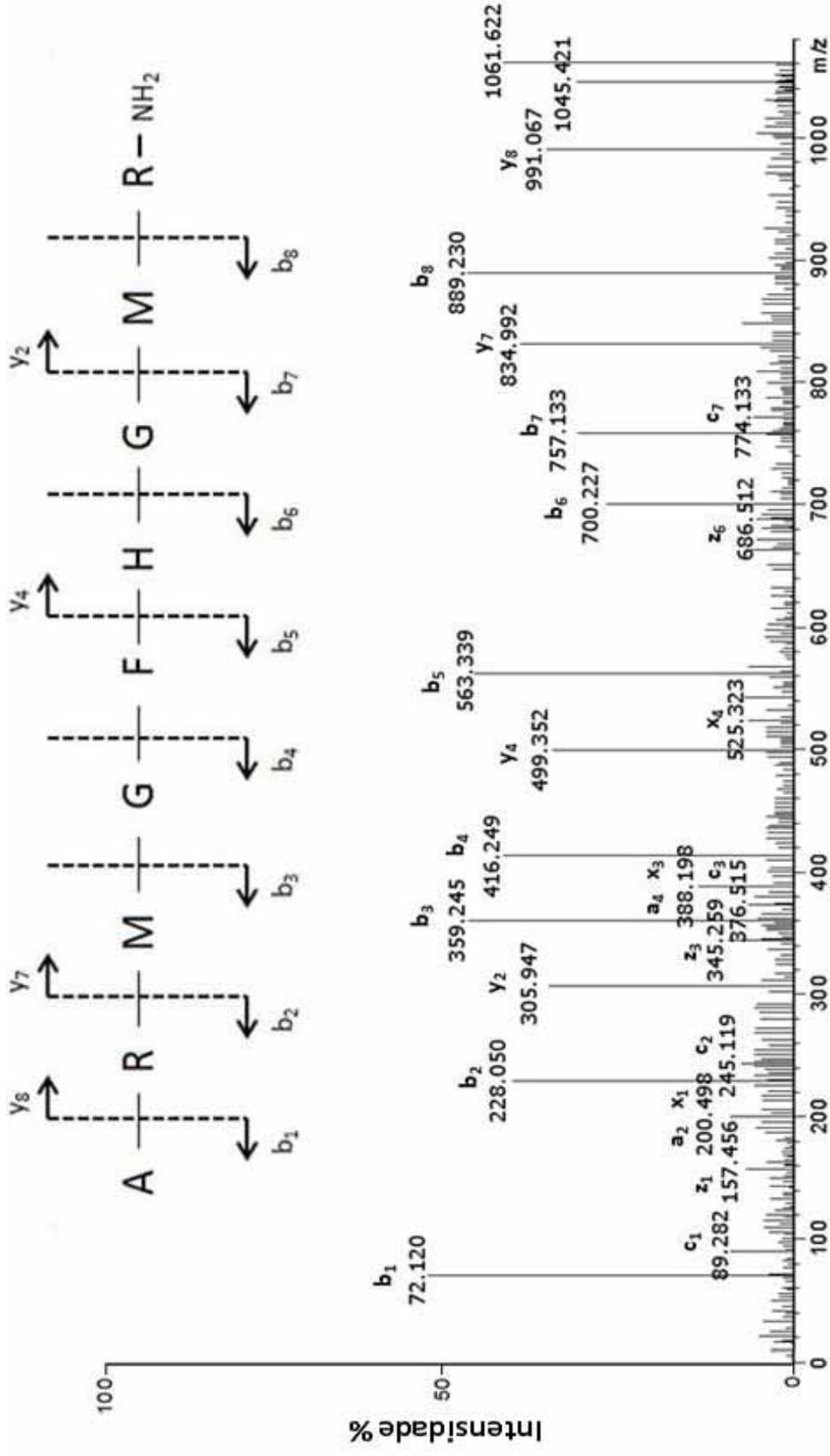


Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 11 podem-se observar o espectro MS<sup>2</sup> do neuropeptídeo de massa molecular 1060.52 Da. O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 11) como sendo o íon de m/z 1061.622 na forma [M+H]<sup>+</sup>. A perda do grupo amino “-NH<sub>2</sub>” (16 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1045.421. Uma série completa de íons *b* pode ser observada no espectro: m/z 889.230 (*b*<sub>8</sub>), m/z 757.133 (*b*<sub>7</sub>), m/z 700.227 (*b*<sub>6</sub>), m/z 563.339 (*b*<sub>5</sub>), m/z 416.249 (*b*<sub>4</sub>), m/z 359.245 (*b*<sub>3</sub>), m/z 228.050 (*b*<sub>2</sub>), m/z 72.120 (*b*<sub>1</sub>). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo. A sequência determinada para o peptídeo 1060.52 Da, levando em consideração as séries de íons *y* e *b* foi: **A – R – M – G – F – H – G – M – R**. A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte: **A – R – M – G – F – H – G – M – R–NH<sub>2</sub>**.

Este peptídeo pertence à classe das taquicininas, é denominado em literatura como *AmTRP5* (HUMMON et al., 2006), apresenta a sequência C-terminal característica para esse grupo de moléculas: -FX<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>R-NH<sub>2</sub> (sendo o X<sub>1</sub> e o X<sub>2</sub> variáveis) – ver mais detalhes dessa família de neuropeptídeo no item 5.5.2. Após a obtenção da sequência, realizamos um procedimento de busca no banco de dados BLAST (NCBI – blast.ncbi.nlm.nih.gov) similar ao descrito anteriormente para o peptídeo de m/z 995.43. Os resultados sugerem que a mesma sequência primária de aminoácido do *AmTRP5*, encontrado em *Apis*, estava predita na sequência do precursor de taquicinina de outros organismos, tais como o *Bombus impatiens*, *Bombus terrestris*, *Apis florea* e *Nasonia vitripennis*. Assim como descrito para o peptídeo de m/z 995.43, não foi observado informações funcionais específicas para o neuropeptídeo *AmTRP5*.

**Figura 11.** Espectro de massas  $MS^2$  em condições CID no modo positivo, já desconvoluído na forma  $[M+H]^+$ , com a respectiva interpretação de sequência do neuropeptídeo de massa molecular 1060.52 Da, pertencente à classe das taquicinas. Foi selecionado o íon precursor de  $m/z$  1061.622 na forma  $[M+H]^+$ . O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo  $b$  a partir do íon molecular de  $m/z$  1061.622 na forma  $[M+H]^+$ , bem como a sua interpretação.



Fonte: Dados da pesquisa.

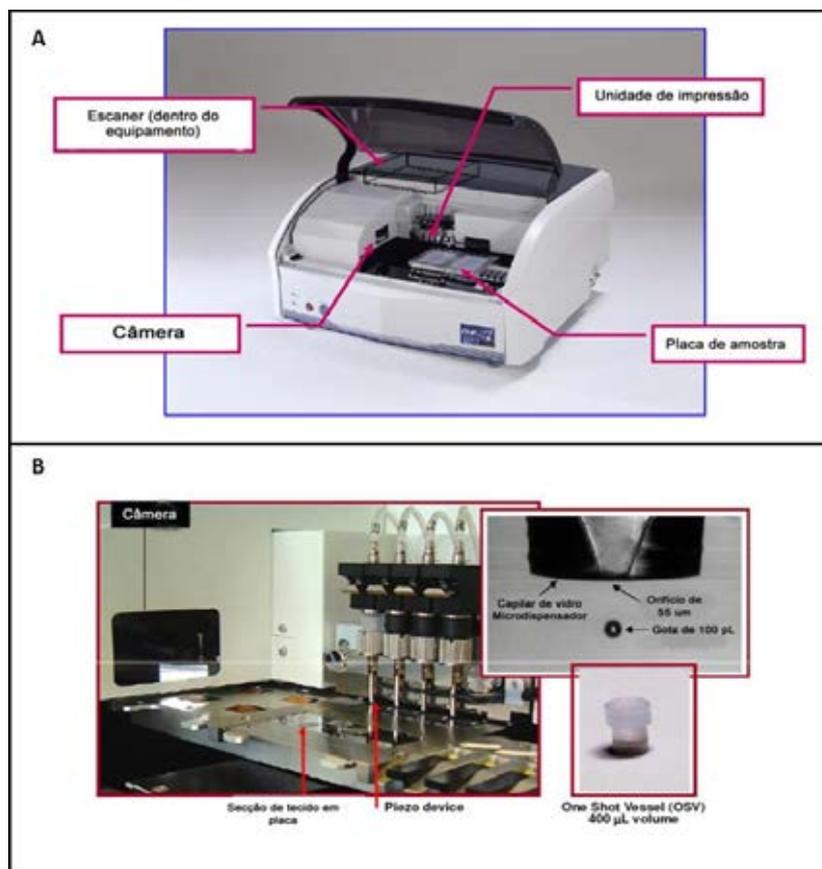
### 5.3 Da neuromorfologia à imagem molecular

Foi utilizada uma impressora química (ChIP-1000, Shimadzu) acoplada a um espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF-ToF, com a finalidade de criar imagens moleculares que viabilizassem a compreensão desses processos. A compreensão da funcionalidade e composição do equipamento e de como operar o software que o gerencia é extremamente importante para que as aplicações sejam otimizadas num trabalho por MALDI *Imaging*. A figura 12 A ilustra o equipamento ChIP-1000 (Shimadzu), a impressora química utilizada no presente trabalho.

Na impressora química, o reduzido diâmetro dos *piezos* (Figura 12 B) e o ajuste elétrico refinado (controle de pressão por sistema a vácuo) garantem que volumes na escala de picolitros sejam depositados sobre tecidos de forma controlada e altamente precisa. Quando esse sistema está submetido a uma pressão, é gerado um campo elétrico que garante uma espotagem precisa para micro regiões, gerando ao final do processo imagens moleculares de alta resolução.

Esta impressora caracteriza-se por ser uma unidade essencial para o pré-tratamento proteômico, pois possibilita tratamentos químicos, utilizando enzimas ou anticorpos bioquímicos em membranas para a identificação ou análise de proteínas e peptídeos, além de possibilitar a análise de tecidos *in situ*.

**Figura 12.** (A) Impressora química ChIP-1000 (Shimadzu) é composta por um escâner, uma unidade de impressão, uma câmera e um suporte onde a placa contendo as amostras é introduzida. (B) Detalhamento do sistema dispensador de soluções: *Piezo device* é o acessório onde as soluções são dispensadas. Capilar de vidro embutido no interior do *Piezo device*, individualizando uma gota com o volume de 100  $\mu$ L e *Vessel* é um acessório onde as soluções são armazenadas antes da espotagem e que fica localizado acima do *piezo device*.



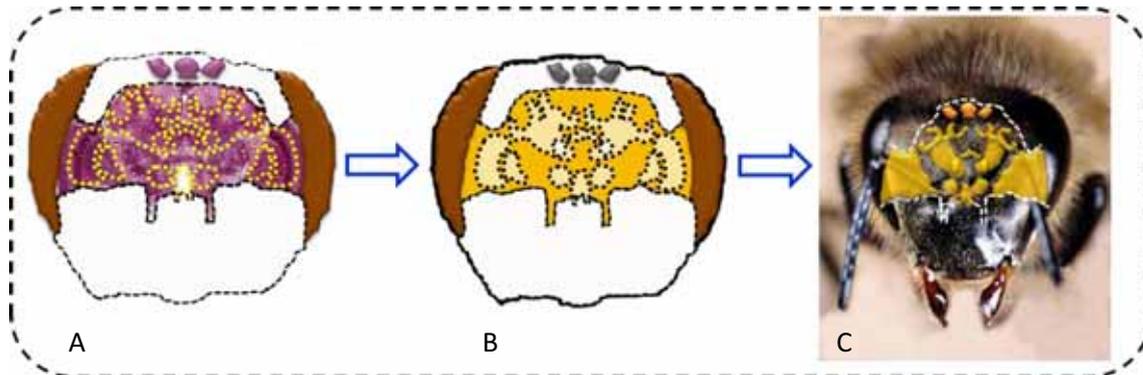
Fonte: Elaborado pelo autor.

Levando-se em conta as características tecnológicas diferenciais do equipamento foi possível desenvolver uma nova plataforma analítica capaz de gerar imagens moleculares de alta resolução, possibilitando o estudo de proteínas e peptídeos em cérebro de abelhas *A. mellifera*.

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 13). Este mapa de contorno define os limites de cada região do cérebro visando melhorar a compreensão dos dados de MSI.

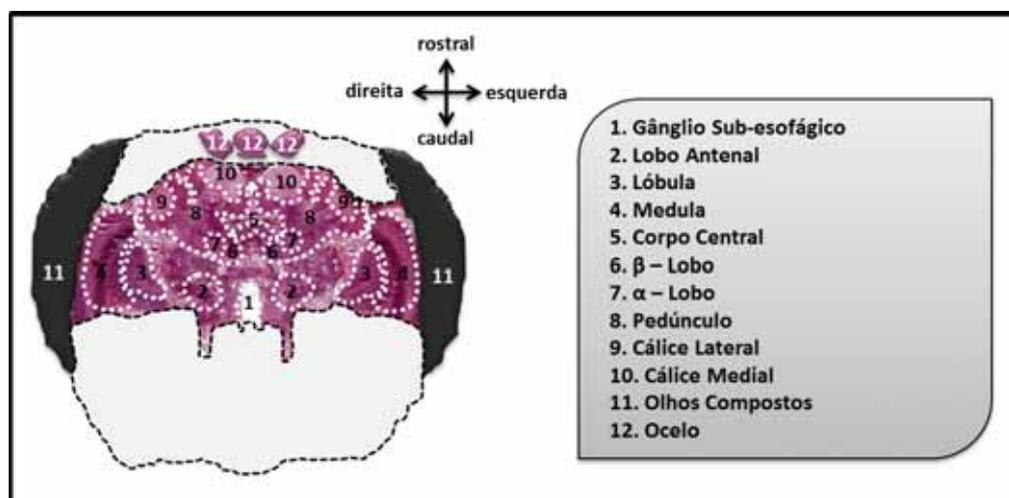
**Figura 13.** Elaboração de mapa de contorno para a compreensão da distribuição de peptídeos nas diversas estruturas de cérebro de *A. mellifera*. A) Secção de cérebro de *A. mellifera* corado com HE para a visualização da anatomia do cérebro. B) Máscara elaborada para definir os limites de cada região do cérebro visualizadas em “A”. C) Modelo planar do cérebro elaborado em “B”, sobreposto à cabeça da abelha, mostrando a posição real das estruturas do cérebro no organismo alvo de estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o desenvolvimento do mapa de contorno foram utilizados os dados obtidos através da histoquímica, que possibilitou a visualização da anatomia do cérebro, facilitando a comparação das imagens moleculares com as imagens histoquímicas dos tecidos (Figura 13). 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 14).

**Figura 14.** Máscara adotada para os estudos de MSI. As estruturas foram nomeadas de acordo com Rybak e colaboradores (2010).



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.4 Proteínas como precursores de neuropeptídeos

Assim como a maioria dos peptídeos, os neuropeptídeos são codificados dentro dos genomas como grandes proteínas precursoras, denominadas de preprohormônio (ou prepropeptídeo) (NÄSSEL, 2002; FRICKER et al., 2005; HUMMON, AMARE e SWEEDLER, 2006; CHRISTIE, STEMMLER e DICKINSON, 2010). Após os processos de transcrição e tradução da proteína precursora contendo os neuropeptídeos, esta é direcionada para vias secretoras, através da sequência sinal presente no grupo amino-terminal, para posterior processamento e maturação, assim como para uma ocasional separação (SOSSIN, FISHER e SCHELLER, 1989; SOSSIN, SWEET e SCHELLER, 1990; TAGHERT, 1999; CHRISTIE, STEMMLER e DICKINSON, 2010). Dentro desse percurso, diversas modificações pós-traducionais (PTMs) podem ocorrer. Inicialmente, ao se mover através do retículo endoplasmático, enzimas peptidase-sinal clivam a região do peptídeo sinal do preprohormônio, e múltiplas peptidases, incluindo prohormônio ou proproteína convertase clivam a sequência restante da proteína em peptídeos (TEGGE et al., 2008; CHRISTIE, STEMMLER e DICKINSON, 2010). Posteriormente, esses peptídeos podem ser submetidos à PTMs adicionais, tais como, amidação da região C-terminal, ciclização do N-terminal da glutamina e ácido glutâmico, sulfatação da tirosina, glicosilação e fosforilação, dentre outras, antes de assumir a sua conformação bioativa – neuropeptídeo maduro (NÄSSEL, 2002; TEGGE et al., 2008; CHRISTIE, STEMMLER e DICKINSON, 2010).

Enquanto sofre o processo de maturação, os peptídeos são transportados para os sítios de liberação estocados em vesículas, até uma despolarização induzir a liberação por exocitose (ZUPANC, 1996). Uma vez processado para a sua conformação madura, o neuropeptídeo pode ser liberado do neurônio e exercer seu efeito nas regiões alvo. Esses alvos podem ser os neurônios que liberaram o peptídeo (função autócrina), tecidos próximos ao ponto de liberação (ação parácrina), ou tecidos localizados distante do ponto de liberação, em que o peptídeo é liberado no sistema circulatório (ação hormonal).

Nas figuras 15 e 16 podemos observar o resultado do alinhamento das sequências dos neuropeptídeos (ASTAs e TRPs) descritos em literatura com a sequência dos preprohormônios alatostatina e taquicinina, respectivamente. Através dos alinhamentos, podemos observar que o preprohormônio alatostatina de *A. mellifera* contém pelo menos oito sequências imaturas de neuropeptídeos ASTAs em sua sequência (figura 15), que provavelmente serão processados e darão origem aos peptídeos maduros. Nesse contexto, os

dados da literatura sugerem que existe uma variação entre as diferentes ordens em relação ao número de ASTAs presentes em suas respectivas proteínas precursoras (KASTIN, 2013). Por exemplo, em lepidópteros a preproalostatina A contém entre oito e dez peptídeos, em dípteros esse número varia de quatro (*Drosophila*) a cinco (*Aedes aegypti*) peptídeos, e em crustáceos, os precursores contêm mais de 50 peptídeos em sua estrutura (KASTIN, 2013).

Observando a sequência dos peptídeos ASTAs imaturos no alinhamento podemos observar, também, que todas as sequências apresentam a sequência C-terminal característica das ASTAs de insetos (Y/F-X-FGL/Iamida, onde X representa um aminoácido variável), com exceção do peptídeo AITYVSEY, e que os peptídeos variam de tamanho que vai de sete a 27 resíduos de aminoácido – figura 15. Essa sequência característica parece ser conservada durante a evolução, estando presente em diferentes espécies do reino animal, o que sugere que essa família de neuropeptídeos desempenhe funções importantes nos organismos, em especial entre os vertebrados (BOERJAN et al., 2010; KASTIN, 2013). Diversos estudos de estrutura-atividade biológica têm sugerido que essa sequência pentapeptídica conservada seja essencial para a atividade biológica dessa classe de biomoléculas, muito embora alguns análogos das ASTAs, que tiveram a região Y/F-X substituída por um grupo aromático, desempenharam atividade biológica (KAI et al., 2010; XIE et al., 2011).

De modo geral, a estrutura conservada dessas moléculas parece possuir elementos estruturais secundários, que provavelmente são essenciais para a interação do peptídeo com seus receptores específicos (KASTIN, 2013). Nachman e colaboradores (1998) estudaram algumas ASTAs e verificaram que na sequência conservada Y/F-X-FGL/Iamida provavelmente ocorra à formação de dobras  $\beta$  tipo-II, e que os resíduos mais críticos para que ocorra essa conformação são a fenilalanina (F) e leucina (L), que são aminoácidos hidrofóbicos (NACHMAN et al., 1998). Nesse estudo, a incorporação de resíduos de aminoácido que promovem a formação de dobras  $\beta$  tipo-II, permitiu a síntese de análogos desses peptídeos, que foram caracterizados por exibir alta atividade biológica.

Cada ASTAs imaturas no alinhamento com o preprohormônio é seguido por um resíduo de glicina (G) – com exceção do peptídeo AITYVSEY (figura 15 A) – e por um sítio de duas bases polares básicas KR (lisina/arginina), uma no início da sequência e outra no final. Os sítios KR ou suas variações (RR, KK, RK, K, R) são denominados sítios de clivagem, necessários para que ocorra a liberação do peptídeo do seu preprohormônio através da ação de endopeptidases que reconhecem esses sítios específicos – esse processo é provavelmente realizado por enzimas prohormônio convertase (EIPPER, STOFFERS e MAINS, 1992; BOERJAN et al., 2010; KASTIN, 2013). Após a clivagem, o terminal glicina

(G) presente na região C-terminal de todos os peptídeos, com exceção do AYTIVSEY que não foi encontrado na forma amidada, serve como substrato para a ação de enzimas, como a *peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase* e a *peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine  $\alpha$ -amidating lyase*, que convertem a G C-terminal em um grupo amida. Diversas evidências sugerem que a amidação C-terminal seja importante para a atividade biológica desses peptídeos in vivo (KASTIN, 2013).

Ao analisarmos o peptídeo AYTIVSEY, podemos observar que ele não apresenta a sequência conservada característica da família, e é produzido na forma ácida. Comparando as figuras 15 A e C, podemos observar que esse peptídeo é um fragmento do peptídeo AYTIVSEYKRLPVYNFGI-NH<sub>2</sub>, e que provavelmente é produto de degradação enzimática (hipótese corroborada pela presença de um sítio proteolítico – KR – no interior do peptídeo AYTIVSEYKRLPVYNFGI-NH<sub>2</sub>). Por não apresentar as características estruturais da família, provavelmente o peptídeo AYTIVSEY seja biologicamente inativo, todavia ensaios específicos seriam necessários para comprovar essa hipótese.

Interessantemente, os neuropeptídeos AYTIVSEYKRLPVYNFGI-NH<sub>2</sub> e AVHYSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGL-NH<sub>2</sub> (Figuras 15 G e H) apresentam um par de resíduos básicos no meio da sequência peptídica (KR), de modo a constituir uma extensão N-terminal dos neuropeptídeos LPVYNFGI-NH<sub>2</sub> e PNDMLSQRYHFGL-NH<sub>2</sub>, respectivamente. Para que as duas ASTAs estendidas sejam neuropeptídeos maduros e desempenhem função biológica, seria necessário que o sítio proteolítico KR no interior da sequência não fosse utilizado para o processamento em algumas células (neurônios ou células endócrinas). Essa ausência de processamento poderia ser causada pela presença de resíduos de prolina nas posições +2 e -4/+1 do sítio de clivagem nos neuropeptídeos AYTIVSEYKRLPVYNFGI-NH<sub>2</sub> e AVHYSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGL-NH<sub>2</sub>, respectivamente. Esses resíduos podem diminuir a eficiência de clivagem das endopeptidases nesses sítios específicos, uma vez que as prolinas quebram a linearidade da cadeia  $\alpha$ -carbônica e dificultam o acoplamento das enzimas. ASTAs estendidas com sítio KR no interior do peptídeo também foram isolados de baratas (BENDENA et al., 1997), mariposas (DUVE et al., 1997) e moscas (LENZ, WILLIAMSON e GRIMMELIKHUIJZEN, 2000). Em *Drosophila*, por exemplo, o neuropeptídeo maduro *drostatin-5* é uma extensão N-terminal do peptídeo maduro *drostatin-2*, ambos oriundos de um mesmo precursor (LENZ, WILLIAMSON e GRIMMELIKHUIJZEN, 2000).

Através do alinhamento com o precursor de taquicinina (Figura 16), podemos observar a presença de pelo menos 14 sequências neuropeptídicas imaturas diferentes na sequência do

preproTRP, que provavelmente serão processadas e darão origem aos peptídeos maduros. Assim como ocorre com a família ASTA, os números de TRPs presentes nas proteínas precursoras variam entre as diferentes ordens (KASTIN, 2013). Na figura 16 podemos observar que todas as TRPs são cercadas por sítios de clivagem (RR, KK, KR), e que a maioria dos peptídeos (oito de 14 diferentes TRPs) apresentam a sequência C-terminal característica das taquicininas de invertebrados –  $FX_1GX_2R-NH_2$  ( $X_1$  e  $X_2$  variáveis), sendo eles: ALMGFQGVR- $NH_2$ ; APMGFQGMR- $NH_2$ ; APMGFYGT; APMGFYGTRG; APMGFYGTR- $NH_2$ ; ARMGFHGMR- $NH_2$ ; SPFRYLGAR- $NH_2$ ; NPRWEFRGKFGVGV- $NH_2$ . Desses neuropeptídeos, apenas o SPFRYLGAR- $NH_2$  apresenta uma tirosina (Y) ao invés de uma fenilalanina (F), o que representa uma substituição homóloga. Os peptídeos APMGFYGT e APMGFYGTRG parecem ser formas imaturas do neuropeptídeo APMGFYGTR- $NH_2$ , que apresenta a sequência conservada característica para a espécie. Os peptídeos que não apresentam a sequência conservada são: NSIINDVKNELFPEDIN, ASFDDEYY, IILDALEELD, GVMDFAQIGLQ, SLEEILDEI e o SLEEILDEIK.

Dentre as taquicininas que vêm sendo detectadas e sequenciadas por espectrometria de massas (BROCKMANN et al., 2009; BOERJAN et al., 2010), as TRPs que não apresentam a sequência conservada podem ser classificadas como peptídeos espaçadores. Esse termo, introduzido por Wegener e Gorbashov (2008), refere-se a peptídeos não conservados oriundos de um precursor polipeptídico. Muito provavelmente, os peptídeos com a sequência conservada interagem com os receptores, enquanto os peptídeos espaçadores, liberados dos precursores assim como os demais peptídeos, provavelmente não tenham função na transdução de sinal (BOERJAN et al., 2010). Tem sido demonstrado, por exemplo, que a região C-terminal (R- $NH_2$ ) seja crítica para a atividade mioestimulatória dos peptídeos UruTK-I (LAQSQFVGSRa) e II (AAGMGFFGARa) no intestino posterior de barata; a substituição por M- $NH_2$  diminuiu a atividade do peptídeo em 1000 vezes (IKEDA, MINAKATA e NOMOTO, 1999).

**Figura 15.** Alinhamento das sequências peptídicas descritas por Brockmann e colaboradores (2009) e Boerjan e colaboradores (2010) com a sequência da proteína alatostatina (Código de acesso no NCBI: NP\_001161181.1). (A) AYTIVSEY – 994,43 Da. (B) LPVYNFGI-NH<sub>2</sub> – 920,51 Da. (C) AYTIVSEYKRLPVYNFGI-NH<sub>2</sub> – 2181,13 Da. (D) GRDYSFGL-NH<sub>2</sub> – 912,45 Da. (E) RQYSFGL-NH<sub>2</sub> – 868,46 Da. (F) GRQPYSFGL-NH<sub>2</sub> – 1022,53 Da. (G) PNDMLSQRYHFGL-NH<sub>2</sub> – 1575,76 Da. (H) AVHYSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGL-NH<sub>2</sub> – 3013,51 Da.

<b>A</b>			
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTIVSEYKRLPVYNFGIGKRW 80
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----AYTIVSEY----- 8
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGRQPYSFGLGKRAVH 160
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGLGKRMSDEEEESSQ 197
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<b>B</b>			
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTIVSEYKRLPVYNFGIGKRW 80
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----LPVYNFGI----- 8
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGRQPYSFGLGKRAVH 160
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGLGKRMSDEEEESSQ 197
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<b>C</b>			
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTIVSEYKRLPVYNFGIGKRW 80
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----AYTIVSEYKRLPVYNFGI----- 18
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGRQPYSFGLGKRAVH 160
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGLGKRMSDEEEESSQ 197
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<b>D</b>			
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTIVSEYKRLPVYNFGIGKRW 80
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGRQPYSFGLGKRAVH 160
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----GRDYSFGL----- 8
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGLGKRMSDEEEESSQ 197
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<b>E</b>			
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTIVSEYKRLPVYNFGIGKRW 80
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGRQPYSFGLGKRAVH 160
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----RQYSFGL----- 7
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRYHFGLGKRMSDEEEESSQ 197
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----

F			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTYVSEYKRLPVYNFGIGKRW	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGQPYSFGLGKRAVH	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----GRQPYSFGL-----	9
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRVHFGLGKRMSDEEEESSQ	197
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
G			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTYVSEYKRLPVYNFGIGKRW	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGQPYSFGLGKRAVH	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRVHFGLGKRMSDEEEESSQ	197
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----PNDMLSQRVHFGL-----	13
H			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MRSRTSVLTSSLAFLYFFGIVGRSALAMEETPASSMNLQHYNMNLNPMVFDDTMPEKRAYTYVSEYKRLPVYNFGIGKRW	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	IDTNDNKRGRDYSFGLGKRRQYSFGLGKRNDNADYPLRLNLDYLPVDNPAFHSQENTDDFLEEKRGQPYSFGLGKRAVH	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----AVH	3
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRVHFGLGKRMSDEEEESSQ	197
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	4	YSGGQPLGSKRPNDMLSQRVHFGL-----	27

Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 16.** Alinhamento das sequências peptídicas descritas por Brockmann e colaboradores (2009) e Boerjan e colaboradores (2010) com a sequência da proteína taquicinina (Código de acesso no NCBI: NP\_001011576.1). (A) ALMGFQGVR-NH<sub>2</sub> – 976,53 Da. (B) NSIINDVKNELFPEDIN – 1972,97 Da. (C) APMGFQGM-R-NH<sub>2</sub> – 992,47 Da. (D) ASFDDEYY – 1008,38 Da. (E) SLEEILDEI – 1059,54 Da. (F) SLEEILDEIK – 1187,63 Da. (G) APMGFYGT – 842,36 Da. (H) APMGFYGT-R-NH<sub>2</sub> – 997,48 Da. (I) APMGFYGT-RG – 1055,49 Da. (J) IILDALEELD – 1142,61 Da. (K) GVMDFAQIGLQ – 1106,41 Da. (L) ARMGFHGM-R-NH<sub>2</sub> – 1060,52 Da. (M) SPFRYLGAR-NH<sub>2</sub> – 1064,59 Da. (N) NPRWEFRGKFGVGR-NH<sub>2</sub> – 1745,96 Da.

<b>A</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1 MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVRGKKNSIINDVKNELF 80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1 -----ALMGFQGV----- 9
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81 PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLDIDYPEDYGKRVLS 160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161 MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTGRGKKIILDALEELDCKRGVMDFAQIGLQRKKDITFDDYLDYAINPFDYEKRS 240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241 DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPPFRYLGARGKKNPRWE 320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321 FRGKFGVGRGKKSSLQTVF 339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<b>B</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1 MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF 80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1 -----NSIINDVKNELF 12
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81 PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLDIDYPEDYGKRVLS 160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	13 PEDIN----- 17
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161 MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTGRGKKIILDALEELDCKRGVMDFAQIGLQRKKDITFDDYLDYAINPFDYEKRS 240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241 DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPPFRYLGARGKKNPRWE 320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321 FRGKFGVGRGKKSSLQTVF 339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<b>C</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1 MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF 80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81 PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLDIDYPEDYGKRVLS 160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1 -----APMGFQGM----- 9
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161 MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTGRGKKIILDALEELDCKRGVMDFAQIGLQRKKDITFDDYLDYAINPFDYEKRS 240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241 DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPPFRYLGARGKKNPRWE 320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321 FRGKFGVGRGKKSSLQTVF 339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----

D			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLIDYPEDYGKRVLS	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----ASFDEYY-----	8
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQRKKDTTFDDYLDYAINPFDYEKRST	240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321	FRGKFGVGRGKSSSLQTVF	339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
E			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLIDYPEDYGKRVLS	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----SLEEILDEI-----	9
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQRKKDTTFDDYLDYAINPFDYEKRST	240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321	FRGKFGVGRGKSSSLQTVF	339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
F			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLIDYPEDYGKRVLS	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----SLEEILDEIK-----	10
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQRKKDTTFDDYLDYAINPFDYEKRST	240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321	FRGKFGVGRGKSSSLQTVF	339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	

G			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVVLIIDYPEDYGKRVLS	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQRKKDITFDYLDYAINPFDYEKRST	240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----APMGFYGT-----	8
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMGRKRDAAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321	FRGKFVGVGRGKSSSLQTVF	339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
H			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVVLIIDYPEDYGKRVLS	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQRKKDITFDYLDYAINPFDYEKRST	240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----APMGFYGTR-----	9
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMGRKRDAAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321	FRGKFVGVGRGKSSSLQTVF	339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
I			
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1	MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVGRGKNSIINDVKNELF	80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVVLIIDYPEDYGKRVLS	160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQRKKDITFDYLDYAINPFDYEKRST	240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1	-----APMGFYGTRG-----	10
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMGRKRDAAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321	FRGKFVGVGRGKSSSLQTVF	339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002		-----	

<b>J</b>					
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MI IHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVRGKKNSIINDVKNELF	80	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLDYDPEDYGKRVLS	160	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTRGKKIILDALEELD KRGVMD FQIGLQRKDDTTFDDYLDYAINPFDYEK RST	240	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----IILDALEELD-----	10	
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	321	FRGK FVGVRGKKSSLQTVF 339		
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<b>K</b>					
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MI IHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVRGKKNSIINDVKNELF	80	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLDYDPEDYGKRVLS	160	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTRGKKIILDALEELD KRGVMD FQIGLQRKDDTTFDDYLDYAINPFDYEK RST	240	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----GVMDFQIGLQ-----	10	
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	321	FRGK FVGVRGKKSSLQTVF 339		
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<b>L</b>					
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	1	MI IHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFQGVRGKKNSIINDVKNELF	80	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	81	PEDINKRAPMGFQGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFQGMRGKKSLEEILDEIKKKTTRFQDSRSKDVYLDYDPEDYGKRVLS	160	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	161	MDGYQNILDKKDELLGEWEKRAPMGFYGTRGKKIILDALEELD KRGVMD FQIGLQRKDDTTFDDYLDYAINPFDYEK RST	240	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	241	DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGARGKKNPRWE	320	
<input checked="" type="checkbox"/>	10002	1	-----ARMGFHGM R-----	9	
<input checked="" type="checkbox"/>	10001	321	FRGK FVGVRGKKSSLQTVF 339		
<input checked="" type="checkbox"/>	10002		-----		

M	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1 MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFGQVGRGKKNSTINDVKNELF 80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81 PEDINKRAPMGFGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFGMRGKKSLEEILDEIKKKTTTRFQDSRSKDVYLIDYPEDYGKRVLS 160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161 MDGYQNIIDKKDELLGEWEKRAPMGFYGRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQKKDITFFDDYLDYAINPFDYEKRST 240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241 DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGAR GKKKNPRWE 320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1 -----SPFRYLGAR----- 9
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321 FRGKFGVGRGKKSLLQTVF 339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
N	
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	1 MIIHSIFLLMVSITLVIAEESDNVLFDKRAPTGHQEMQGKQNSASLNSENFGIFKRALMGFGQVGRGKKNSTINDVKNELF 80
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	81 PEDINKRAPMGFGMRGKKASFDDEYYKRAPMGFGMRGKKSLEEILDEIKKKTTTRFQDSRSKDVYLIDYPEDYGKRVLS 160
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	161 MDGYQNIIDKKDELLGEWEKRAPMGFYGRGKKIILDALEELDKRGVMDFQIGLQKKDITFFDDYLDYAINPFDYEKRST 240
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	-----
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	241 DFQDVESGSESFKRARMGFHGMRGKRDAAGIYGSNSSTVGTIFGYQDMRNRGNFPVYQVEKRSPFRYLGAR GKKKNPRWE 320
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	1 -----NPRWE----- 5
<input checked="" type="checkbox"/> 10001	321 FRGKFGVGRGKKSLLQTVF 339
<input checked="" type="checkbox"/> 10002	6 FRGKFGVGR----- 14

Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.5 Da imagem molecular ao comportamento

Após a obtenção dos espectros de massas e o desenvolvimento do mapa de contorno, foram criados mapas de distribuição para as duas proteínas precursoras de neuropeptídeos, identificadas: allostatina A (código de acesso: NP\_001161181.1) e taquicinina (código de acesso: NP\_001011576.1). Os códigos de acesso correspondem às sequências depositadas junto ao banco de proteínas do NCBI, em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Levando-se em conta a presença das duas proteínas identificadas no tecido, as imagens moleculares foram geradas a partir dos valores de m/z oriundos da digestão teórica de cada uma dessas proteínas. Para a realização da digestão teórica foi utilizada a ferramenta de bioinformática ProteinProspector, com o auxílio do programa MS-Digest, disponível em: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>. O conjunto de

valores de  $m/z$  gerado corresponde aos íons moleculares monoprotionados de todos os fragmentos trípticos de cada proteína, gerados na presença da enzima tripsina.

Para obter maior especificidade da distribuição da proteína no tecido, utilizamos somente as imagens moleculares geradas pela superposição de todos os valores de  $m/z$  dos peptídeos trípticos de cada proteína precursora. O procedimento descrito foi realizado para os indivíduos não agressivos e para os indivíduos que tiveram o seu comportamento agressivo estimulado. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 17. Inicialmente, foi obtida a imagem gerada pela superposição de todos os espectros obtidos, i.e, Cromatograma de Ions Totais (TIC), o que possibilita observar regiões de maior atividade cerebral em relação à expressão de proteínas (Figura 17 A).

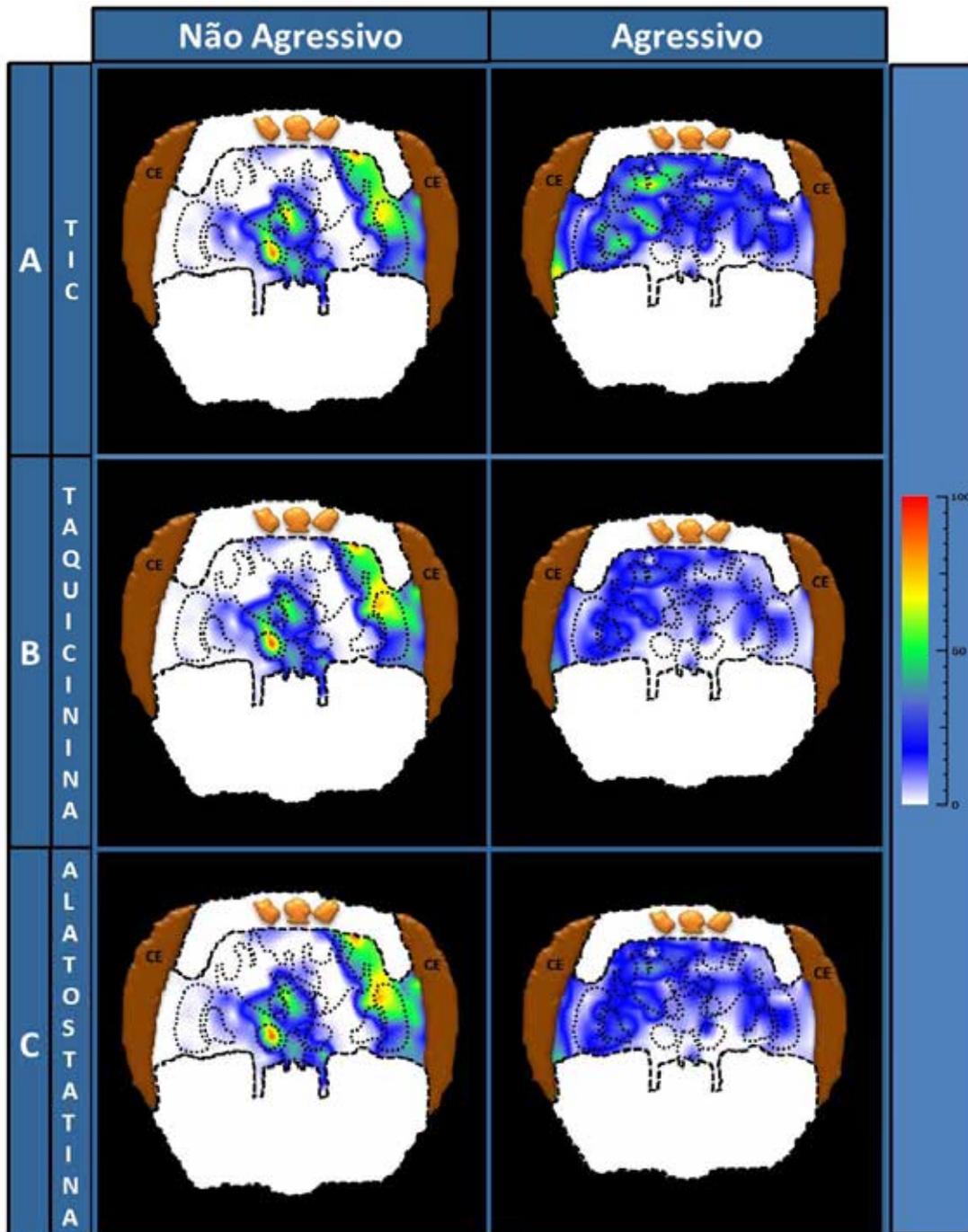
Além disso, também foram geradas imagens moleculares representando a distribuição geral das duas proteínas precursoras de neuropeptídeos – Taquicinina e Allostatina A (Figuras 17 B e C, respectivamente). Nessas imagens, o padrão de coloração representa um método semi-quantitativo baseado em uma escala de cores que varia do de 0% a 100 %. Dessa forma, regiões que apresentam maiores concentrações de proteínas estão representadas próximo da intensidade de 100%, e regiões com menores concentrações de proteínas estão representadas por cores em gradiente decrescente em intensidade.

Nas imagens correspondentes à secção do cérebro do grupo não agressivo (Figura 17 - esquerda), podemos observar um padrão de localização semelhante entre a proteína taquicinina e a allostatina. Nesse grupo observamos uma elevada detecção de proteínas em regiões específicas do cérebro, tais como lobo antenal, medula, corpo central e algumas regiões dos corpos pedunculados. A região do lobo antenal é caracterizada por ser o principal centro nervoso olfativo (centro olfativo primário), responsável por processar informações de odores captados pelas antenas; essa região também é considerada como um dos principais centros nervosos envolvidos na aprendizagem olfativa. A região da medula encontra-se no lobo óptico e auxilia no processamento de informações oriundas dos olhos compostos. O corpo central é o principal centro de controle locomotor, que integra *inputs* visuais e modula respostas motoras (*outputs*). 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. Desse modo, os dados obtidos sugerem uma intensa atividade cerebral de modo não simétrico nos centros visuais, centros olfativos e nos centros de integração sensoriais e motor.

No grupo de abelhas que tiveram o comportamento agressivo estimulado (Figura 17 - direita), observamos o mesmo padrão de localização para ambos os precursores estudados. Podemos observar, também, uma diminuição da detecção de proteínas, que se distribui para várias regiões cerebrais quando comparada ao grupo não agressivo. Esses dados sugerem que tanto as proteínas precursoras alostatina quanto a taucininina sofreram uma rápida clivagem, e sucessivo transporte dos neuropeptídeos maduros. As distribuições de proteínas observadas corroboram para a hipótese de que essas proteínas atuem como precursores de neuropeptídeos, e que possivelmente não tenham função biológica em sua forma nativa para o comportamento estudado. Em ensaios experimentais futuros, as hipóteses citadas serão investigadas com maior detalhamento.

Desse modo, a técnica desenvolvida no presente trabalho oferece uma excelente oportunidade para analisarmos a expressão de proteínas *in situ*, bem como para estudarmos os mecanismos moleculares envolvidos no comportamento social desses insetos.

**Figura 17.** Comparação do grupo não agressivo (coluna da esquerda) com o grupo em que o comportamento agressivo foi estimulado (coluna da direita). **(A)** Imagens moleculares correspondentes ao cromatograma de íons totais. **(B)** Imagens moleculares correspondentes à proteína taquicinina. **(C)** Imagens moleculares correspondentes à proteína alatostatina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para estudarmos os mecanismos moleculares envolvidos no comportamento social das abelhas foram selecionados como alvo principal deste estudo os neuropeptídeos, uma vez que essas moléculas estão envolvidas, de maneira geral, em diversas funções biológicas e são caracterizadas por ser um dos grupos de maior importância na modulação de processos

fisiológicos e comportamentais (BROCKMANN et al., 2009). Dentre a classe dos neuropeptídeos, foram selecionados alguns peptídeos pertencentes à classe das alostatinas e taquicinina devido a grande relevância biológica dessas classes de moléculas. Para a criação das imagens moleculares foram utilizados alguns neuropeptídeos descritos por (BROCKMANN et al., 2009; BOERJAN et al., 2010).

As seqüências peptídicas e as massas moleculares descritas por esses autores podem ser visualizadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequências de peptídeos descritas por Brockmann e colaboradores (2009) e Boerjan e colaboradores (2010), para as classes de neuropeptídeos taquicinas e alostatinas.

Classe de peptídeos	Massa Molecular (Da)	Seqüência Peptídica
<i>Tachykinins precursor</i>	842,36	APMGFYGT
	976,53	ALMGFQGVR-NH <sub>2</sub>
	992,47	APMGFQGMR-NH <sub>2</sub>
	997,48	APMGFYGTR-NH <sub>2</sub>
	1008,38	ASFDDEYY
	1050,47	APMGFQGMRG
	1055,49	APMGFYGTRG
	1059,54	SLEEILDEI
	1060,52	ARMGFHGM-R-NH <sub>2</sub>
	1064,59	SPFRYLGAR-NH <sub>2</sub>
	1106,55	GVMDFQIGLQ
	1142,61	IILDALEELD
	1187,63	SLEEILDEIK
	1745,96	NPRWEFRGKFGVGR-NH <sub>2</sub>
1972,97	NSIINDVKNELFPEDIN	
<i>Allatostatins precursor</i>	868,46	RQYSFGL-NH <sub>2</sub>
	912,45	GRDYSFGL-NH <sub>2</sub>
	920,51	LPVYNFGI-NH <sub>2</sub>
	994,43	AYTYVSEY
	1022,53	GRQPYSFGL-NH <sub>2</sub>
	1575,76	PNDMLSQRHYFGL-NH <sub>2</sub>
	2181,13	AYTYVSEYKRLPVYNFGI-NH <sub>2</sub>
	3013,51	AVHYSGGQPLGSKRPNDMLSQRHYFGL-NH <sub>2</sub>

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5.1 Allostatinas

Existem três famílias de alostatinas (ASTs), os peptídeos descobertos com base na sua habilidade de inibir o hormônio juvenil (JH) em insetos: (i) as alostatinas 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)<sub>6</sub>Wa (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).

No presente trabalho foram criados mapas de distribuição para alguns neuropeptídeos pertencentes à classe das alatostatinas A. Na figura 18 podemos observar os mapas de distribuição dos neuropeptídeos LPVYNFGI-NH<sub>2</sub> (m/z 921.51), AYTYVSEY (m/z 995.43), GRQPYSFGL-NH<sub>2</sub> (m/z 1023.53) e AYTYVSEYKRLPVYNFGI-NH<sub>2</sub> (m/z 2182.13).

No grupo não agressivo (Figura 18 - esquerda) podemos observar, de maneira geral, uma baixa detecção de neuropeptídeos maduros (coloração azul), que estão distribuídos em quase todas as regiões do cérebro. Todavia, nos indivíduos agressivos (Figura 18 - direita)

observamos uma intensa concentração desses peptídeos (coloração verde, amarela e vermelha) no lado esquerdo e em algumas regiões centrais, como por exemplo, na região do MB, lobo óptico (lóbula e medula), corpo central e lobos antenais, sugerindo que esses neuropeptídeos possam desempenhar uma série de funções diferentes no sistema nervoso das abelhas. Através da comparação da detecção de ASTAs entre os dois grupos estudados (Figura 18), podemos observar um padrão de localização e intensidade diferentes. Esses resultados sugerem que o estímulo ao qual as abelhas foram submetidas teve efeito no comportamento e na fisiologia desses insetos.

A intensa concentração de neuropeptídeos pertencentes à classe das alostatinas observadas no cérebro de abelhas com o comportamento agressivo estimulado sugere uma intensa atividade cerebral nesse grupo. Esse aumento de atividade pode estar envolvido com a realização de um comportamento extremamente complexo que é a agressividade. Os resultados sugerem que esse comportamento envolve quase todas as estruturas cerebrais da abelha, em especial os MBs, lobos ópticos, corpo central e lobos antenais. Esses dados podem ser mais bem compreendidos se analisarmos o envolvimento do comportamento agressivo com a realização de tarefas extremamente complexas pelo cérebro, tais como o acesso à memória, o controle da navegação, da comunicação e a integração de estímulos sensoriais, o que explicaria a intensa atividade cerebral encontrada. Desse modo, podemos inferir a partir dos dados obtidos que as ASTAs analisadas possam estar diretamente relacionadas com a regulação do comportamento agressivo em *A. mellifera*.

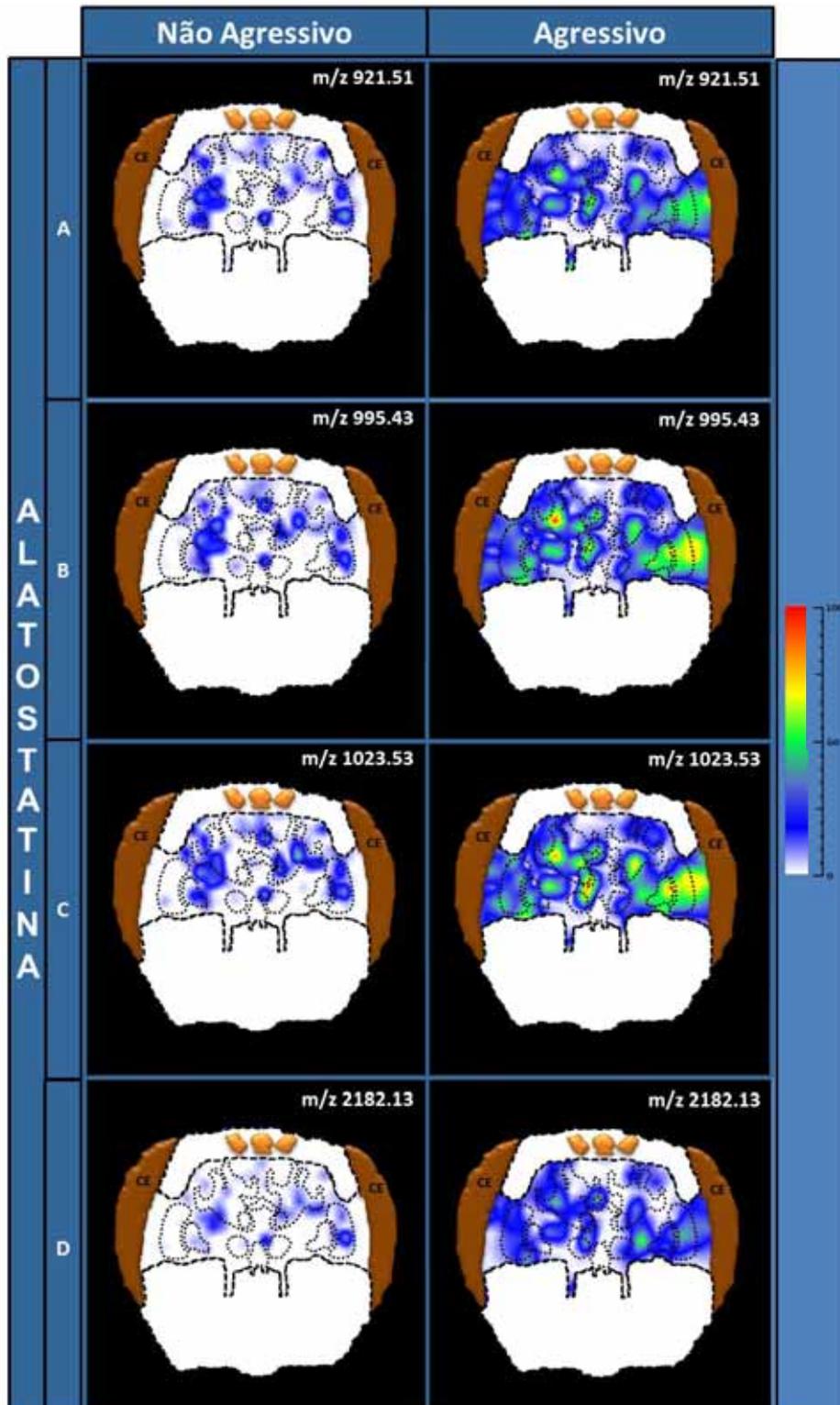
Observando as imagens moleculares das ASTAs nos indivíduos que tiveram o comportamento agressivo estimulado podemos observar que as regiões mais intensamente marcadas são as do sistema visual e os MBs. No sistema visual, podemos observar uma intensa marcação nas regiões da lóbula e medula, em especial do lado esquerdo do cérebro, indicando atuação desses peptídeos no processamento visual. 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. Desse modo, poderíamos explicar a elevada detecção de ASTAs nos indivíduos que tiveram o comportamento agressivo estimulado, uma vez que a detecção de um estímulo visual em movimento é extremamente importante para a abelha

detectar e ferocar o alvo, todavia a atividade desses peptídeos precisaria ser testada fisiologicamente para comprovar essa hipótese.

A intensa marcação nas regiões do MBs nos indivíduos estimulados poderia ser explicada devido ao aumento do processamento de informações sensoriais estimulados durante a o comportamento agressivo. Esse comportamento requer a entrada de informações sensoriais, seguido por sua interpretação e integração desses sinais para a geração de uma resposta apropriada. A estimulação da agressividade em abelhas envolve o alerta a um determinado estímulo (objeto escuro se movendo), interações sociais, liberação de feromônio de alarme (o recrutamento das demais operárias para defender a colônia), recrutamento (a defesa do ninho não é realizada em nível de indivíduo, mas em nível de colônia) e ataque. Esses fatores conferem aos MBs um papel extremamente importante para o comportamento estudado, uma vez que são responsáveis por integrar todos os *inputs* sensoriais, atuar na orientação espacial e locomoção, na formação da memória e por controlar as respostas motoras em abelhas. Os corpos pedunculados também têm sido envolvidos com a agressividade (BAIER, WITTEK e BREMBS, 2002; ROLLMANN et al., 2008; EDWARDS et al., 2009; ZWARTS et al., 2011). Em *Drosophila*, por exemplo, os MBs influenciam profundamente o comportamento agressivo, e o bloqueio de suas respostas sinápticas resultam na supressão do comportamento (BAIER, WITTEK e BREMBS, 2002). De modo similar, poderíamos especular que em *A. mellifera* essas estruturas também desempenhem um papel importante, e que os neuropeptídeos estudados atuem nessas estruturas modulando o comportamento.

A partir dos dados experimentais podemos observar, também, que alguns neuropeptídeos são menos intensamente marcados do que outros em determinadas regiões do cérebro. Se observarmos a concentração relativa do neuropeptídeo de m/z 2182.13 mostrado na figura 18 D com a concentração dos demais neuropeptídeos vamos observar uma grande diferença entre eles. Todavia, não é possível afirmarmos qual das ASTAs estudadas apresenta maior importância na modulação da agressividade, uma vez que alguns neuropeptídeos podem atuar na modulação de diferentes atividades dependendo do local de sua concentração e de sua área de atuação no sistema nervoso (STAY e TOBE, 2007; BROCKMANN et al., 2009). Desse modo, para um entendimento mais específico da atuação desses neuropeptídeos no cérebro das abelhas seriam necessários estudos adicionais.

**Figura 18.** Comparação do grupo não agressivo (coluna da esquerda) com o grupo em que o comportamento agressivo foi estimulado (coluna da direita) para alguns neuropeptídeos do grupo das alatostatinas comparando os grupos não agressivo e agressivo. **(A)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  921,51 **(B)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  995,43 **(C)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  1023,53 **(D)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  2182,13.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5.2 Taquicininas

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:  $-FX_1GX_2R-NH_2$  (sendo o  $X_1$  e o  $X_2$  variáveis). As duas primeiras TRPs identificadas foram oriundas de *C. boreali*: o nonapeptídeo CabTRP-Ia (APSGFLGMR-NH<sub>2</sub>) e o heptapeptídeo SGFLGMR-NH<sub>2</sub>, 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-NH<sub>2</sub>, APSGFNGMR-NH<sub>2</sub> e APSFGLDMR-NH<sub>2</sub> (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-NH<sub>2</sub> que atuam na regulação da atividade pilórica e gástrica em decapodas. Esses neuropeptídeos quando testados a  $10^{-6}M$ , 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 et al., 2000). O peptídeos 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 mapas de distribuição para alguns neuropeptídeos pertencentes à classe das taquicininas. Na figura 19 podemos observar os mapas de distribuição dos neuropeptídeos APMGFYGTNR-NH<sub>2</sub> (m/z 998.48), APMGFQGMNR-NH<sub>2</sub> (m/z 993.47), ARMGFHGMNR-NH<sub>2</sub> (m/z 1061.52) e NPRWEFRGKFGVNR-NH<sub>2</sub> (m/z 1746.96).

No grupo não agressivo (Figura 19 - esquerda) podemos observar, de maneira geral, uma baixa detecção de peptídeos maduros (coloração azul) que estão distribuídos em quase todas as regiões do cérebro, exceto o neuropeptídeo de m/z 1061.52 que foi detectado em

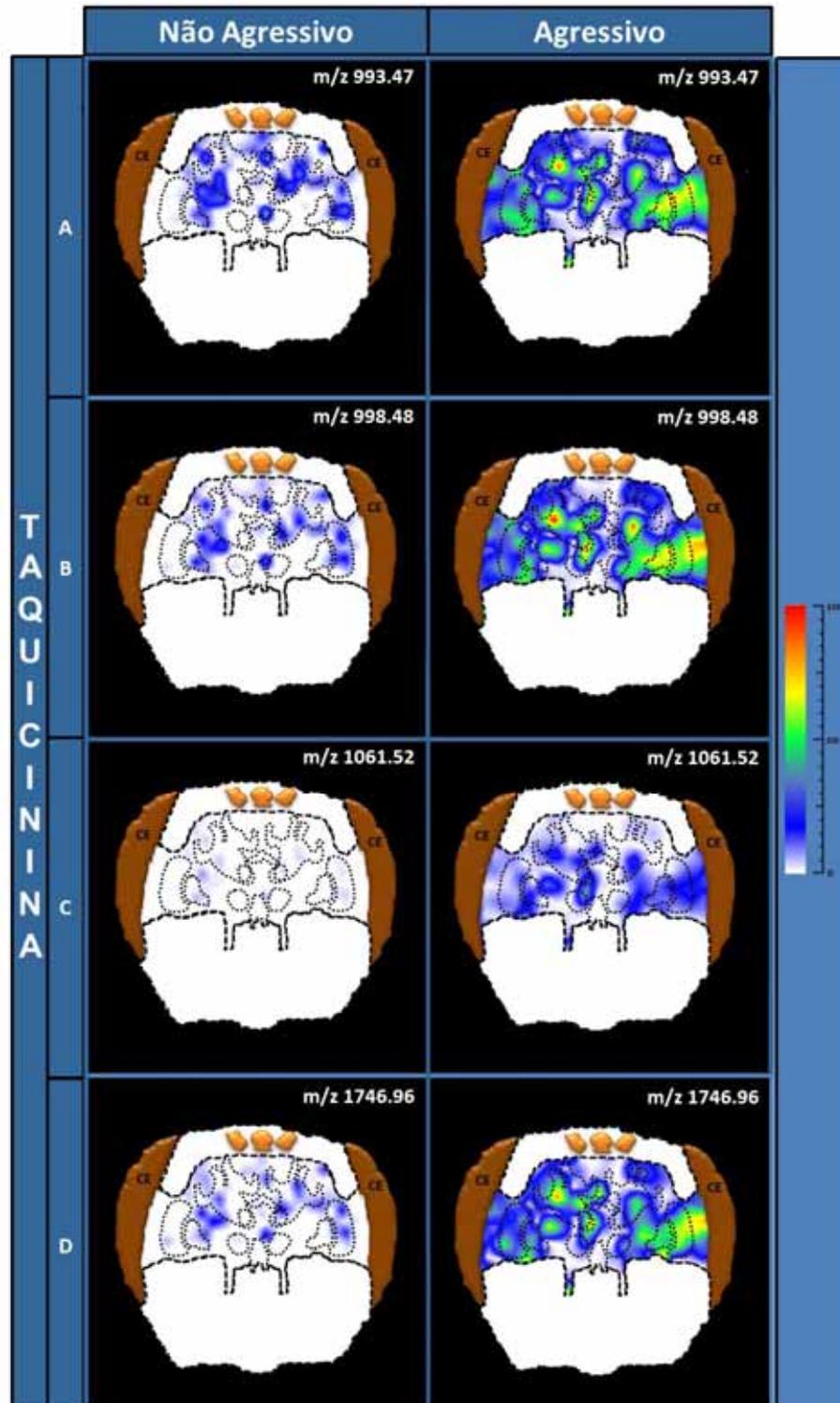
baixíssima concentração. Todavia, nos indivíduos agressivos (Figura 19 – direita) observamos uma intensa concentração de peptídeos (coloração verde, amarela e vermelha) no lado esquerdo e em algumas regiões centrais, assim como ocorrem para as ASTAs estudadas. De modo geral, todas as TRPs estudadas (Figura 19) estão distribuídas diferencialmente quando comparados os dois grupos experimentais. Essa distribuição diferencial pode indicar diferentes alvos, e, possivelmente, diferentes ações e papéis funcionais dos diferentes neuropeptídeos estudados.

Para o grupo da agressividade podemos observar um grande aumento no padrão de expressão de peptídeos, o que sugere uma intensa atividade cerebral nesses organismos. As mudanças bioquímicas no cérebro desses insetos parecem mediar mudanças no comportamento. Os resultados sugerem, ainda, que as respostas comportamentais geradas envolvam a atuação de diferentes estruturas cerebrais, em especial os MBs e os lobos ópticos (medula e lóbula), que desempenham papéis importantes na integração e interpretação dos estímulos. Desse modo, podemos inferir que as TRPs analisadas possam estar envolvidas com a regulação do comportamento agressivo em *A. mellifera*, assim como foi observado para os neuropeptídeos ASTs.

Os dados experimentais também demonstram que alguns neuropeptídeos, como por exemplo, o ARMGFHGMR-NH<sub>2</sub> (m/z 1061.52) estava presente em concentrações ínfimas no grupo não agressivo e posteriormente foi encontrado em concentração relativamente alta no grupo agressivo, fortalecendo a hipótese de que esse neuropeptídeo tenha papel importante na modulação do comportamento agressivo. Como mencionado para as ASTAs, podemos estender para as TRPs, que alguns neuropeptídeos podem atuar na modulação de diferentes atividades dependendo de sua concentração e de sua área de atuação no sistema nervoso central (STAY e TOBE, 2007; BROCKMANN et al., 2009). Todavia, para um entendimento mais específico da atuação dos neuropeptídeos TRPs no cérebro das abelhas seriam necessários estudos adicionais.

Em suma, os dados discutidos anteriormente para as proteínas precursoras de neuropeptídeos (diminuição da concentração das proteínas taquicininas e alatostatina no grupo agressivo quando comparado ao grupo não agressivo – Figura 17) e os dados de imageamento molecular dos neuropeptídeos ASTAs e TRPs, convergem para fortalecer a hipótese de que os precursores AST e TRP sofrem uma rápida clivagem e sucessivo transporte dos neuropeptídeos maduros para as diferentes regiões do cérebro, sendo esse processo diretamente relacionado com a modulação do comportamento agressivo em *A. mellifera*.

**Figura 19.** Comparação do grupo não agressivo (coluna da esquerda) com o grupo em que o comportamento agressivo foi estimulado (coluna da direita) para alguns neuropeptídeos do grupo das taquicininas comparando os grupos não agressivo e agressivo. **(A)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo taquicinina com  $m/z$  993,47 **(B)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  1056,49 **(C)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  1061,52 **(D)** Imagens moleculares correspondentes ao neuropeptídeo alatostatina com  $m/z$  1973,97.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6 CONCLUSÃO

A técnica de MSI é altamente eficaz para o estudo da distribuição de moléculas de interesse, pois a espotagem/impressão e a subsequente análise por espectrometria de massas, fornecem uma enorme quantidade de dados de elevada qualidade, que permitem não só identificar como localizar as proteínas e peptídeos nos diferentes compartimentos teciduais, e adicionalmente conhecer suas concentrações relativas. Nesse contexto, por correlacionar a histologia com informações moleculares, a técnica apresenta um grande potencial para a investigação da dinâmica espaço-temporal dos processos bioquímicos em curso nos sistemas neurobiológicos.

Os resultados obtidos são extremamente funcionais, proporcionando a visualização da distribuição diferencial de proteínas e neuropeptídeos *in situ* no cérebro de abelhas *A. mellifera*. Sugere-se, também, que os neuropeptídeos pertencentes às classes ASTAs e TRPs sejam oriundos de uma rápida clivagem dos seus precursores e sucessivo transporte dos neuropeptídeos maduros para as diferentes regiões do cérebro, onde essas moléculas atuam mediando mudanças comportamentais.

Nesse estudo, observou-se também a alteração do perfil neuropeptídico ao compararmos os indivíduos submetidos à estimulação do comportamento agressivo com os indivíduos de mesma idade que não foram submetidos a esse estímulo. Esses dados sugerem que os neuropeptídeos estudados possam estar envolvidos com a modulação do comportamento agressivo em abelhas.

Em suma, pretendeu-se ampliar a compreensão de informações que complementem os estudos genéticos e moleculares realizados até o presente momento na tentativa de elucidar a complexidade molecular dos sistemas biológicos e que possam auxiliar, também, na melhor compreensão das bases moleculares envolvidas no complexo repertório de comportamento social apresentado pelas abelhas. No futuro, a técnica agora estabelecida será utilizada na tentativa de contribuir para a compreensão de processos biológicos complexos, tais como aprendizagem, memória e a modulação de diferentes comportamentos sociais.

O presente projeto também foi importante por contribuir na formação de recursos humanos na área de desenvolvimento de novas tecnologias em imageamento molecular, com aplicações em Análise Proteômica e Peptidômica.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, F. Analytical atomic spectrometry and imaging: Looking backward from 2020 to 1975. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, p. 738–745, 2008.
- ADAMS, F.; VAN VAECK, L.; BARRETT, R. Advanced analytical techniques: platform for nano materials science. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 60, p. 13–26, 2005.
- AERNI, H. R.; CORNETT, D. S.; CAPRIOLI, R. M. Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, n. 3, p. 827–834, 2006.
- ALAUX, C.; SINHA, S.; HASADSRI, L.; HUNT, G.J.; GUZMÁN-NOVOA, E.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; URIBE-RUBIO, J.L.; SOUTHEY, B.R.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ROBINSON, D.E. Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 36, n. 106, p. 1073–1079, 2009.
- ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMAO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: Bring-ing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 398, p. 265–294, 2010.
- ALTELAAR, A. F. M.; KLINKERT, I.; DE LANGE R. P. J.; ADAN, R. A. H.; HEEREN, R. M. A.; PIERSMA, S. R. Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry. **Analytical chemistry**, Washington, v. 78, p.734–742, 2006.
- ANDERSSON, M.; GROSECLOSE, M. R.; DEUTCH, A. Y.; CAPRIOLI, R. M. Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction. **Nature Methods**, London, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2008.
- ANGEL, P. M.; SPRAGGINS, J. M.; BALDWIN, H. S.; CAPRIOLI, R. Enhanced sensitivity for high spatial resolution lipid analysis by negative ion mode matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, n. 3, p. 1557–1564, 2012.
- BAIER, A.; WITTEK, B.; BREMBS, B. *Drosophila* as a new model organism for the neurobiology of aggression? **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, p. 1233–1240, 2002.
- BALLUFF, B.; ELSNER, M.; KOWARSCH, A.; RAUSER, S.; MEDING, S.; SCHUHMACHER, C.; FEITH, M.; HERRMANN, K.; ROCKEN, C.; SCHMID, R. M.; HOFLE, H.; WALCH, A.; EBERT, M. P. Classification of HER2/neu Status in Gastric Cancer Using a Breast-Cancer Derived Proteome Classifier. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n.12, p. 6317–6322, 2010.

BALUYA, D. L.; GARRETT, T. J.; YOST, R. A. An Automated MALDI Matrix Deposition Method with Inkjet Printing for Imaging Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, p. 6882–6867, 2007.

BAUER, J. A.; CHAKRAVARTHY, A. B.; ROSENBLUTH, J. M.; MI, D.; SEELEY, E. H.; DE MATOS GRANJA-INGRAM, N.; OLIVARES, M. G.; KELLEY, M. C.; MAYER, I. A.; MESZOELY, I. M.; MEANS-POWELL, J. A.; JOHNSON, K. N.; TSAI, C. J.; AYERS, G. D.; SANDERS, M. E.; SCHNEIDER, R. J.; FORMENTI, S. C.; CAPRIOLI, R. M.; PIETENPOL, J. A. Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 16, p. 681–690, 2010.

BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. **Methods in Enzymology**, New York, v. 270, p. 519–551, 1996.

BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 3, p. 436–439, 1989.

BEAVIS, R. C.; CHAUDHARY, T.; CHAIT, B. T.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry. **Organic Mass Spectrometry**, London, v. 27, n. 2, p. 156–158, 1992.

BECK, G.; SUGIURA, Y.; SHINZAWA, K.; KATO, S.; SETOU, M.; TSUJIMOTO, Y.; SAKODA, S.; SUMI-AKAMARU, H. Neuroaxonal Dystrophy in Calcium-Independent Phospholipase A(2)beta Deficiency Results from Insufficient Remodeling and Degeneration of Mitochondrial and Presynaptic Membranes. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 31, p. 11411–11420, 2011.

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

BENDENA, W. G.; GARSIDE, C. S.; YU, C. G.; TOBE, S. S. Allatostatins: Diversity in structure and function of an insect neuropeptide family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 814, p. 53–66, 1997.

BENNINGHOVEN, A. Die analyse monomolekularer Festkorperoberflachenschichten mit Hilfe der Sekunda'rionenemission. **Zeitschrift fuer Physik**, Berlin, v. 230, p. 403–417, 1970.

BICH, C.; TOUBOUL, D.; BRUNELLE, A. Study of experimental variability in TOF-SIMS mass spectrometry imaging of biological samples. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 337, p. 43–49, 2013.

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

BORNSEN, K. O. Influence of salts, buffers, detergents, solvents, and matrices on MALDI-MS protein analysis in complex mixtures. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 146, p. 387–404, 2000.

BORST, A. *Drosophila's* view on insect vision. **Current Biology**, London, v. 19, p. R36–R47, 2009.

BOULYGA, S. F. Mass spectrometric analysis of long-lived radionuclides in bio-assays. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 307, p. 200–210, 2011.

BOXER, S. G.; KRAFT, M. L.; WEBER, P. K. Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples. **Annual Review of Biophysics**, Palo Alto, v. 38, p. 53–74, 2009.

BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M.; HEGE, H. C. AND MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 492, p. 1–19, 2005.

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**, Washington, v. 106, n. 7, p. 2383–2388, 2009.

BROWN, R. S.; LENNON, J. J. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, p. 1998–2003, 1995.

BYRNE, M. E.; BALL, D. A.; GUERQUIN-KERN, J. L.; ROUILLER, I.; WU, T. D.; DOWNING, K. H.; VALI, H.; KOMEILI, A. Desulfovibrio magneticus RS-1 contains an iron- and phosphorus-rich organelle distinct from its bullet-shaped magnetosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 12263–12268, 2010.

CALDWELL, R. L.; GONZALEZ, A.; OPPENHEIMER, S. R.; SCHWARTZ, H. S.; CAPRIOLI, R. M. Molecular assessment of the tumor protein microenvironment using imaging mass spectrometry. **Cancer Genomics and Proteomics**, Stanford, v. 3, p. 279–288, 2006.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de Peptídeos usando Espectrometria de Massas: Um guia prático. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.

CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, p. 4751–4760, 1997.

- CASADONTE, R.; CAPRIOLI, R. M. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. **Nature Protocols**, London, v. 6, n. 11, p. 1695–1709, 2011.
- CASTAING, R.; SLODZIAN, G. Microanalyse par emission ionique secondaire. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 1, p. 395–410, 1962.
- CAZARES, L. H.; TROYER, D.; MENDRINOS, S.; LANCE, R. A.; NYALWIDHE, J. O.; BEYDOUN, H. A.; CLEMENTS, M. A.; DRAKE, R. R.; SEMMES, O. J. Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 15, p. 5541–5551, 2009.
- CHABALA, J. M.; SONI, K. K.; LI, J.; GAVRILOV, K. L.; LEVI-SETTI, R. High-Resolution Chemical Imaging with Scanning Ion Probe SIMS. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, Amsterdam, v. 143, p. 191–212, 1995.
- CHANSELA, P.; GOTO-INOUE, N.; ZAIMA, N.; SROYRAYA, M.; SOBHON, P.; SETOU, M. Visualization of neuropeptides in paraffin-embedded tissue sections of the central nervous system in the decapod crustacean, *Penaeus monodon*, by imaging mass spectrometry. **Peptides**, New York, v. 34, n. 1, p. 10–18, 2012.
- CHAURAND, P.; FOUCHÉCOURT, S.; DAGUE, B. B.; XU, B. J.; REYZER, M. L.; ORGEBIN-CRIST, M. C.; CAPRIOLI, R. M. Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, p. 2221–2239, 2003.
- CHAURAND, P.; NORRIS, J. L.; CORNETT, D. S.; MOBLEY, J. A.; CAPRIOLI, R. M. New Developments in Profiling and Imaging of Proteins from Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 11, p. 2889–2900, 2006.
- CHAURAND, P.; SCHWARTZ, S. A.; BILLHEIMER, D.; XU, B. J.; CRECELIUS, A.; CAPRIOLI, R. M. Integrating histology and imaging mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, n. 4, p. 1145–1155, 2004.
- CHEN, H. W.; GAMEZ, G.; ZENOBI, R. What can we learn from ambient ionization techniques? **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 20, p. 1947–1963, 2009.
- CHEN, L. C.; YOSHIMURA, K.; YU, Z.; IWATA, R.; ITO, H.; SUZUKI, H.; MORI, K.; ARIYADA, O.; TAKEDA, S.; KUBOTA, T.; HIRAOKA, K. Ambient imaging mass spectrometry by electrospray ionization using solid needle as sampling probe. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 44, p. 1469–1477, 2009a.
- CHEN, R.; HUI, L.; STURM, R. M.; LI, L. Three Dimensional Mapping of Neuropeptides and Lipids in Crustacean Brain by Mass Spectral Imaging. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 20, p. 1068–1077, 2009b.

- CHEN, Z. Y.; BOGAERTS, A.; VERTES, A. Phase explosion in atmospheric pressure infrared laser ablation from water-rich targets. **Applied Physics Letters**, New York, v. 89, 041503, 2006.
- CHEN, Z. Y.; VERTES, A. Early plume expansion in atmospheric pressure midinfrared laser ablation of water-rich targets. **Physical Review E**, New York, v. 77, 2008.
- CHRISTIE A. E.; STEMMLER E. A.; DICKINSON P. S. Crustacean neuropeptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, p. 4135–4169, 2010.
- CHUGHTAI, K.; HEEREN, R. M. A. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 110, p. 3237–3277, 2010.
- 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.
- COELLO, Y.; JONES, A. D.; GUNARATNE, T. C.; DANTUS, M. Atmospheric pressure femtosecond laser imaging mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 2753–2758, 2010.
- COHEN, S. L.; CHAIT, B. T. Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 31–37, 1996.
- COLLIVER, T. L.; BRUMMEL, C. L.; PACHLOSKI, M. L.; SWANEK, F. D.; EWING, A. G.; WINOGRAD, N. Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS. **Analytical chemistry**, Washington, v. 69, p. 2225–2231, 1997.
- COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M. Ambient mass spectrometry. **Science**, Washington, v. 311, p. 1566–1570, 2006.
- CORNETT, D. S.; MOBLEY, J. A.; DIAS, E. C.; ANDERSSON, M.; ARTEAGA, C. L.; SANDERS, M. E.; CAPRIOLI, R. M. A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, p. 1975–1983, 2006.
- COSTA, A. B.; COOKS, R. G. Simulated splashes: Elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 464, p. 1–8, 2008.
- CRECELIUS, A.; GOTZ, A.; ARZBERGER, T.; FROHLICH, T.; ARNOLD, G. J.; FERRER, I.; KRETZSCHMAR, H. A. Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, p. 1276–1291, 2008.
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de Massa de Proteínas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 36, 2006.
- DEKEYSER, S. S.; KUTZ-NABER, K. K.; SCHMIDT, J. J.; BARRETT-WILT, G. A.; LI, L. J. Imaging mass spectrometry of neuropeptides in decapod crustacean neuronal tissues. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6; p. 1782–1791, 2007.

DEKKER, L. J. M.; VAN, K. J. J. A.; REEDIJK, M. L.; BURGERS, P. C.; GRUTERS, R. A.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; LUIDER, T. M. A mass spectrometry based imaging method developed for the intracellular detection of HIV protease inhibitors. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 23, n. 8, p. 1183–1188, 2009.

DELVOLVE, A. M.; WOODS, A. S. Optimization of automated matrix deposition for biomolecular mapping using a spotter. **Journal of mass spectrometry**, Chichester, v. 46, n. 10, p. 1046–1050, 2011.

DEMPSTER, A.J. A New Method of Positive Ray Analysis. **Physical Review**, New York, v. 11, n. 4, p. 316–325, 1918.

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.

DJIDJA, M. C.; CLAUDE, E.; SNEL, M. F.; SCRIVEN, P.; FRANCESE, S.; CAROLAN, V.; CLENCH, M. R. MALDI-ion mobility separation-mass spectrometry imaging of glucose-regulated protein 78 kDa (Grp78) in human formalin-fixed, paraffin-embedded pancreatic adenocarcinoma tissue sections. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 8, p. 4876–4884, 2009.

DUHUTREL, P.; BORDAT, C.; WU, T. D.; ZAGOREC, M.; GUERQUIN-KERN J. L.; CHAMPOMIER-VERGES, M. C. Iron Sources Used by the Nonpathogenic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* as Revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary-Ion Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 560–565, 2010.

DUJARDIN F. Mémoire sur le système nerveux des insectes. **Annales des sciences naturelles**, Paris, v. 14, p. 195–206, 1850.

DUVE, H.; JOHNSEN, A. H.; MAESTRO, J. L.; SCOTT, A. G.; WINSTAN-LEY, D.; DAVEY, M.; EAST, P. D.; THORPE, A. Lepidopteran peptides of the allatostatin superfamily. **Peptides**, New York, v. 18, p. 1301–1309, 1997.

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.

EBERLIN, L. S.; DILL, A. L.; COSTA, A. B.; IFA, D. R.; CHENG, L.; MASTERSON, T.; KOCH, M.; RATLIFF, T. L.; COOKS R. G. Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, n. 9, p. 3430–3434, 2010.

EBERLIN, L. S.; NORTON, I.; DILL, A. L.; GOLBY, A. J.; LIGON, K. L.; SANTAGATA, S.; COOKS R. G.; AGAR, N. Y. R. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. **Cancer Research**, Baltimore, v. 72, n. 3, p. 645–654, 2012.

EBERLIN, L. S.; NORTON, I.; ORRINGER, D.; DUNN, I.F.; LIU, X.; IDE, J. L.; JARMUSCH, A. K.; LIGON, K. L.; JOLESZ, F. A.; GOLBY, A. J.; SANTAGATA, S.; AGAR, N. Y. R.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry for the intraoperative molecular diagnosis of human brain tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 5, p. 1611–1616, 2013.

EDWARDS, A. C.; ZWARTS, L.; YAMAMOTO, A.; CALLAERTS, P.; MACKAY, T. F. C. Mutations in many genes affect aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. **BMC Biology**, v. 7, p. 29–42, 2009.

EIPPER, B. A.; STOFFERS, D. A.; AND MAINS, R. E. The Biosynthesis of Neuropeptides: Peptide alpha-Amidation. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 15, p. 57–85, 1992.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; JOSEPH BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 44, n. 3, p. 210–230, 2009.

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

ELSNER, M.; RAUSER, S.; MAIER, S.; SCHÖNE, C.; BALLUFF, B.; MEDING, S.; JUNG, G.; NIPP, M.; SARIOGLU, H.; MACCARRONE, G.; AICHLER, M.; FEUCHTINGER, A.; LANGER, R.; JÜTTING, U.; FEITH, M.; KÜSTER, B.; UEFFING, M.; ZITZELSBERGER, H.; HÖFLER, H.; WALCH, A. MALDI imaging mass spectrometry reveals COX7A2, TAGLN2 and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett's adenocarcinoma. **Journal of Proteomics**, Netherlands, v. 75, n. 15, p. 4693–4704, 2012.

ENTHALER, B.; BUSSMANN, T.; PRUNS, J. K.; RAPP, C.; FISCHER, M.; VIETZKE, J. P. Influence of various on-tissue washing procedures on the entire protein quantity and the quality of matrix-assisted laser desorption/ionization spectra. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 27, p. 878–884, 2013.

ESQUENAZI, E.; YANG, Y. Y.; WATROUS, J.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, E. Imaging mass spectrometry of natural products. **Natural Product Report**, v. 26, p. 1521–1534, 2009.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, Washington, v. 246, p. 64–71, 1989.

FERRER, I.; SANTPERE, G.; ARZBERGER, T.; BELL, J.; BLANCO, R.; BOLUDA, S.; BUDKA, H.; CARMONA, M.; GIACCONE, G.; KREBS, B.; LIMIDO, L.; PARCHI, P.; PUIG, B.; STRAMMIELLO, R.; STROBEL, T.; KRETZSCHMAR, H. Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, Pittsburgh, v. 66, n. 1, p. 35–46, 2007.

- FRANCK, J.; ARAFAH, K.; BARNES, A.; WISZTORSKI, M.; SALZET, M.; FOURNIER, I. Improving tissue preparation for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Part 1: Using microspotting. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, p. 8193–8202, 2009.
- FRANZEN, B.; YANG, Y.; SUNNEMARK, D.; WICKMAN, M.; OTTERVALD, J.; OPPERMANN, M.; SANDBERG, K. Dihydropyrimidinase related protein-2 as a biomarker for temperature and time dependent post mortem changes in the mouse brain proteome. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, p. 1920–1929, 2003.
- FREE, J. B. Defesa da colônia em: FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: EPU, EDUSP. Coleção Temas de Biologia, v. 13, p. 34–40, 1980.
- FRICKER, L. D. Neuropeptide-processing enzymes: applications for drug discovery. **AAPS Journal**, v. 7, n. 2, p. 449–455, 2005.
- GALHENA, A. S.; HARRIS, G. A.; NYADONG, L.; MURRAY, K. K.; FERNANDEZ, F. M. Small molecule ambient mass spectrometry imaging by infrared laser ablation metastable-induced chemical ionization. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 2178–2181, 2010.
- GLANTZ, R. M.; MILLER C. S.; NÄSSEL D. R. Tachykinin-related peptide and GABA-mediated presynaptic inhibition of crayfish photoreceptors. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 20, p. 1780–1790, 2000.
- GOLDSTEIN, E. Über eine noch nicht untersuchte Strahlungsform an der Kathodeinducirter Entladungen. **Berlin Akd. Monatsber**, II, p. 691, 1886.
- GOODWIN, R. J.; PENNINGTON, S. R.; PITT, A. R. Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, p. 3785–3800, 2008.
- GORMAN, J. J.; FERGUSON, B. L.; NGUYEN, T. B. Use of 2,6-dihydroxyacetophenone for analysis of fragile peptides, disulphide bonding and small proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 10, n. 5, p. 529–536, 1996.
- GREEN, F. M.; SALTER, T. L.; GILMORE, I. S.; STOKES, P.; O'CONNOR, G. The effect of electrospray solvent composition on desorption electrospray ionisation (DESI) efficiency and spatial resolution. **Analyst**, London, v. 135, p. 731–737, 2010.
- GREER, T.; STURM, R.; LI, L. Mass spectrometry imaging for drugs and metabolites. **Journal of Proteomics**, Netherlands, v. 74, p. 2617–2631, 2011.
- GREY, A. C.; SCHEY, K. L. Age-Related Changes in the Spatial Distribution of Human Lens  $\alpha$ -Crystallin Products by MALDI Imaging Mass Spectrometry. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Philadelphia, v. 50, p. 4319–4329, 2009.
- GROSECLOSE, M. R.; ANDERSSON, M.; HARDESTY, W. M.; CAPRIOLI, R. M. Identification of proteins directly from tissue: *in situ* tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 42, n. 2, p. 254–262, 2007.

GROSECLOSE, M. R.; MASSION, P. P.; CHAURAND, P.; CAPRIOLI, R. M. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, n. 18, p. 3715–3724, 2008.

GUERQUIN-KERN, J. L.; WU, T. D.; QUINTANA, C.; CROISY, A. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1724, p. 228–238, 2005.

GUNNARSSON, A., KOLLMER, F., SOHN, S., HÖÖK, F. AND SJÖVALL, P. Spatial-Resolution Limits in Mass Spectrometry Imaging of Supported Lipid Bilayers and Individual Lipid Vesicles. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, n. 6, p. 2426–2433, 2010.

GUSTAFSSON, J. O. R.; MCCOLL, S. R.; HOFFMANN, P. Imaging mass spectrometry and its methodological application to murine tissue. **Journal of Proteomics and Bioinformatics**, v. 1, p. 458–463, 2008.

GUSTAFSSON, J. O. R.; OEHLER, M. K.; MCCOLL, S. R.; HOFFMANN, P. Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, p. 4315–4328, 2010.

GUSTAFSSON, J. O. R.; OEHLER, M. K.; RUSZKIEWICZ, A.; MCCOLL, S. R.; HOFFMANN, P. MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)–Application of Spatial Proteomics for Ovarian Cancer Classification and Diagnosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 773–794, 2011.

HADDAD, D.; SCHAUPP, F.; BRANDT, R.; MANZ, G.; MENZEL, R.; HAASE, A. NMR imaging of the honeybee brain. **Journal of Insect Science**, v. 4, n. 7, disponível on-line em: [insectscience.org/4.7](http://insectscience.org/4.7), 2004.

HAN, J.; SCHEY, K. L. MALDI tissue imaging of ocular lens alpha-crystallin. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Philadelphia, v. 47, p. 2990–2996, 2006.

HANCOCK, J. F. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 7, p. 456–462, 2006.

HANKIN, J. A.; BARKLEY, R. M.; MURPHY, R. C. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 18, p. 1646–1652, 2007.

HANRIEDER, J.; LJUNGDAHL, A.; ANDERSSON, M. MALDI imaging mass spectrometry of neuropeptides in Parkinson's disease. **Journal of Visualized Experiments**, v. 60, e3445, 2012.

HANRIEDER, J.; LJUNGDAHL, A.; FAELTH, M.; MAMMO, S. E.; BERGQUIST, J.; ANDERSSON, M. L-DOPA-induced Dyskinesia is Associated with Regional Increase of Striatal Dynorphin Peptides as Elucidated by Imaging Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n.10, M111.009308, 2011.

HANRIEDER, J.; PHAN, N. T. N.; KURCZY, M. E.; EWING, A. G. Imaging Mass Spectrometry in Neuroscience. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, p. 666–679, 2013.

HARRIS, G.A.; GALHENA, A. S.; FERNANDEZ, F. M. Ambient sampling/ionization mass spectrometry: Applications and current trends. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, p. 4508–4538, 2011.

HERBERT, Z.; RAUSER, S.; WILLIAMS, L.; KAPAN, N.; GUENTNER, M.; WALCH, A.; BOYAN, G. Developmental expression of neuromodulators in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. **Journal of Morphology**, New York, v. 271, n. 12, 1509–1526, 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**, Washington, v. 11, n. 3, p. 1485–1493, 2012.

HERRING, K. D.; OPPENHEIMER, S. R.; CAPRIOLI, R. M. Direct tissue analysis by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: application to kidney biology. **Seminars in Nephrology**, Philadelphia, v. 27, p. 597–608, 2007.

HUANG, M. Z.; CHENG, S. C.; CHO, Y. T.; SHIEA, J. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 702, p. 1–15, 2011.

HUANG, M. Z.; YUAN, C. H.; CHENG, S. C.; CHO, Y. T.; SHIEA, J. Ambient ionization mass spectrometry. **Annual review of analytical chemistry**, Washington, v. 3, p. 43–65, 2010.

HUI, L.; ZHANG, Y.; WANG, J.; COOK, A.; YE, H.; NUSBAUM, M. P.; LI, L. Discovery and functional study of a novel crustacean tachykinin neuropeptide. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 2, p. 711–722, 2011.

HUMMON, A. B.; AMARE, A.; SWEEDLER, J. V. Discovering new invertebrate neuropeptides using mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 25, n. 1, p. 77–98, 2006.

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

IFA, D. R.; WISEMAN, J. M.; SONG, Q. Y.; COOKS, R. G. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 259, p. 8–15, 2007.

IFA, D. R.; WU, C. P.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: Current progress and preview. **Analyst**, London, v. 135, p. 669–681, 2010.

IKEDA, T.; MINAKATA, H.; NOMOTO, K. The importance of C-terminal residues of vertebrate and invertebrate tachykinins for their contractile activities in gut tissues. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 461, p. 201–204, 1999.

INOUE, M.; RASHID, M. H.; FUJITA, R.; CONTOS, J. J. A.; CHUN, J.; UEDA, H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. **Nature Medicine**, New York, v. 10, p. 712–718, 2004.

JASKOLLA, T. W.; KARAS, M. Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 22, p. 976–988, 2011.

JIA, C.; HUI, L.; CAO, W.; LIETZ, C. B.; JIANG, X.; CHEN, R.; CATHERMAN, A. D.; THOMAS, P. M.; GE, Y.; KELLEHER, N. L.; LI, L. High-definition *De Novo* Sequencing of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH)-family Neuropeptides. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 1951–1964, 2012.

JONES, E. A.; SCHMITZ, N.; WAAIJER, C.; FRESE, D. K.; VAN REMOORTERE, A.; VAN ZEIJL, R. J. M.; HECK, A. J. R.; HOGENDOORN, P. C. W.; DEELDER, A. M.; ALTELAAR, A. F. M.; BOVÉE, J. V. M. G.; MCDONNELL, L. A. Imaging Mass Spectrometry Based Molecular Histology Differentiates Microscopically Identical and Heterogeneous Tumors. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, p. 1847–1855, 2013.

JURINKE, C.; OETH, P.; VAN DEN BOOM, D. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, n. 2, p. 147–164, 2004.

KAI, Z.; HUANG, J.; XIE, Y.; TOBE, S. S.; LING, Y.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. C.; YANG, X. L. Synthesis, biological activity, and hologram quantitative structure–activity relationships of novel allatostatin analogues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 2652–2658, 2010.

KALB, J.; EGELHAAF, M.; KURTZ, R. Adaptation of velocity encoding in synaptically coupled neurons in the fly visual system. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 28, p. 9183–9193, 2008.

KALMYKOV, S. N.; KRIVENTSOV, V. V.; TETERIN, Y. A.; NOVIKOV, A. P. Plutonium and neptunium speciation bound to hydrous ferric oxide colloids. **Comptes Rendus Chimie**, v. 10, p. 1060–1066, 2007.

KANG, S.; SHIM, H. S.; LEE, J. S.; KIM, D. S.; KIM, H. Y.; HONG, S. H.; KIM, P. S.; YOON, J. H.; CHO, N. H. Molecular proteomics imaging of tumor interfaces by mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, p. 1157–1164, 2010.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, Amsterdam, v. 78, p. 53–68, 1987.

KARAS, M.; KRUGER, R. Ion formation in MALDI. **Chemical Reviews**, Washington, v. 103, p. 427–439, 2003.

KASTIN, A.J. **Handbook of Biologically Active Peptides**. Elsevier, 2ed., 2013.

KOIZUMI, S.; HAYASAKA, T.; GOTO-INOUE, N.; DOI, K.; SETOU, M.; NAMBA, H. Imaging Mass Spectrometry Evaluation of the Effects of Various Irrigation Fluids in a Rat Model of Postoperative Cerebral Edema. **World Neurosurgery**, v. 77, p. 153–159, 2012.

KOIZUMI, S.; YAMAMOTO, S.; HAYASAKA, T.; KONISHI, Y.; YAMAGUCHI-OKADA, M.; GOTO-INOUE, N.; SUGIURA, Y.; SETOU, M.; NAMBA, H. Imaging Mass Spectrometry Revealed the Production of Lyso-Phosphatidylcholine in the Injured Ischemic Rat Brain. **Neuroscience**, Oxford, v. 168, p. 219–225, 2010.

KOLLIPARA, S.; AGARWAL, N.; VARSHNEY, B.; PALIWAL, J. Technological Advancements in Mass Spectrometry and Its Impact on Proteomics. **Analytical Letters**, New York, v. 44, n. 8, p. 1498–1520, 2011.

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.

KREISSL, S.; STRASSER, C.; GALIZIA, C. G. Allatostatin Immunoreactivity in the Honeybee Brain. **The Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 518, p. 1391–1417, 2010.

KRUSE, R.; SWEEDLER, J. V. Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 14, p. 752–759, 2003.

KUTZ, K. K.; SCHMIDT, J. J.; LI, L. In Situ Tissue Analysis of Neuropeptides by MALDI FTMS In-Cell Accumulation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, p. 5630–5640, 2004.

LEMAIRE, R.; MENGUELLET, S. A.; STAUBER, J.; MARCHAUDON, V.; LUCOT, J. P.; COLLINET, P.; FARINE, M. O.; VINATIER, D.; DAY, R.; DUCOROY, P.; SALZET, M.; FOURNIER, I. Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, reg  $\alpha$ -fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6, p. 4127–4134, 2007.

LEMAIRE, R.; WISZTORSKI, M.; DESMONS, A.; TABET, J. C.; DAY, R.; SALZET, M.; FOURNIER, I. MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 7145–7153, 2006.

LENZ, C.; WILLIAMSON, M.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. Molecular Cloning and Genomic Organization of an Allatostatin Preprohormone from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 273, p. 1126–1131, 2000.

LI, B.; HANSEN, S. H.; JANFELT, C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 348, p. 15–22, 2013.

LIEBL, H. Ion Microprobe Mass Analyzer. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 38, n.13, p. 5277–5284, 1967.

LJUNGDAHL, A.; HANRIEDER, J.; FAELTH, M.; BERGQUIST, J.; ANDERSSON, M. Imaging Mass Spectrometry Reveals Elevated Nigral Levels of Dynorphin Neuropeptides in L-DOPA-Induced Dyskinesia in Rat Model of Parkinson's Disease. **PLoS One**, v. 6, n. 9, e25653, 2011.

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.

LUNDBLAD, M.; PICCONI, B.; LINDGREN, H.; CENCI, M. A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease**, San Diego, v. 16, p. 110–123, 2004.

M'KOMAA, A. E.; BLUMA, D. L.; NORRISB, J. L.; KOYAMA, T. Detection of preneoplastic and neoplastic prostate disease by MADI profiling of urine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 353, p. 829–834, 2007.

MATSUMOTO, J.; SUGIURA, Y.; YUKI, D.; HAYASAKA, T.; GOTO-INOUE, N.; ZAIMA, N.; KUNII, Y.; WADA, A.; YANG, Q.; NISHIURA, K.; AKATSU, H.; HORI, A.; HASHIZUME, Y.; YAMAMOTO, T.; IKEMOTO, K.; SETOU, M.; NIWA, S. I. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, p. 1933–1943, 2011.

MCDONNELL, L.A.; HEEREN, R. M. A. Imaging mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 26, p. 606–643, 2007.

MELTRETTER, J.; SCHMIDT, A.; HUMENY, A.; BECKER, C. M.; PISCHETSRIEDER, M. Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 2899–2906, 2008.

MENZEL R.; GIURFA M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 2, n. 2, p. 62–71, 2001.

MENZEL, R.; ERBER, J. Learning and memory in bees. **Scientific American**, New York, v. 239, p. 80–87, 1978.

MENZEL, R.; LÉBOULLE, G.; EISENHARDT, D. Small Brains, Bright Minds. **Cell**, Cambridge, v. 124, p. 237–239, 2006.

MONGE, M. E.; HARRIS, G. A.; DWIVEDI, P.; FERNÁNDEZ, F. M. Mass Spectrometry: Recent Advances in Direct Open Air Surface Sampling/Ionization. **Chemical Reviews**, Washington, v. 113, p. 2269–2308, 2013.

NACHMAN, R. J.; MOYNA, G.; WILLIAMS, H. J.; TOBE, S. S.; SCOTT, A. I. Synthesis, biological activity, and conformational studies of insect allatostatin neuropeptide analogues incorporating turn-promoting moieties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 6, p. 1379–1388, 1998.

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.

NEFLIU, M.; SMITH, J. N.; VENTER, A.; COOKS, R. G. Internal Energy Distributions in Desorption Electrospray Ionization (DESI). **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 19, p. 420–427, 2008.

NEMES, P.; BARTON, A. A.; LI, Y.; VERTES, A. Ambient molecular imaging and depth profiling of live tissue by infrared laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 80, p. 4575–4582, 2008.

NEMES, P.; BARTON, A. A.; VERTES, A. Three-dimensional imaging of metabolites in tissues under ambient conditions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81: p. 6668–6675, 2009.

NEMES, P.; VERTES, A. Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, p. 8098–8106, 2007.

NEMES, P.; WOODS, A. S.; VERTES, A. Simultaneous Imaging of Small Metabolites and Lipids in Rat Brain Tissues at Atmospheric Pressure by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 982–988, 2010.

NORRIS, J. L.; CAPRIOLI, R. M. Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research. **Chemical Reviews**, Washington, v. 113, p. 2309–2342, 2013.

NORTHEN, T. R.; YANES, O.; NORTHEN, M. T.; MARRINUCCI, D.; URITBOONTHAI, W.; APON, J.; GOLLEDGE, S. L.; NORDSTROM, A.; SIUZDAK, G. Clathrate nanostructures for mass spectrometry. **Nature**, London, v. 449, p. 1033–1036, 2007

NOVIKOV, A. P.; KALMYKOV, S. N.; UTSUNOMIYA, S.; EWING, R. C.; HORREARD, F.; MERKULOV, A.; CLARK, S. B.; TKACHEV, V. V.; MYASOEDOV, B. F. Colloid Transport of Plutonium in the Far-field of the Mayak Production Association, Russia. **Science**, Washington, v. 314, p. 638–641, 2006.

NYE, G. J.; NORRIS, J. L.; NICKERSON, S. 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle, WA, **American Society of Mass Spectrometry**: Santa Fe, NM, 2006.

OLIVEIRA, D. N.; SARTOR, S. B.; FERREIRA, M. S.; CATHARINO, R. R. Cosmetic Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). **Materials**, v. 6, p. 1000–1010, 2013.

OPPENHEIMER, S. R.; MI, D.; SANDERS, M.; CAPRIOLI, R. M. A molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, p. 2182–2190, 2010.

OSTROWSKI, S. G.; VAN BELL, C. T.; WINOGRAD, N.; EWING, A. G. Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during *Tetrahymena* mating. **Science**, Washington, v. 305, p. 71–73, 2004.

PACHLOSKI, M. L.; CANNON, D. M.; EWING, A. G.; WINOGRAD, N. Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of freeze-fractured frozen-hydrated biological membranes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v.12, p. 1232–1235, 1998.

PACHOLSKI, M. L.; WINOGRAD, N. Imaging with mass spectrometry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 99, p. 2977–3006, 1999.

PAN, C.; XU, S.; ZHOU, H.; FU, Y.; YE, M.; ZOU, H. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 1, p. 193–204, 2007.

PAPAC, D. I.; WONG, A.; JONES, A. J. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, n. 18, p. 3215–3223, 1996

PARRY, S.; WINOGRAD, N. High-resolution TOF-SIMS imaging of eukaryotic cells preserved in a trehalose matrix. **Analytical chemistry**, Washington, v. 77, p. 7950–7957, 2005.

PATEL, S. A.; BARNES, A.; LOFTUS, N.; MARTIN, R.; SLOAN, P.; THAKKER, N.; GOODACRE, R. Imaging mass spectrometry using chemical inkjet printing reveals differential protein expression in human oral squamous cell carcinoma. **Analyst**, London, v. 134, p. 301–307, 2009.

POL, J.; VIDOVA, V.; KRUPPA, G.; KOBLIHA, V.; NOVAK, P.; LEMR, K.; KOTIAHO, T.; KOSTIAINEN, R.; HAVLICEK, V.; VOLNY, M. Automated ambient desorption-ionization platform for surface imaging integrated with a commercial fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, p. 8479–8487, 2009.

QUINTANA, C.; BELLEFQIH, S.; LAVAL, J. Y.; GUERQUIN-KERN, J. L.; WU, T. D.; AVILA, J.; FERRER, I.; ARRANZ, R.; PATIÑO, C. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 153, p. 42–54, 2006.

QUINTANA, C.; WU, T. D.; DELATOUR, B.; DHENAIN, M.; GUERQUIN-KERN, J. L.; CROISY, A. Morphological and chemical studies of pathological human and mice brain at

the subcellular level: Correlation between light, electron, and nanosims microscopies. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 70, p. 281–295, 2007.

RAUSER, S.; MARQUARDT, C.; BALLUFF, B.; DEININGER, S. O.; ALBERS, C.; BELAU, E.; HARTMER, R.; SUCKAU, D.; SPECHT, K.; EBERT, M. P.; SCHMITT, M.; AUBELE, M.; HOEFLER, H.; WALCH, A. Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 4, p. 1854–1863, 2010.

REYZER, M. L.; CAPRIOLI, R. M. MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: A new tool for biomarker discovery. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 4, p. 1138–1142, 2005.

RODDY, T. P.; CANNON, D. M.; MESEROLE, C. A.; WINOGRAD, N.; EWING, A. G. Imaging of freeze-fractured cells with in situ fluorescence and time-of-flight secondary ion mass spectrometry. **Analytical chemistry**, Washington, v. 74, p. 4011–4019, 2002.

ROLLMANN, S. M.; ZWARTS, L.; EDWARDS, A. C.; YAMAMOTO, A.; CALLAERTS, P.; NORGA, K.; MACKAY, T. F.; ANHOLT, R. R. Pleiotropic effects of *Drosophila neutralized* on complex behaviors and brain structure. **Genetics**, Austin, v. 179, n. 3, p. 1327–1336, 2008.

RUBAKHIN, S. S.; HATCHER, N. G.; MONROE, E. B.; HEIEN, M. L.; SWEEDLER, J. V. Mass spectrometric imaging of the nervous system. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 13, p. 3325–3334, 2007.

RUBAKHIN, S. S.; SWEEDLER, J. V. A mass spectrometry primer for mass spectrometry imaging. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 656, p. 21–49, 2010.

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.

RYU, O. H.; ATKINSON, J. C.; HOEHN, G. T.; ILLEI, G. G.; HART, T. C. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. **Rheumatology**, Basel, v. 45, p. 1077–1086, 2006.

SALEEM, M.; GALLA, H.J. Surface view of the lateral organization of lipids and proteins in lung surfactant model systems - a ToF-SIMS approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1798, p. 730–740, 2010.

SATTELLE, D. B.; BUCKINGHAM, S.D. Invertebrate studies and their ongoing contributions to neuroscience. **Invertebrate Neuroscience**, v. 6, n.1. p. 1–3, 2006

SCHUERENBERG, M.; LUEBBERT, C.; DEININGER, S.; KETTERLINUS, R.; SUCKAU, D. MALDI tissue imaging: mass spectrometric localization of biomarkers in tissue slices. **Nature Methods**, New York, v. 4, III-IV, 2007a.

SCHUERENBERG, M.; LUEBBERT, C.; DEININGER, S.; MUELLER, R.; SUCKAU, D. P110-M A New Preparation Technique for MALDI Tissue Imaging. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 18, n. 1, p. 38–116, 2007b.

SCHULZ-KNAPPE, P.; ZUCHT, H.D.; HEINE, C.; JURGENS, M.; HESS, R.; SCHRADER, M. Peptidomics: The comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 4, n. 2, 207–217, 2001.

SCHWAMBORN, K.; CAPRIOLI, R. M. MALDI Imaging Mass Spectrometry – Painting Molecular Pictures. **Molecular Oncology**, v. 4, p. 529–538, 2010b.

SCHWAMBORN, K.; CAPRIOLI, R. M. Molecular imaging by mass spectrometry - looking beyond classical histology. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 10, p. 639–646, 2010a.

SCHWARTZ, S. A.; REYZER, M. L.; CAPRIOLI, R. M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 38, n. 7, p. 699–708, 2003.

SCHWARTZ, S. A.; WEIL, R. J.; THOMPSON, R. C.; SHYR, Y.; MOORE, J. H.; TOMS, S. A.; JOHNSON M. D.; CAPRIOLI R. M. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Cancer Research**, Baltimore, v. 65, p. 7674–7681, 2005.

SEELEY, E. H.; CAPRIOLI, R. M. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 18126–18131, 2008.

SEELEY, E. H.; OPPENHEIMER, S. R.; MI, D.; CHAURAND, P.; CAPRIOLI, R. M. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 19, n. 8, p. 1069–1077, 2008.

SENONER, M.; UNGER, W. E. S. SIMS imaging of the nanoworld: applications in science and technology. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 27, p. 1050–1068, 2012.

SHANTA, S. R.; KIM, T. Y.; HONG, J. H.; LEE, J. H.; SHIN, C. Y.; KIM, K. H.; KIM, Y. H.; KIM, S. K.; KIM, K. P. A new combination MALDI matrix for small molecule analysis: application to imaging mass spectrometry for drugs and metabolites. **Analyst**, London, v. 137, p. 5757–5762, 2012.

SHRESTHA, B.; PATT, J. M.; VERTES, A. In situ cell-by-cell imaging and analysis of small cell populations by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, p. 2947–2955, 2011.

SJÖVALL, P.; JOHANSSON, B.; LAUSMAA, J. Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging ToF-SIMS. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 252, p. 6966–6974, 2006.

SKOLD, K.; SVENSSON, M.; NORRMAN, M.; SJOGREN, B.; SVENNINGSSON, P.; ANDREN, P. E. The significance of biochemical and molecular sample integrity in brain proteomics and peptidomics: stathmin 2-20 and peptides as sample quality indicators. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 4445–4456, 2007.

SOSSIN, W. S.; FISHER, J. M.; SCHELLER, R. H. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. **Neuron**, Cambridge, v. 2, p. 1407–1417, 1989.

SOSSIN, W. S.; SWEET, C. A.; SCHELLER, R. H. Dale's hypothesis revisited: different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 4845–4848, 1990.

SRIPADI, P.; NAZARIAN, J.; HATHOUT, Y.; HOFFMAN, E. P.; VERTES, A. In vitro analysis of metabolites from the untreated tissue of *Torpedo californica* electric organ by mid-infrared laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. **Metabolomics**, v. 5, p. 263–276, 2009.

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.

STEPHENS, W. E. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. **Physical Review**, New York, v. 69, p. 691–691, 1946.

STOECKLI, M.; CHAURAND, P.; HALLAHAN, D. E.; CAPRIOLI, R. M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. **Nature Medicine**, New York, v. 7, p. 493–496, 2001.

STORT, A. C. Genetic study of aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. 1. Some tests to measure aggressiveness. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 13, p. 33–38, 1974.

STRUPAT, K.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, Amsterdam, v. 111, p. 89–102, 1991.

SUGIURA, Y.; SHIMMA, S.; SETOU, M. Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 8227–8235, 2006.

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

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.

TAGHERT, P. H. FMRFamide neuropeptides and neuropeptide-associated enzymes in *Drosophila*. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 45, p. 80–95, 1999.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient MS by DESI: Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 40, p. 1261–1275, 2005.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. **Science**, Washington, v. 306 n. 5695, p. 471–473, 2004.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and polymer analyses up to m/z100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 2, p. 151–153, 1988.

TANG, K.; ALLMAN, S. L.; CHEN, C. H. Matrix-assisted laser desorption ionization of oligonucleotides with various matrices. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 7, n. 10, p. 943–948, 1993.

TEGGE, A. N.; SOUTHEY, B. R.; SWEEDLER, J. V.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L. Comparative analysis of neuropeptide cleavage sites in human, mouse, rat, and cattle. **Mammalian Genome**, v. 19, p. 106–120, 2008.

THOLEY, A.; HEINZLE, E. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry—Applications and perspectives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 386, p. 24–37, 2006.

THOMAS, A.; CHARBONNEAU, J. L.; FOURNAISE, E.; CHAURAND, P. Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, n. 4, p. 2048–2054, 2012.

TOUBOUL, D.; BRUNELLE, A.; HALGAND, F.; DE LA PORTE, S.; LAPRÉVOTE, O. Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 46, n. 9, p. 1388–1395, 2005.

TOUBOUL, D.; ROY, S.; GERMAIN, D. P.; CHAMINADE, P.; BRUNELLE, A.; LAPREVOTE, O. MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 260, p. 158–165, 2007.

TRIM, P. J.; DJIDJA, M. C.; MUHARIB, T.; COLE, L. M.; FLINDERS, B.; CAROLAN, V. A.; FRANCESE, S.; CLENCH, M. R. Instrumentation and software for mass spectrometry imaging—Making the most of what you've got. **Journal of Proteomics**, Netherlands, v. 75, p. 4931–4940, 2012.

VAIDYANATHAN, S.; FLETCHER, J. S.; GOODACRE, R.; LOCKYER, N. P.; MICKLEFIELD, J.; VICKERMAN, J. C. Subsurface biomolecular imaging of *Streptomyces coelicolor* using secondary ion mass spectrometry. **Analytical chemistry**, Washington, v. 80, n. 6, p. 1942–1951, 2008.

- VAN BERKEL, G. J.; PASILIS, S. P.; OVCHINNIKOVA, O. Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 43, p. 1161–1180, 2008.
- VENTER, A.; COOKS, R. G. Desorption Electrospray Ionization in a Small Pressure-Tight Enclosure. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, n. 16, p. 6398–6403, 2007.
- VENTER, A.; NEFLIU, M.; COOKS, R. G. Ambient desorption ionization mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 284–290, 2008.
- VENTER, A.; SOJKA, P. E.; COOKS, R. G. Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 8549–8555, 2006.
- 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**, Weinheim, v. 1, p.118–131, 2001.
- VERTES, A.; NEMES, P.; SHRESTHA, B.; BARTON, A. A.; CHEN, Z. Y.; LI, Y. Molecular imaging by Mid-IR laser ablation mass spectrometry. **Applied Physics A: Materials Science & Processing**, Berlin, v. 93, p. 885–891, 2008.
- VICKERMAN, J. C. Molecular imaging and depth profiling by mass spectrometry-SIMS, MALDI or DESI? **Analyst**, London, v. 136, p. 2199–2217, 2011.
- VIDOVA, V.; VOLNY, M.; LEMR, K.; HAVLICEK, V. Surface analysis by imaging mass spectrometry. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, Praha, v. 74, p. 1101–1116, 2009.
- VISMEH, R.; WALDON, D. J.; TEFFERA, Y.; ZHAO, Z. Localization and quantification of drugs in animal tissues by use of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, N. 12, p. 5439–5445, 2012.
- VOORTMAN, J.; PHAM, T. V.; KNOL, J. C.; GIACCONE, G.; JIMENEZ, C. R. Time-course MALDI-TOF-MS serum peptide profiling of non-small cell lung cancer patients treated with bortezomib, cisplatin and gemcitabine. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 26, p. 8007, 2008.
- WANG, H. Y.; LIU, C. B.; WU, H. W. A simple desalting method for direct MALDI mass spectrometry profiling of tissue lipids. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 52, n. 4, p. 840–849, 2011.
- WANG, H. Y.; WU, H. W.; TSAI, P. J.; LIU, C. B. MALDI-mass spectrometry imaging of desalted rat brain sections reveals ischemia-mediated changes of lipids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 404, n. 1, p. 113–124, 2012.
- WATROUS, J. D.; ALEXANDROV, T.; DORRESTEIN, P.C. The evolving field of imaging mass spectrometry and its impact on future biological re-search. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 46, p. 209–222, 2011.

WEGENER, C.; GORBASHOV, A. Molecular evolution of neuropeptides in the genus *Drosophila*. **Genome Biology**, v. 9, n. 8, R131, 2008.

WERNER, H. W. SIMS: from research to production control. **Surface and interface analysis**, London, v. 35, p. 859–879, 2003.

WESTON, D. J. Ambient ionization mass spectrometry: Current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. **Analyst**, London, v. 135, p. 661–668, 2010.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 14, p. 61–65, 1996.

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

WISEMAN, J. M.; IFA, D. R.; ZHU, Y.; KISSINGER, C. B.; MANICKE, N. E.; KISSINGER, P. T.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 18120–18125, 2008.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C.; COTE, R. J.; DOWSETT, M.; FITZGIBBONS, P. L.; HANNA, W. M.; LANGER, A.; MCSHANE, L. M.; PAIK, S.; PEGRAM, M. D.; PEREZ, E. A.; PRESS, M. F.; RHODES, A.; STURGEON, C.; TAUBE, S. E.; TUBBS, R.; VANCE, G. H.; VAN DE VIJVER, M.; WHEELER, T. M.; HAYES, D. F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 25, p. 118–145, 2007.

WOO, H. K.; NORTHEN, T. R.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry (NIMS): A protocol for preparing and applying NIMS surfaces for high sensitivity mass analysis. **Nature Protocols**, London, v. 3, p. 1341–1349, 2008.

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.

WU, B.; BECKER, J.S. Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 307, p. 112–122, 2011.

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

- WU, C.; IFA, D. R.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G. Molecular imaging of adrenal gland by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, London, v. 135, p. 28–32, 2010.
- XIE, Y.; KAI, Z. P.; TOBE, S. S.; DENG, X. L.; LING, Y.; WU, X. Q.; HUANG, J.; ZHANG, L.; YANG, X. L. Design, synthesis and biological activity of peptidomimetic analogs of insect allatostatins. **Peptides**, New York, v. 32, p. 581–586, 2011.
- YANAGISAWA, K.; SHYR, Y.; XU, B. J.; MASSION, P. P.; LARSEN, P. H.; WHITE, B. C.; ROBERTS, J. R.; EDGERTON, M.; GONZALEZ, A.; NADAF, S.; MOORE, J. H.; CAPRIOLI, R. M.; CARBONE, D. P. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. **Lancet**, Minneapolis, v. 362, p. 433–439, 2003.
- YANES, O.; WOO, H.; NORTHEN, T. R.; OPPENHEIMER, S. R.; SHRIVER, L.; APON, J.; ESTRADA, M. N.; POTCHOIBA, M. J.; STEENWYK, R.; MANCHESTER, M.; SIUZDAK, G. Nanostructure Initiator Mass Spectrometry: Tissue Imaging and Direct Biofluid Analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, n. 8, p. 2969–2975, 2009.
- YANG, J.; CAPRIOLI, R. M. Matrix Precoated Targets for Direct Lipid Analysis and Imaging of Tissue. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, p. 2907–2912, 2013.
- YE, H.; GEMPERLINE, E.; VENKATESHWARAN, M.; CHEN, R.; DELAUX, P. M.; HOWES-PODOLL, M.; ANÉ, J. M.; LI, L. MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium melilotis* symbiosis. **The Plant Journal**, v. 75, n. 1, p. 130–145, 2013a.
- YE, H.; GREER, T.; LI, L. Probing neuropeptide signaling at the organ and cellular domains via imaging mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, Netherlands, v. 75, n. 16, p. 5014–5026, 2012.
- YE, H.; HUI, L.; KELLERSBERGER, K.; LI, L. Mapping of Neuropeptides in the Crustacean Stomatogastric Nervous System by Imaging Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 24, p. 134–147, 2013b.
- ZAIMA, N.; MATSUYAMA, Y.; SETOU, M. Imaging mass spectrometry of gastric carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarray. **Cancer Science**, v. 101, p. 267–273, 2010.
- ZAYED, A.; ROBINSON, G. E. Understanding the Relationship Between Brain Gene Expression and Social Behavior: Lessons from the Honey Bee. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 46, p. 591–615, 2012.
- ZHENG, H.; CHU, J.; QIU, Y.; LOH, H. H.; LAW, P. Agonist-selective signaling is determined by the receptor location within the domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 9421–9426, 2008.
- ZIMMERMAN, T. A.; RUBAKHIN, S. S.; SWEEDLER, J. V. MALDI mass spectrometry imaging of neuronal cell cultures. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 22, n. 5, p. 828–836, 2011.

ZUPANC, G. K. Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. **Micron**, New York, v. 27, p. 35–91, 1996.

ZWARTS, L.; MAGWIRE, M. M.; CARBONE, M. A.; VERSTEVEN, M.; HERTELEER, L.; ANHOLT, R. R. H.; CALLAERTSA, P.; MACKAY, T. F. C. Complex genetic architecture of *Drosophila* aggressive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 41, p. 17070–17075, 2011.

---

Marcel Pratavieira  
(Aluno)

---

Prof. Dr. Mario Sergio Palma  
(Orientador)

---

Msc. Anally R. S. Menegasso  
(Co-orientadora)