
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

Análise comparativa da expressão protéica em glândulas pós-faríngeas de saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidas à suplementação lipídica.

Pâmela Decio

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular) Molecular).

Pâmela Decio

**Análise comparativa da expressão protéica em glândulas
pós-faríngeas de saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa*
FOREL, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)
submetidas à suplementação lipídica.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Odair Correa Bueno

Coorientador: Mario Sergio Palma

Rio Claro - SP
2013

595.796 Decio, Pâmela
D294a Análise comparativa da expressão protéica em glândulas pós-faríngeas de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidas à suplementação lipídica / Pâmela Decio. - Rio Claro : [s.n.], 2013
55 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Formiga. 2. Análise proteômica. 3. Formiga cortadeira. 4. Espectrometria de massas. 5. Lipídios. I. Título.

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

*Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e
Mariza, e ao meu marido Sherman,
pelo apoio e amor incondicional
em todos os momentos.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre renovar minhas forças nos momentos difíceis, não me deixando desistir.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao meu orientador, Prof^o Odair por acreditar em mim, pela paciência, pelos ensinamentos em quase sete anos de convivência, pela orientação na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientados, Prof^o Mario Palma, por disponibilizar seu laboratório, sem o qual não teria sido possível a realização desta pesquisa. Pela ajuda e conselhos durante todas as etapas deste estudo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

À Necis Miranda de Lima, à Lucilene Amaro, a todos os professores, funcionários e colegas do Centro de Estudos de Insetos Sociais pela amizade e ajuda no decorrer da Iniciação Científica e do Mestrado, e pelos momentos descontraídos na hora do café, nas festas de aniversário, nas confraternizações.

Às amigas do Laboratório de Formigas, Nathália Lorenzon, Natália Marin, Sandra, Amanda, Priscila, Cíntia, Vivi, Catarina, Ita, Marcela, Manu por alegrarem meus dias de trabalho, pela amizade e companheirismo e pelos desabafos trocados nos momentos difíceis. Um obrigado especial às grandes amigas: Má, com a ajuda nas coletas, manutenção dos ninhos, e à Ita por ser a pessoa mais divertida do CEIS, e por serem as duas principais responsáveis por fazer todo o laboratório de formigas funcionar.

Aos amigos do LBEZ, Ana Maria, Analy, Marcel, Diego, Fran, Fernando, Pat, Bibi, Paulinho, Beto e aqueles que não fazem mais parte do laboratório, Lucy, Daniel, Nicole e Virgínia por me receberem com carinho em suas rotinas de trabalho, pela amizade e por sempre se disponibilizarem pra me ajudar desde o início dos meus experimentos com a padronização da técnica até a análise final dos meus dados. E especialmente a Naty por toda dedicação e atenção em me auxiliar, acompanhando de perto cada etapa deste trabalho, mas acima de tudo pela grande amizade.

À Thaisa e a Keity, duas queridas, pela ajuda com o Platinum e com a análise estatística.

Aos amigos CBN 2006, Gisele, Monizze, Van, Eli, Naty, Cazusa, Dom e Manu pelo companheirismo, pela grande amizade, pelas crises existenciais acadêmicas compartilhadas, pelo TQAB que conseguimos manter, e acima de tudo por serem os melhores amigos “medíocres” que alguém pode querer ter (rs). Fica aqui um agradecimento especial ao Dom, por me ajudar a divagar sobre bioquímica e as funções

das proteínas, contribuindo para a discussão deste trabalho. E um super obrigada de coração também à Manu, minha comadre, por ser a minha maior companheira nesta jornada, me ajudando e me dando forças desde a apresentação do projeto de mestrado até a defesa, uma amiga verdadeira para todos os momentos, com quem eu sei que poderei contar para sempre.

Às minhas amigas-irmãs Dan (e Lôlly), Pri, Clara e Ná por sempre torcerem por mim, me aconselharem diante de algum obstáculo e comemorarem comigo todas as minhas conquistas. Por estarem sempre por perto, prontas pra segurar minha mão, me levantar e me ajudar a seguir em diante. Ao Shao, ao Ogro e ao Caito por estarem sempre presentes e a todo o restante do Cassino por serem grandes amigos.

À toda minha família, Pá, Alex (Belle, e o Lorenzo), Tá, Henrique, (agora com o Pedro Henrique), ao Ju, às primas-irmãs Kell (e o Dan) e Nê (e o Lu), e especialmente aos meus pais, Mara e Decio, por serem o meu alicerce. Por estarem sempre orando por mim pra que eu consiga realizar meus sonhos. Por estarem presentes nos momentos mais tristes e nos mais felizes, sempre com amor e apoio incondicionais. Pelos valores ensinados e por me mostrarem que o caminho certo a seguir está no meu coração.

A todo restante da minha família, entre tantos primos e primas, tios e tias, de perto e de longe, pelo amor e preocupação demonstrados através de ligações, visitas, orações e e-mails. Ao meu avô que aos 96 anos é um exemplo de vida a ser seguido.

Ao Tommy por ser o melhor cachorro do mundo. O meu filho que sempre me espera de “braços abertos” na hora do almoço.

Finalmente, um agradecimento especial ao meu grande companheiro Sherman, que há um ano é o meu esposo, por me fazer sentir tão amada, pelo carinho, pela compreensão, pela confiança, por me incentivar sempre. Por ser a pessoa mais especial da minha vida e estar ao meu lado todos os dias e me fazer acreditar que nós dois juntos daremos um jeito pra tudo sempre ficar bem no final.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, fica aqui o meu: muito obrigada!

Resumo

As glândulas pós-faríngeas estão presentes em todas as formigas e em algumas vespas solitárias. Localizam-se dorso-lateralmente na transição entre a faringe e o esôfago e sua morfologia é variável entre os diferentes grupos de Formicidae, podendo apresentar-se na forma lobulada ou digitada. As funções atribuídas a essas glândulas são passíveis de discussão. São consideradas por diferentes autores como cecos gástricos, divertículo do trato digestório, como produtoras de feromônios ou de hidrocarbonetos cuticulares. Novas evidências tem dado suporte a função dessas glândulas na ingestão e retenção de lipídios. Com isto em vista, o presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas expressas nas glândulas pós-faríngeas de *Atta sexdens rubropilosa* buscando ampliar o conhecimento sobre uma possível função destas glândulas no metabolismo de lipídios por meio da comparação das proteínas diferencialmente expressas nas glândulas de formigas em três estágios alimentares: rainhas que não receberam nenhum tipo de tratamento alimentar e rainhas que receberam óleo de soja como suplementação lipídica, analisadas 4 e 120 horas após o tratamento. A utilização da abordagem proteômica envolveu técnicas de eletroforese bidimensional, estratégia shotgun e espectrometria de massas. Para a análise dos resultados obtidos foram usadas diferentes ferramentas de bioinformática para a identificação das proteínas e esclarecimento de suas funções. O algoritmo utilizado para pesquisa nos bancos de dados foi o MASCOT Ion Search versão 2.0 e os bancos de dados foram o Protein Data Bank, SwissProt e o GenBank. Foram identificadas 33 proteínas a partir do extrato de glândulas pós-faríngeas de rainhas *Atta sexdens rubropilosa*, envolvidas em diversas funções como metabolismo de lipídios, energético e de esteróides, bem como com os mecanismos de defesa, regulação metabólica, transdução de sinal e restauração do citoesqueleto e proteínas de membrana. A expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios foi maior no grupo de formigas tratadas com óleo e dissecadas após 120 h em relação aos grupos sem tratamento e tratado com óleo 4 h. Estes dados sugerem que possivelmente a metabolização dos lipídios, que envolveria a degradação lipídica e o transporte dos derivados resultantes via lipoforinas para outros órgãos ou tecidos de armazenamento ocorre horas depois das primeiras 4 h após a aplicação do tratamento. O alto teor de lipídios nas glândulas pós-faríngeas provocou aumento de expressão de proteínas envolvidas com mecanismos de defesa celular em resposta ao estresse oxidativo e diferenças na expressão de proteínas envolvidas com a restauração do citoesqueleto. Os resultados encontrados neste estudo não sugerem que as glândulas pós-faríngeas possuam um papel relevante da produção de energia. No entanto, indicam a importância dos lipídios no metabolismo de esteróides nas glândulas pós-faríngeas. Mais estudos são necessários para revelar completamente as funções e o significado biológico dessas estruturas estarem presentes somente nas formigas e em algumas vespas solitárias, suas precursoras filogenéticas.

Palavras-chave: formiga cortadeira, análise proteômica, espectrometria de massas, lipídios.

Abstract

The post-pharyngeal glands are present in all ants and some solitary wasps. These glands are located laterally in the back of the head, between the pharynx and esophagus, and their morphology varies among different groups of Formicidae. They may present themselves as lobulated or typed. The functions assigned to these glands are open to discussion, and are considered by different authors as gastric caeca, diverticulum of the digestive tract or as producer of pheromones or cuticular hydrocarbons. New evidence has supported the function of these glands to be in the intake and retention of lipids. The present study aimed to identify the proteins present in the post-pharyngeal glands of *Atta sexdens rubropilosa* seeking to expand knowledge about a possible function of these glands in the metabolism of lipids by comparing the differentially expressed proteins in the glands of ants food in three stages: queens who did not receive any treatment, and queens who received soybean oil as lipid supplementation analyzed 4h and 120h after treatment. Using the proteomic approach involving two-dimensional electrophoresis techniques, strategy and shotgun mass spectrometry. To analyze the obtained results various bioinformatics tools were used for protein identification and clarification of their duties. The algorithm used to search the databases was the MASCOT Ion Search version 2.0 and the databases were the Protein Data Bank, GenBank and SwissProt. In the end, 38 identified proteins were extracted of the post-pharyngeal glands of *Atta sexdens rubropilosa* queens, involved in several functions such as metabolism of lipid, energy and steroids, as well as defense mechanisms, metabolic regulation, signal transduction, cytoskeleton restoration and membrane protein. The expression of proteins related to lipid metabolism was higher in the group of ants treated with oil and dissected after 120 h compared to the untreated groups and the groups treated with oil and dissected after 4 h. These data suggest that the metabolism of lipids, which involves the degradation and transport of lipid and its derivatives via lipophorins to other organs or storage tissues, occurs hours after the first 4 hours of the treatment. The high lipid content in the post-pharyngeal glands caused increased expression of proteins involved in cellular defense mechanisms in response to oxidative stress and differences in the expression of proteins involved in the restoration of the cytoskeleton. The results of this study suggest that the post-pharyngeal glands don't have an important role in energy production. However, suggest the importance of lipids for steroid metabolism in post-pharyngeal glands. More studies are necessary to fully reveal the functions and the biological significance of why these structures are only present in ants and in some species solitary wasps, their phylogenetic precursor.

Key-words: leaf cutter ants, proteomic analyses, mass spectrometry, lipids.

Sumário

1 Introdução	8
2 Objetivos	16
3 Material e Métodos	17
3.1 Obtenção das glândulas pós-faríngeas de <i>A. sexdens rubropilosa</i> e extração protéica..	17
3.2 Quantificação de proteínas.....	18
3.3 Experimentos MALDI TOF-TOF.....	18
3.3.1 Eletroforese bidimensional.....	18
3.3.2 Aquisição das Imagens.....	19
3.3.3 Preparo das amostras para a espectrometria de massas (MALDI TOF-TOF).....	19
3.3.4 Espectrometria de massas – MALDI TOF-TOF.....	20
3.4 Experimentos de LCMS-IT-TOF.....	21
3.4.1 Digestão “em-solução” para estratégia shot-gun.....	21
3.4.2 Espectrometria de massas – LCMS-IT-TOF.....	21
3.5 Identificação das Proteínas.....	22
4 Resultados	24
4.1 Dados obtidos pela Eletroforese Bidimensional e pelo espectrômetro de massas MALDI TOF-TOF.....	24
4.2 Dados obtidos por meio do espectrômetro de massas LCMS-IT- TOF.....	35
5 Discussão	37
6 Conclusões	47
Referências Bibliográficas	49

1 Introdução

Os insetos do gênero *Atta* e *Acromyrmex* constituem o grupo das formigas cortadeiras por possuírem o hábito de cortar e transportar fragmentos vegetais diversos, flores e sementes para seus ninhos subterrâneos para incorporar em seu jardim de fungo (DELLA LUCIA, 1993). De um modo geral estas formigas são consideradas benéficas quando em equilíbrio ecológico, pois podam a vegetação estimulando o crescimento de algumas plantas, auxiliam na decomposição de matéria vegetal, e ainda reviram, arejam e adubam o solo (HAINES, 1978). No entanto, quando ocorrem em ambientes alterados pela atividade humana seja pela expansão e desenvolvimento da agricultura ou mesmo pela urbanização, as formigas cortadeiras podem se tornar pragas causando grandes prejuízos econômicos, pois são capazes de promover um intenso desfolhamento e destruir grandes áreas cultivadas, prejudicando a agricultura e a silvicultura (DELLA LUCIA, 1993).

Como todos os insetos, as formigas apresentam glândulas associadas ao seu sistema digestório, tais como as glândulas mandibulares, hipofaríngea e as salivares da cabeça (nas larvas) e do tórax (GAMA, 1985). Além dessas, as formigas apresentam um par de glândulas pós-faríngeas que se localizam dorso-lateralmente na transição entre a faringe e o esôfago (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Elas são de origem ectodérmica, formam-se durante o desenvolvimento pós-embrionário a partir de duas evaginações dorsais do epitélio faringeal (JANET, 1905; GAMA, 1985). Até pouco tempo atrás, pensava-se que as glândulas pós-faríngeas eram exclusivas dos Formicidae, independente de casta ou sexo (WHEELER, 1926; DELAGE-DARCHEN, 1976; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), mas Herzner e colaboradores (2007) encontraram essas glândulas em vespas solitárias *Philanthus triangulum* e outra pesquisa descreve as glândulas pós-faríngeas em *Ampulex compressa* (HERZNER et al., 2011).

Em *Atta sexdens rubropilosa*, formiga conhecida popularmente como a saúva-limão, as glândulas pós-faríngeas apresentam basicamente a mesma constituição morfo e ultramorfológica tanto para as rainhas como para as operárias, sendo maiores nas primeiras (BUENO, 2005). Segundo Almeida-Toledo (1967), elas constam de dois cachos de lobos digitiformes que se espalham na região frontal do cérebro, ficando entre este e a tampa quitinosa da cabeça e terminam em uma estrutura sacular que se estreita num canal levemente quitinizado, o qual desemboca na parte inicial do intestino anterior. As paredes dos lobos são formadas por um epitélio simples de células, as quais podem se encontrar achatadas ou

cilíndricas com reentrâncias entre elas, o que confere um aspecto ondulado (BUENO, 2005). O núcleo é distinto e grande, enquanto que o citoplasma, por sua vez, é rico em organelas, contém vesículas e possui granulações que se coram pela Hematoxilina de Heidenhain e Azan (ALMEIDA-TOLEDO, 1967). Segundo Bueno (2005) há uma cutícula que reveste o lúmen na face interna, a qual pode ser dividida em três partes: a) epicutícula fina e elétrion densa; b) exocutícula fibrilar e c) endocutícula elétrion lúcida e adjacente às células epiteliais, como descrita nas glândulas de *Dinoponera quadriceps* (SCHOETERS; BILLEN, 1997).

As funções dessas glândulas são passíveis de discussão. Para alguns autores (MARKIN, 1970 apud VANDER MEER; GLANCEY; LOFGREN, 1982) elas seriam responsáveis pela alimentação das larvas. Já para Caetano, Jaffé e Zara (2002), as glândulas pós-faríngeas funcionariam como um divertículo do trato digestório. No entanto, para outros pesquisadores as glândulas teriam função de cecos cefálicos ou gástricos (PEREGRINE; MUDD; CHERRETT, 1973; ZYLLBERBERG; JEANTET; DELAGE-DARCHEN, 1974; DELAGE-DARCHEN, 1976; VINSON; PHILLIPS; WILLIAMS, 1980; VANDER MEER; GLANCEY; LOFGREN, 1982)

Outras informações afirmam que o conteúdo presente na glândula é espécie-específico e é sintetizado pela rainha (VANDER MEER apud VANDER MEER; GLANCEY; LOFGREN, 1982). Soroker e colaboradores (1994) estudaram essas glândulas em *Cataglyphis niger* e atribuíram a elas a função de misturar hidrocarbonetos exógenos e endógenos, obtidos durante a trofalaxia, criando um odor característico, o que seria importante para a identidade química dos membros dessa colônia. Delage-Darchen (1976), Thompson e colaboradores (1981) e Attygale, Billen e Morgan (1985) chegaram a conclusões parecidas ao sugerir que o conteúdo glandular é importante na organização da colônia e na determinação de castas, devido também ao hábito de trofalaxia. Bagnères e Morgan (1991) demonstraram que em várias espécies de formigas as glândulas pós-faríngeas contêm as mesmas substâncias que são encontradas na cutícula, isto é, principalmente hidrocarbonetos de cadeia longa com o de ácidos de cadeia longa e ésteres. No entanto, um estudo da biossíntese de hidrocarbonetos em *Cataglyphis niger* mostrou que alguns lipídios são sintetizados na glândula, mas não hidrocarbonetos (SOROKER; HEFETZ 2000). As glândulas pós-faríngeas poderiam adquirir os hidrocarbonetos da cutícula durante o comportamento de “grooming” (MORGAN, 2008).

Para Ayre (1963) a presença de nematóides parasitas da Família Mermithidae (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CAETANO et al., 1990; FALCO, 1992) no lúmen da

glândula seria indício da existência de um material alimentar completo, o qual seria regurgitado para os demais membros da colônia. Ele afirma que o conteúdo da glândula pode ser um tipo de reserva alimentar para operárias e larvas, mas não deve estar associado à digestão. Em testes enzimáticos com glândulas pós-faríngeas de *Acromyrmex octospinosus*, Lofgren e Vander Meer (1986) detectaram baixa atividade de α -glucosidase e esterase, sugerindo que essas glândulas não teriam função digestiva nessas formigas.

No entanto, outros autores (FORBES; MACFARLANE, 1961; DELAGE, 1968) creditam às glândulas pós-faríngeas de *Camponotus pennsylvanicus* a digestão de gorduras ingeridas, por apresentarem enzimas digestivas no lúmen, principalmente lipases. É comum encontrar no lúmen destas glândulas um líquido de aspecto oleoso amarelado. Sua origem estaria ligada diretamente à ingestão de lipídios provenientes da alimentação (PEREGRINE; MUDD; CHERRET, 1973; VINSON; PHILLIPS; WILLIAMS, 1980). Caetano (1998) observou as células glandulares repletas de retículo liso e de gotas de lipídio e sugeriu que estas devem representar ou participar da composição do complemento nutricional absorvido pela glândula, fundamental para a sobrevivência do indivíduo.

Estudos toxicológicos com *A. sexdens rubropilosa* (SUMIDA, 2007) indicaram uma possível via alternativa de ingestão do princípio ativo de iscas formicidas contendo óleo de soja como veículo, confirmando estudos prévios (BUENO, 2005) sobre a ação das glândulas pós-faríngeas na ingestão de lipídios. Desta forma as glândulas teriam a capacidade de separarem seletivamente compostos lipídicos dos não lipídicos na porção final da faringe destas formigas. Assim, se a quantidade de lipídio ingerido for grande e o sistema não conseguir armazenar, o excesso de lipídios se desloca para o papo, mas sem atingir o ventrículo. Quando há redução do estoque ocorre o retorno pelo esôfago e os lipídios atingem o lúmen da glândula (VINSON et al., 1980; BUENO, 2005).

Apesar das formigas em geral, não encontrarem disponíveis na natureza grandes quantidades de lipídios em suas fontes de alimento, diversos trabalhos já relataram a presença destes compostos no interior das glândulas pós-faríngeas (JANET 1905; PEREGRINE; MUDD 1974; BUENO 2005). Para o controle de insetos-praga, como as formigas cortadeiras, óleos minerais ou vegetais tem sido utilizados em muitos testes como aditivos de pesticidas ou como sinergistas (HESLER; PLAPP, 1986). Segundo Chapman (1967) o uso do óleo no controle destes insetos oferece como vantagens o fato destes organismos serem menos resistentes aos óleos; não são nocivos à saúde humana e são economicamente mais viáveis e mais fáceis de serem obtidos do que os inseticidas comercializados. A toxicidade do inseticida é

acentuada quando o produto químico é aplicado com óleo, pois quando este é utilizado como veículo há um aumento do contato do inseticida com a cutícula, dissolvendo a cera epicuticular, facilitando assim a passagem do inseticida, além de promover a desorganização da matriz protéica interna da cutícula (MATSUMURA, 1975).

Diante de tantas teorias, a abordagem de novas metodologias pode ser um caminho para auxiliar na elucidação das funções dessas glândulas nas formigas. Uma das possibilidades seria realizar análises das proteínas presentes no conteúdo glandular.

As proteínas são as biomoléculas mais abundantes nos organismos e ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais, receptores celulares, sendo distribuídas assim em diversos grupos funcionais relacionados com todos os processos do metabolismo celular. Devido a essa diversidade de funções, elas exercem papel fundamental em muitos fenômenos biológicos, como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica, reprodução (SOUSA; FONTES; RICART, 2002), entre outros. São elas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções de um organismo (LANÇAS et al., 2003).

Dada a importância das proteínas surgiu um novo ramo da ciência dentro da Biologia Molecular denominada Proteômica. Este termo foi inicialmente introduzido em 1995 e definido como sendo a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido (WILKINS et al. 1997). O surgimento da proteômica está diretamente relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e seus impactos no metabolismo celular. Neste aspecto, a proteômica pode gerar informações importantes como: quais proteínas são expressas; níveis e momento de expressão destas proteínas; modificações pós-traducionais; diferenças moleculares entre linhagens de células, interação gênica e respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007).

Um mesmo tipo de célula pode apresentar diferentes perfis protéicos em resposta à ação de drogas, infecção por patógenos, poluição e diferentes tipos de estresse abiótico (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007). O estudo da expressão protéica entre amostras que diferem por uma variável é conhecido como “Proteoma de Expressão de Proteínas” (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Através desse ramo da Proteômica, Jeong e colaboradores (2003) identificaram proteínas de tecidos que são diferencialmente expressas em ratos que apresentavam asma alérgica. Este trabalho sugere que essas proteínas são eficientes biomarcadores para o monitoramento quantitativo da progressão da doença ou respostas às

terapias. O Proteoma de Expressão diferencial tem sido utilizado no estudo de outras doenças, incluindo alguns tipos de câncer (CELIS et al., 1999) e doenças cardíacas (DUNN, 2000).

Uma importante técnica utilizada nesse tipo de estudo é a eletroforese bidimensional (SDS-PAGE). Com este método, as proteínas são separadas por ponto isoelétrico na focalização isoelétrica, durante a primeira dimensão, e de acordo com sua massa molecular por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, na segunda dimensão (RABILLOUD, 2000; LANÇAS et al., 2003; O'FARREL, 1975 apud CHAVES, 2004). Os perfis de expressão de proteínas gerados de quaisquer duas ou mais amostras podem ser comparados qualitativa e quantitativamente (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Juntamente à técnica supracitada, a espectrometria de massas (MS) emerge como uma tecnologia indispensável para a interpretação da informação codificada pelos genes, o proteoma (CANTÚ et al., 2008). Como técnica analítica das mais versáteis e das mais sensíveis, a espectrometria de massas é atualmente uma das ferramentas analíticas valiosas em diversos estudos nas áreas de Biologia, Ciências Médicas e Ciências Tecnológicas. Por MS é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídios e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação (FERREIRA et al., 2009).

A espectrometria de massas permite a identificação de proteínas por uma metodologia denominada “peptide mass fingerprinting”, a qual é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) resultando na fragmentação em peptídios. O espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão enzimática indica a relação entre a massa e a carga (m/z) e, por consequência, a massa molecular dos peptídeos que formam uma espécie de impressão digital (“peptide mass fingerprinting” ou PMF) da proteína (SOUSA; FONTES; RICART, 2002). Os peptídeos previamente detectados durante o PMF (chamados de íons precursores) podem ser isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. O espectro obtido é chamado espectro de fragmentação ou MS/MS. Softwares especiais permitem comparar o PMF da proteína que queremos identificar, bem como a informação relativa à sequência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (MS/MS), com os dados gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados. (CANTÚ et al., 2008).

Para compreender melhor esta técnica, um espectrômetro de massas é composto de cinco principais componentes: sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador, detector e processador de dados. Um tipo de equipamento muito utilizado atualmente para análise de macromoléculas biológicas é o que tem como fonte de íons o tipo MALDI (do inglês, matrix-assisted laser desorption/ ionization) (PANDEY; MANN, 2000). Com este método a amostra analisada é misturada com uma matriz, que geralmente trata-se de um composto orgânico de baixa massa molecular, que vai co-cristalizar com a amostra. Desta forma, a presença da matriz protege o analito, transferindo parte da energia vinda do laser utilizado como fonte de dessorção e ionização na técnica MALDI, para as macromoléculas, resultando em uma leve ionização, o que evita a degradação da amostra. (CANTÚ et al., 2008).

Outro tipo de fonte de ionização bastante utilizada é a ESI (Electrospray Ionization), na qual as macromoléculas em solução são forçadas diretamente para a fase gasosa. A solução de analitos passa através de uma agulha carregada que é mantida em um elevado potencial elétrico, dispersando a solução em uma névoa de microgotículas carregadas. O solvente que envolve as macromoléculas evapora rapidamente, e os íons carregados resultantes são então introduzidos de forma não destrutiva na fase gasosa. Se o analito em questão tiver vários sítios capazes de carregar cargas, poderá ocorrer a formação de íons de múltiplas cargas (KÜSTER; SHEVCHENKO; MANN, 2001; NELSON; COX, 2009).

Dependendo do tipo de analisador e de como ele separa os íons, o espectrômetro de massas é classificado em diferentes categorias. Por exemplo, nos instrumentos TOF (Time of Flight) os íons recebem um pulso de energia igual, mas são acelerados de maneira diferente devido a sua relação m/z (massa/carga) e chegam ao detector em tempos diferentes, sendo que os íons com menor m/z adquirem maior velocidade e chegam ao detector primeiro. Ou seja, esse analisador separa os íons de acordo com o tempo que os íons levam para viajar dentro do tubo de vôo. (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; SAWAYA, 2012).

Em um outro tipo de analisador, o Ion Trap (IT) ou “armadilha de íons”, todos os íons criados em um dado período de tempo são presos em uma espécie de armadilha e então são sequencialmente expulsos desta armadilha para o detector. Assim, todos os íons são armazenados enquanto a análise de massa é executada (KÜSTER; SHEVCHENKO; MANN, 2001).

Existem ainda os espectrômetros de massas compostos por mais de um analisador e por isso podem ser utilizados para estudos estruturais e de sequenciamento. Nestes casos, os

analisadores não precisam ser necessariamente do mesmo tipo, sendo então denominados de híbridos. Tais equipamentos permitem que experimentos em sequência (tandem) sejam realizados, ou seja, é possível detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação (CANTÚ et al., 2008). Espectrômetros de massas híbridos como “Quadrupolo-Time-Of-Flight” (Q-TOF) ou ainda a incorporação de um Ion Trap com um Time of Flight (IT-TOF) tem sido utilizados cada vez mais em um grande número de aplicações, devido à velocidade de aquisição de dados, precisão de massa, poder de resolução, e alta sensibilidade (STEEN; KUSTER; MANN, 2001).

Para melhorar ainda mais a qualidade dos resultados obtidos pela espectrometria de massas a combinação com técnicas como a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) possibilitam a separação e identificação de componentes peptídicos que se encontram em reduzidas quantidades na amostra a ser estudada, revelando cada vez mais novos componentes (DIAS, 2011). A estratégia “shotgun”, uma importante técnica para estudos proteômicos, consiste em identificar proteínas a partir de misturas complexas, utilizando geralmente uma configuração em que um sistema de cromatografia líquida (LC) é conectado on-line a um espectrômetro de massas em tandem operado em modo de ionização por electrospray (LC-MS/MS). As proteínas presentes na mistura são digeridas com enzimas proteolíticas e os peptídeos resultantes são separados por cromatografia líquida. Em sequência, o espectrômetro de massas é, então, utilizado para fazer as análises LC-MS/MS. Os espectros dos íons-fragmentos, combinados com informações sobre os íons precursores, são então analisados para se determinar a sequência de aminoácidos dos peptídeos, e inferir as proteínas a partir do qual eles se originaram (DOMON, B.; AEBERSOLD, 2010).

Por fim, uma vez separados, o detector mede a abundância de elétrons gerados pelos íons, para cada relação m/z . A maioria dos sistemas MS usa algum tipo de multiplicador de elétrons como detector combinado a um amplificador de sinal. O registro de todas as cargas detectadas durante a varredura constitui o espectro de massas (QUEIROGA, 2012)

Com a obtenção dos espectros de massas, as ferramentas de bioinformática são fundamentais para a análise proteômica. Atualmente, há um grande número de softwares disponíveis para a identificação de proteínas usando dados de MS/MS não interpretados. Alguns exemplos são programas como o Mascot (PERKINS et al., 1999), SONAR e Sequest (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). De forma geral, estes programas têm como objetivo encontrar a sequência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentos encontrados em um espectro. As sequências “candidatas” são

procuradas nos bancos de dados de acordo com a massa do peptídeo intacto (informação adquirida na etapa do PMF) e com o espectro de fragmentação obtido para cada peptídeo (CANTÚ et al., 2008).

O fato das glândulas pós-faríngeas serem encontradas somente em formigas e em um pequeno grupo de vespas solitárias precursoras de sua linha filogenética (HERZNER, 2006), as tornam interessantes do ponto de vista científico. Essas glândulas podem apresentar um papel importante na alimentação das formigas, o que poderia conferir uma grande biodiversidade para estes insetos, permitindo sua dominância em vários habitats terrestres.

Até o momento existem alguns trabalhos com identificação enzimática das glândulas pós-faríngeas de algumas espécies de formigas (FORBES; MACFARLANE, 1961; DELAGE, 1968; LOFGREN; VANDER MEER, 1986). Este estudo de proteoma de expressão diferencial reúne proteínas identificadas a partir do extrato das glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa* em diferente momentos do metabolismo alimentar destas formigas e traz informações adicionais ao esclarecimento do função metabólica destas glândulas.

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas expressas nas glândulas pós-faríngeas de *Atta sexdens rubropilosa* visando ampliar o conhecimento sobre a função dessas glândulas, principalmente sua ação no metabolismo de lipídios. Para tal, foi feita a comparação entre as proteínas diferencialmente expressas nas glândulas de formigas em três situações alimentares: rainhas que não receberam nenhum tratamento e rainhas que receberam óleo de soja como suplementação de lipídios e foram analisadas 4 horas e 120 horas após o tratamento.

Para tal, foi necessário realizar seguintes etapas:

- Comparação dos perfis protéicos das glândulas, identificando quais seriam as proteínas diferencialmente expressas em cada tratamento.
- Investigação em quais grupos funcionais as proteínas identificadas se enquadravam e o significado biológico das proteínas nas glândulas pós-faríngeas que foram expressas diferencialmente entre as três condições alimentares.
- Identificação das proteínas envolvidas com o metabolismo de lipídios, para tentar elucidar um possível papel das glândulas pós-faríngeas nesse processo.

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção das glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa* e extração protéica

Para a extração das glândulas pós-faríngeas foram utilizadas rainhas de *A. sexdens rubropilosa* devido ao tamanho consideravelmente maior dessas glândulas nas fêmeas reprodutoras em relação às operárias (podendo chegar a ser 12 vezes maior), otimizando assim a quantidade de amostras para os experimentos. As rainhas recém-acasaladas foram coletadas no Campus da UNESP de Rio Claro e na Floresta Estadual Navarro de Andrade, localizada na mesma cidade. As coletas foram feitas durante as revoadas dos meses de outubro e novembro de 2010 e 2011. Logo após as fêmeas aladas retornarem ao solo e retirarem suas asas, elas eram coletadas e colocadas individualmente em potes plásticos de 100 mL, forrados com gesso umedecido e tampados, os quais eram então transferidos para o laboratório de formigas cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP até o momento de sua utilização.

Para cada uma das duas técnicas utilizadas, foram utilizadas 300 fêmeas acasaladas que foram divididas em três grupos de 100 indivíduos:

I- 0 h: Fêmeas que não receberam nenhum tratamento alimentar;

II- Óleo 4 h: Fêmeas que receberam 2 μ L de óleo de soja entre as peças bucais e foram dissecadas 4 h após o tratamento;

III- Óleo 120 h: Fêmeas que receberam 2 μ L de óleo de soja entre as peças bucais e foram dissecadas 120 h após o tratamento.

O óleo de soja foi administrado com auxílio de micropipetas diretamente entre as peças bucais. Segundo BUENO (informação pessoal) cerca de 20% do total aplicado é ingerido pela formiga, e de acordo com o tamanho das rainhas, 2 μ L seriam o suficiente para a absorção atingir o lúmen das glândulas pós-faríngeas. Os tempos para a dissecação das formigas foram selecionados com base nos resultados de Bueno (2005).

Momentos antes da dissecação as fêmeas foram submetidas a baixa temperatura (-20°C) por 2 min para serem anestesiadas. Suas cabeças foram retiradas e a extração das glândulas foi realizada em água Milli-Q. Uma vez dissecadas, as glândulas foram imediatamente armazenadas em microtubos siliconizados de 1,5 mL com o inibidor de protease fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e mantidas à -80°C até serem utilizadas.

Para a extração das proteínas o material foi lavado em solução contendo PMSF 1 mM, e depois foi macerado, agitado e centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos, a fim de extrair o conteúdo protéico presente no interior das glândulas pós-faríngeas.

Devido à alta quantidade de lipídios presentes nessas glândulas, nos três grupos de fêmeas acasaladas foi utilizado dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% por 35 min para solubilizar os lipídios associados à amostra de proteínas. Um kit de limpeza (2D-Clean Up Kit, da GE HEALTHCARE) também foi utilizado, uma vez que, eventuais problemas podem ocorrer na focalização isoeletrica da eletroforese bidimensional se a amostra apresentar impurezas, interferentes ou uma elevada quantidade de sal.

3.2 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Hartree (1972), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão. A leitura do espectrofotômetro foi feita na faixa de 650nm.

3.3 Experimentos MALDI TOF-TOF

3.3.1. Eletroforese bidimensional

Para a realização da primeira dimensão foram utilizadas fitas de gradiente imobilizado de pH (IPG) para o intervalo de valores de ponto isoeletrico entre 3 e 10, com 7 cm de comprimento. Estas fitas foram reidratadas durante a noite, à temperatura ambiente, em 125 µL de uma solução de reidratação, contendo uréia 8M, CHAPS 2% (v/v), solução tampão para IPG a 1% (v/v), ditioneitol (DTT) 19 mM e azul de bromofenol a 0,005% (v/v), juntamente com 300µg de extrato das glândulas para cada tratamento. As proteínas foram separadas conforme seus diferentes pontos isoeletricos utilizando três passos: 1º) 200 V por 2hs, 2º) 1000 V por 1 h e 3º) 5000V por 1:30hs. Em seguida, as fitas foram equilibradas por 20 minutos em presença de DTT 19 mM, 19 Tris 50 mM, uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), e posteriormente por mais 20 minutos, na mesma solução, exceto pela substituição do DTT por Iodoacetamida (IAA) 0,2M.

Para a realização da segunda dimensão, a fita de gradiente de pH oriunda da primeira dimensão foi colocada no topo de um gel de poli(acrilamida) a 12,5% (m/v). Nesta etapa, foi

utilizado um padrão de baixa massa molecular (GE HEALTHCARE) para auxiliar na caracterização das proteínas em estudo. A eletroforese foi realizada utilizando-se duas etapas com os seguintes parâmetros: 10 mA por gel por 15 minutos e 20 mA por gel por 1 hora. Após a segunda dimensão, as proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB).

Para os três grupos utilizados nas comparações do estudo foram feitos géis em triplicatas para posterior análise estatística da expressão diferencial das proteínas.

3.3.2 Aquisição das imagens e análise estatística da expressão diferencial das proteínas

As imagens dos géis de eletroforese bidimensional corados com CBB foram adquiridas por um fotodocumentador modelo ImageScanner (GE HEALTHCARE BIOSCIENCES AB, Uppsala, Suécia) no modo transparência, conectado a um computador, com resolução de 400 dpis para fotodocumentação. As imagens foram analisadas no software Image Master Elite (GE HEALTHCARE). A análise estatística da expressão diferencial de proteínas foi feita com o software ImageMaster 2-D Platinum v. 7.0 (GE HEALTHCARE BIOSCIENCES AB, Uppsala, Suécia). As comparações realizadas no software foram feitas aos pares entre os tratamentos:

- 0 h X Óleo 4 h
- 0 h X Óleo 120 h
- Óleo 4 h X Óleo 120 h

A partir da correspondência entre spots de dois géis de amostras diferentes, foi possível saber quais proteínas foram sub ou super expressas entre os tratamentos, considerando a área e o volume dos spots, pela análise estatística do teste Anova. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada como estatisticamente significativa.

3.3.3 Preparo da amostra para a espectrometria de massas (MALDI TOF-TOF)

Todos os spots visíveis nos géis, corados pelo CBB, foram excisados manualmente e colocados em microtubos siliconizados de 1,5 mL separadamente, para subsequente digestão *in gel* e extração dos fragmentos trípticos. A digestão *in gel* e a extração dos fragmentos trípticos foram realizados segundo protocolo modificado de Schevchenko et al. (1996). Os spots foram descoloridos com solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e acetonitrila

50%, desidratados com 100% de acetonitrila e secos por centrifugação à vácuo. Foi realizada novamente a alquilação e redução com DTT e IAA.

Em seguida, as proteínas presentes nestes pedaços de gel foram digeridas separadamente com a enzima Tripsina (PROMEGA). Para isto, os pedaços de gel desidratados foram incubados com 0,4 µg da enzima tripsina na concentração de 12,5ng/uL em tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0 por 16 h a 37°C. Em seguida, foi adicionada uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v) para a obtenção dos digestos trípticos do gel. Os sobrenadantes foram coletados e secos por centrifugação a vácuo, sendo então mantidos à -80°C até serem analisados por espectrometria de massas.

3.3.4 Espectrometria de massas – MALDI TOF-TOF

Inicialmente foi realizado um protocolo de identificação de “impressão digital peptídica” (PMF) baseado na digestão das proteínas *in gel*, seguido da medida das massas dos fragmentos peptídeos resultantes. Esses fragmentos foram submetidos à Espectrometria de Massas Tandem (MS/MS) para a obtenção de suas sequências peptídicas.

Para a análise no espectrômetro de massas, as amostras foram ressuspendidas adicionando-se 5 µL de solução de acetonitrila 50% (v/v) [contendo TFA 0,5% (v/v)] e solubilizando os peptídeos gerados durante a digestão enzimática; 0,2 µL desta solução contendo os digestos trípticos foi aplicada na placa de amostras do espectrômetro. Sobre a amostra foram adicionados 0,2 µL de solução saturada da matriz de ácido cinâmico, deixando secar à temperatura ambiente, para finalmente realizar os experimentos de espectrometria de massas.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF (SHIMADZU) e a potência do laser (Nd:Yag – 355nm) foi ajustada para se obter o melhor sinal, tanto para experimentos de MS como MS/MS. Os espectros de massas foram adquiridos a partir dos picos monoisotópicos na faixa de m/z de 800 a 3500. Para experimentos de MS/MS foram selecionados pelo menos cinco íons mais intensos de cada espectro MS. O modo reflectron foi utilizado em todas as análises. Após todas as aquisições de dados, os mesmos foram exportados no formato texto, para serem submetidos à análise automática da ferramenta de bioinformática MASCOT Ion Search versão 2.0 (<http://www.matrixscience.com>) para o acesso aos bancos de dados.

3.4 Experimentos de LCMS-IT-TOF

3.4.1 Digestão “em-solução” para estratégia shot-gun.

Para cada um dos três grupos de rainhas, foram utilizados 500µg de amostra de proteínas, que foram solubilizadas em 50 µL de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7.9 contendo 7.5 M ureia, durante 1 h à 37°C e então reduzidas com DTT 10mM à 37°C durante 1 h. Após este tratamento, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida (IAA) 40 mM à 25°C, durante 1 h na ausência de luz.

As amostras foram diluídas cinco vezes com bicarbonato de amonio 100 mM, pH 7,8, e cloreto de cálcio na concentração de 1 mM. A tripsina (PROMEGA) foi adicionada à solução de proteína desnaturada (1:50 w/w de tripsina: proteína) durante 18 h, a 37 ° C. A reação foi descontinuada com a adição de 5 µL de ácido fórmico.

As amostras digeridas foram dessalinizadas utilizando uma coluna Sep-pak tc 18 1cc Vac Cartridge (WATERS). Os peptídeos tripticos foram solubilizados em 50% MeCN e submetidos à análise em um sistema LC-IT-TOF/MS e MSn.

3.4.3 Espectrometria de massas – LCMS-IT-TOF

As amostras foram analisadas com a utilização do sistema LCMS-IT-TOF. Foi utilizado o sistema UFLC (SHIMADZU) acoplado diretamente (*on line*) ao espectrômetro de massas, contendo duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20AHT e forno para coluna CTO-20A. A análise foi realizada sob gradiente de acetonitrila de 5 a 90% (v/v), contendo 0.05% de TFA (v/v), por 90 min., utilizando-se uma coluna C-18 Shim-pack XR-ODS (3x100 mm), com poros de 120 Å, com partículas de 2,2 µm (SHIMADZU). A eluição dos componentes foi monitorada por absorvância ultravioleta a 214 nm através do sistema UFLC (SHIMADZU), com fluxo de 0,2 mL/min, durante 90 minutos. Os eluentes foram analisados no modo positivo (ESI+) contínuo, durante todo o experimento.

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas com fonte ESI, do tipo “Ion Trap - Time of Flight” (IT-TOF SHIMADZU). 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 3.5V. 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 4000, com uma resolução de aproximadamente 15000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo.

Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, de fragmentação peptídica (MS²) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS. 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 uma 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.

3.5 Identificação das Proteínas

Para os resultados adquiridos pelos dois tipos de espectrômetros de massas deste estudo, os bancos de dados utilizados para as identificações de proteínas foram: Protein Data Bank (PDB), Swissprot (UNIPROT, 2012) e o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os dados de MS e MS/MS foram submetidos à ferramenta “MASCOT protein engine search” (<http://www.matrixscience.com>) baseando-se no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) com buscas abertas a todos os organismos e buscas restritas às taxonomias: Metazoa, Arthropod, Hymenoptera, Formicidae, entre outros bancos de gêneros espécies de formigas como *Camponotus floridanus*, *Harpegnathos saltator*, *Atta cephalotes*, *Solenopsis sp*, *Acromyrmex sp* e *Pachicondyla sp*.

Os parâmetros utilizados para a busca nos bancos de dados foram a tolerância de massa do peptídeo de 0,5 Da e a tolerância da massa dos fragmentos peptídicos de 0,8 Da e o número de clivagens faltante igual a 1. Para modificações dos peptídeos, foram consideradas: carbamidometilação e oxidação da metionina e do triptofano. Os valores de “ion score” e “protein score” considerados significantes foram os valores pré-estabelecidos pela ferramenta de bioinformática utilizada. A comparação entre as massas moleculares (MM) teóricas e experimentais e os valores de PI (ponto isoelétrico) também foram consideradas para as identificações.

Toda a infra-estrutura para a realização deste estudo foi fornecida pelo Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro-SP, sob a co-orientação do Prof^o Dr. Mario Sergio Palma e auxílio da doutoranda Nathalia Baptista Dias.

4 Resultados

4.1 Dados obtidos pela Eletroforese Bidimensional e pelo espectrômetro de massas MALDI TOF-TOF

Analisando os perfis eletroforéticos das glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa*, observam-se 166 manchas de proteínas (spots) no gel do grupo de formigas que não receberam o tratamento com óleo de soja, entre a faixa de ponto isoelétrico (pI) 3-9 e com massas moleculares (MM) entre 16-94 KDa. No grupo que foi dissecado 4 h após a aplicação do óleo de soja observam-se 82 spots (pI entre 3-9 e MM entre 16-99 KDa), enquanto que no gel do grupo que foi dissecado após 120 h do início do tratamento visualizam-se 89 spots (pI entre 4-9 e a faixa de MM variando entre 17-135 KDa). A figura 1 mostra os perfis protéicos obtidos por meio da eletroforese bidimensional para os três grupos de rainhas, formigas não tratadas (1A) e tratadas com óleo de soja, dissecadas após 4 h (1B) e 120 h (1C).

Um exemplo de espectro gerado pela análise no MALDI TOF-TOF está apresentado na figura 2. Em 2A observa-se um espectro de MS da amostra das glândulas pós-faríngeas das rainhas tratadas com óleo 4 h e em 2B o espectro de MS/MS do íon 1885,75, selecionado para a fragmentação.

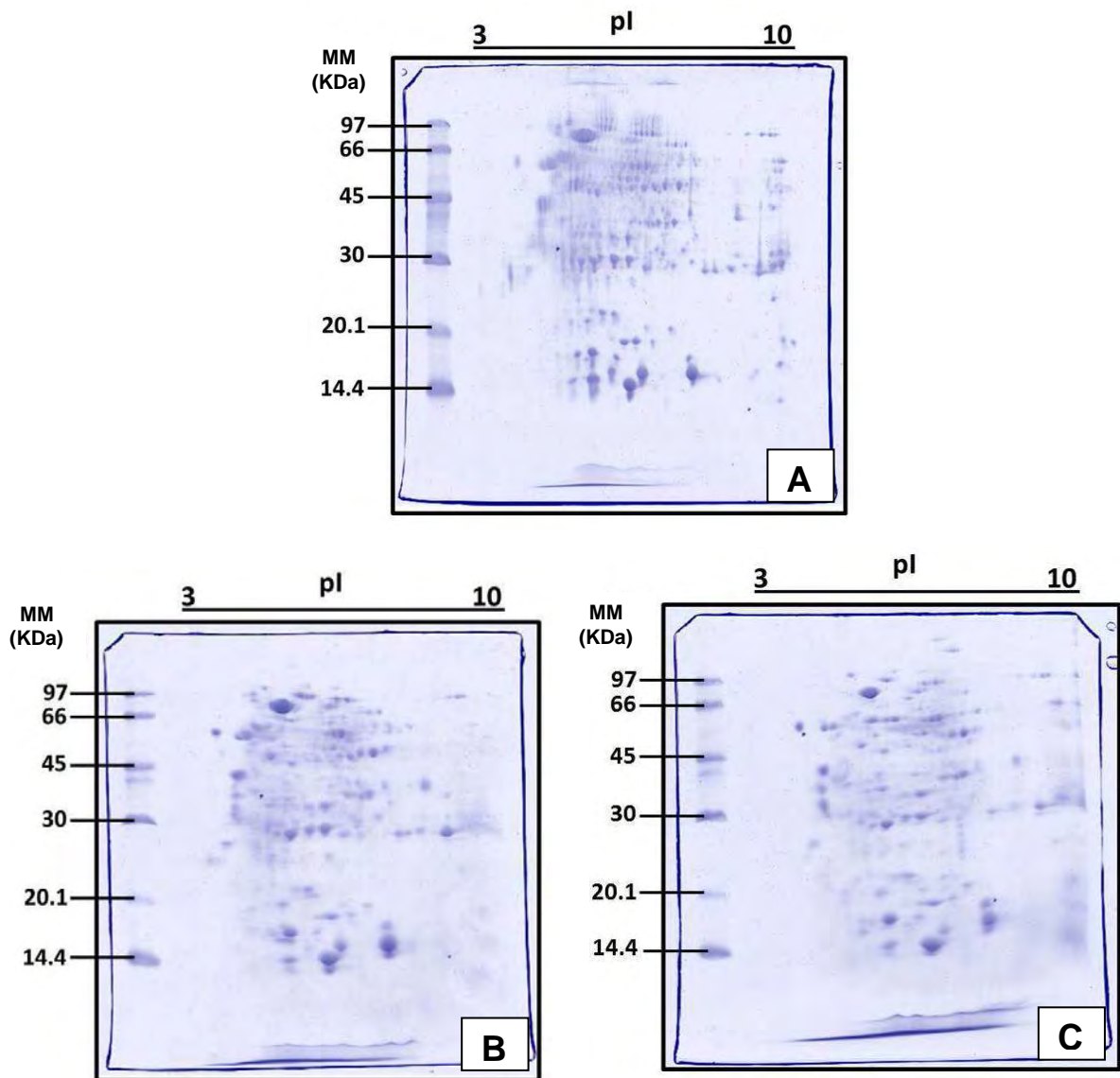


Figura 1 – Perfis protéicos obtidos em gel SDS-PAGE 12,5% (m/v) mostrando a distribuição das proteínas presentes no extrato das glândulas pós-faríngeas das rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*. A – Grupo que não recebeu suplementação de lipídios. B – Grupo de rainhas que foram dissecadas 4 h após a suplementação de lipídios com óleo de soja (Óleo 4 h). C – Grupo de rainhas que foram dissecadas 120 h após a suplementação de lipídios com óleo de soja (Óleo 120 h). Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB). MM (KDa) = Faixas do padrão de baixa massa molecular utilizado. pI= Ponto Isoelétrico.

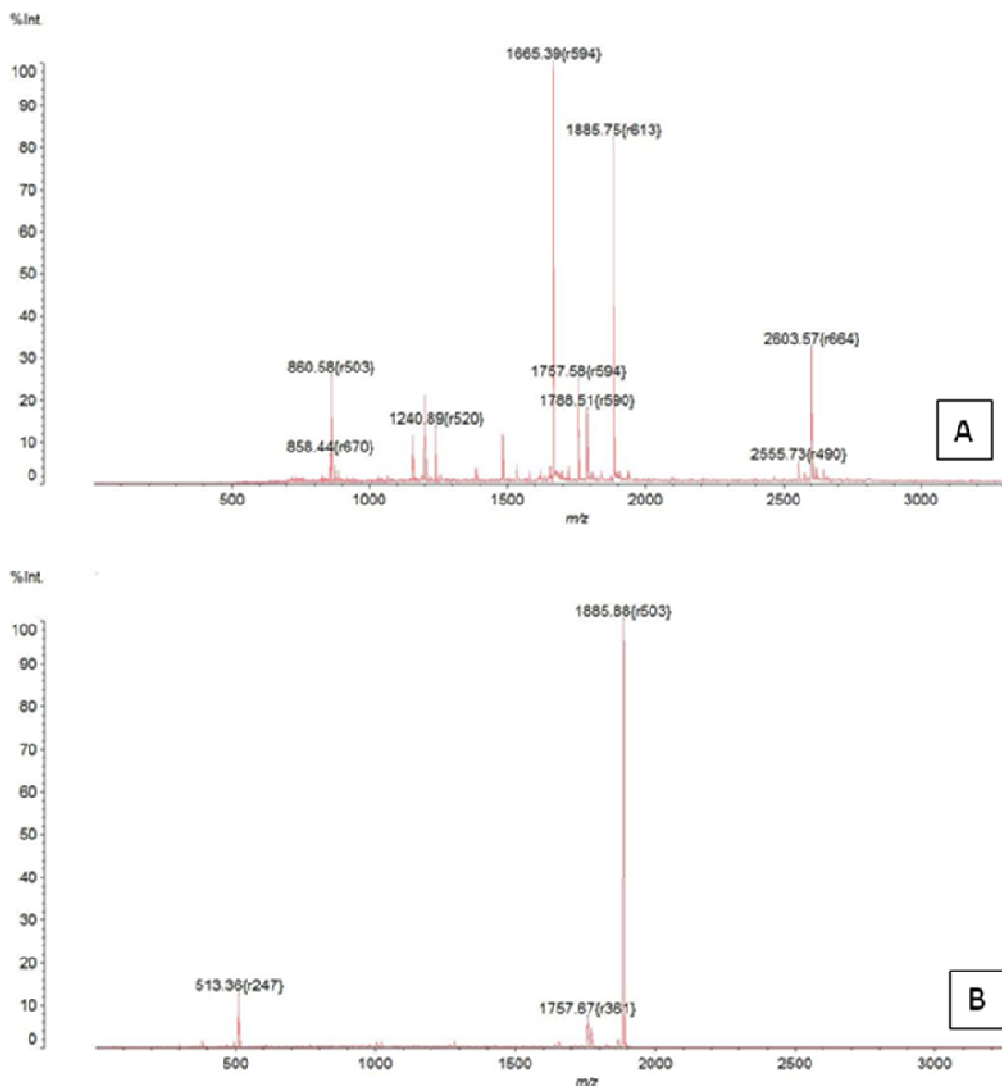


Figura 2 – A – Espectro MS obtido em equipamento MALDI TOF-TOF, referente à amostra do spot n°19 identificada como Peroxiredoxin 6. B – Espectro de MSMS do íon 1885,75, apresentado na figura 2A.

A partir dos três perfis protéicos obtidos, os spots recortados foram submetidos a espectrometria de massas (MALDI TOF-TOF) que, após a utilização de ferramentas da bioinformática proteômica, permitiram a identificação de um total de 26 proteínas presentes nas glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa*. O gel de eletroforese bidimensional do grupo de rainhas que não foram tratadas com óleo de soja foi utilizado como referência para mostrar a localização de 24 destas proteínas (Figura 3). A figura 4 mostra mais 2 spots exclusivos do grupo de formigas tratadas com óleo e dissecadas após 120 h, que também foram identificadas neste estudo.

A descrição das proteínas encontra-se na tabela 1, na qual é possível saber o nome da proteína identificada, o seu número de acesso no NCBI (National Center for Biotechnology Information), além de apresentar dados como a massa molecular e o ponto isoelétrico de cada proteína. A tabela 1 também informa a porcentagem de coberturas das sequências de aminoácidos que as proteínas do estudo obtiveram ao serem comparadas e identificadas com as sequências das proteínas depositadas nos bancos de dados. As sequências de aminoácidos dos fragmentos das proteínas pelos quais elas foram identificadas estão apresentadas nesta tabela também. Os valores de Mascot Score e de Ion Score indicam o grau de acertos e aproximações, entre os valores experimentais e teóricos depositados nos bancos, ou seja, a proteína considerada a mais provável é aquela que apresenta o maior número de acertos (pontos na classificação ou score).

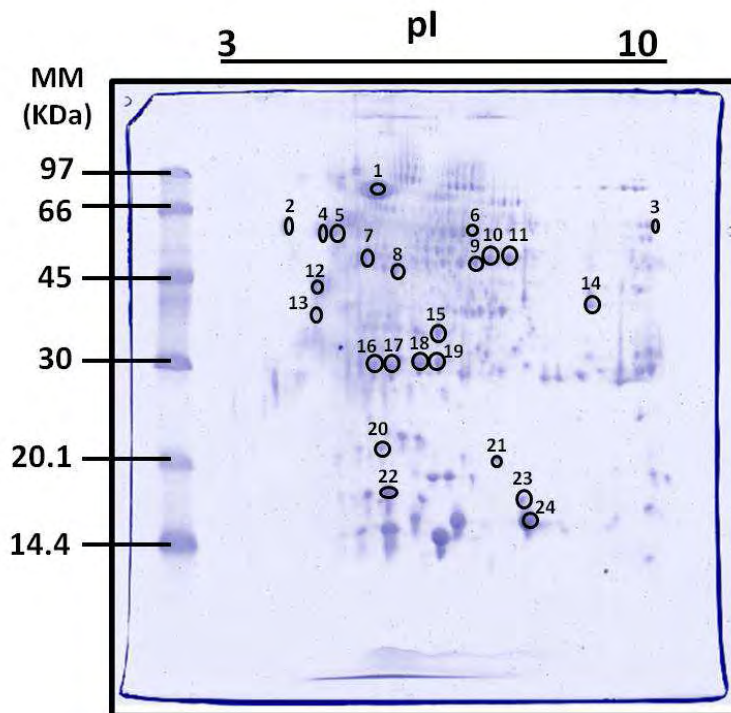


Figura 3 – Perfil protéico obtido em gel SDS-PAGE 12,5% (m/v) e corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) do grupo de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* que não receberam a suplementação de lipídios utilizado como referência para demonstrar as proteínas que foram identificadas neste estudo, numeradas de 1 a 24. MM= Faixas do padrão de baixa massa molecular utilizado. pI= Ponto Isoelétrico.

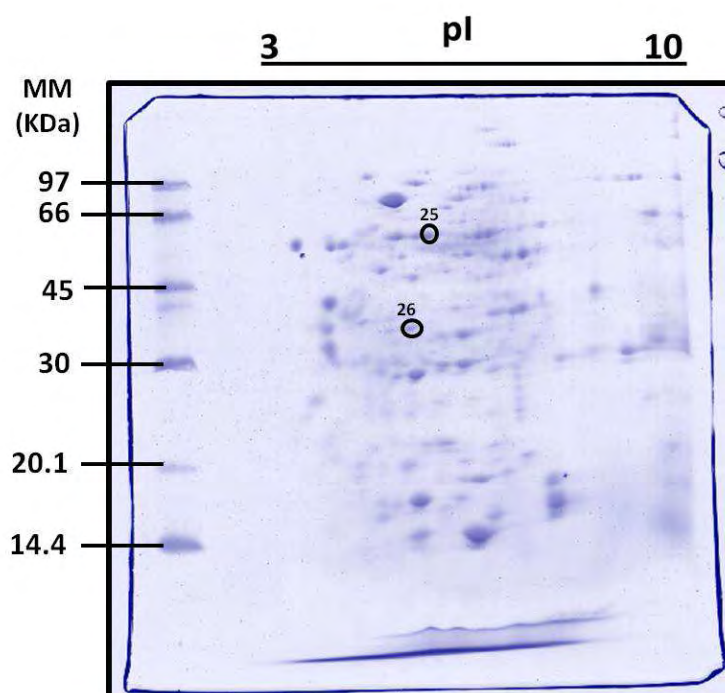


Figura 4 – Perfil protéico obtido em gel SDS-PAGE 12,5%(m/v) e corado com CBB do grupo de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com óleo de soja e dissecadas depois de 120 h da aplicação, mostrando mais duas proteínas identificadas (25 e 26) neste estudo. MW= Faixas do padrão de baixa massa molecular utilizado. pI= Ponto Isoelétrico.

Tabela 1. Proteínas identificadas por meio do espectrômetro de massas MALDI TOF-TOF, a partir dos spots obtidos na eletroforese bidimensional de extratos das glândulas pós-faríngeas de *Atta sexdens rubropilosa* do grupo que não recebeu suplementação de lipídios e dos grupos tratados com óleo, 4 h e 120 h. (Os nomes das proteínas estão em inglês, conforme resultado obtido no banco de dados). MM (KDa)= Massa molecular. pI= Ponto Isoelétrico.

SPOT	Identificação	Nº de acesso	MM (KDa)	PI	% de cobertura da sequência	Mascot Score Total	Sequência (Ion Score)
1	Fatty acyl-CoA reductase 1	EFN66141	78.9	5.0	2%	49	LEELTKNSVFNR (Ion score: 32)
2	Calreticulin	EFN75351	59.7	3.5	5%	44	NWVYSEHPGK (Ion score: 20) HEQNIDCGGGYVK (Ion score: 24)
3	PREDICTED: similar to 1D-myo-inositol-trisphosphate 3-kinase	XP_0016042 15	73.7	9.4	2%	33	RNSCLASPNPYTK (Ion score: 39)
4	E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1	EFN61064	56.7	4.0	3%	49	TPITSAQLRAVPR (Ion score: 27)

Continuação...

							GHYTEGAELVDSVLDV VR (Ion score: 19)
5	Tubulin beta-1 chain	EFN64123	57.4	4.2	9%	57	LHFFMPGFAPLTSR (Ion score: 14)
							ISEQFTAMFR (Ion score: 24)
6	CKLF-like MARVEL transmembrane domain- containing protein 4	EFN61103	52.9	6.7	16%	34	AVLYMIAFIAQLSAWT AYR (Ion score: 34)
							VAPEEHPVLLTEAPLNP K (Ion score: 11)
7	beta actin	ACX37099	46.6	4.7	14%	72	SYELPDGQVITIGNER (Ion score: 20)
							DLYANTVLSGGTTMYP GIADR (Ion score: 41)
							LIDHFLFK (Ion score: 21)
8	arginine kinase, parcial	ABY55637	43.6	5.2	14%	112	FWPTGR (Ion score: 34)
							LPFSHNR (Ion score: 57)
9	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic	EFN63125	46.6	6.5	9%	38	NGFPGPQGPYYCGVG ADK (Ion score: 29)
							RPSSNCDPYSVCDALVR (Ion score: 9)
							AFNNIAAFLVGAMPR (Ion score: 32)
10	Malate dehydrogenase, parcial	EGI65281	37.8	6.9	16%	95	NVIIWGNHSSSTQYPDA AHATVTLISGLK (Ion score: 25)
							DIVFSFPVIK (Ion score: 39)
							NILGGTVFR (Ion score: 24)
11	Isocitrate dehydrogenase (NADP)	EFN62401	51.0	7.4	9%	143	AFAHSSFQYALSR (Ion score: 69)
							KIWYEHR (Ion score: 17)
							ETSTNPIASIFAWTR (Ion score: 38)
12	CLIP-associating protein, parcial	EFN62865	39.4	4.0	10%	51	AAGDLLPLAMSSDGE Oxidation (M) (Ion score: 35)
13	Annexin-B9	EGI66394	33.2	3.9	3%	60	GFGTDEQAVLDVLAHR (Ion score: 38)

Continuação...

14	Rhopilin-2	EGI70407	35.8	8.2	1%	33	LVTMPDR Oxidation (M) (Ion score: 33)
15	Protein tyrosine phosphatase domain- containing protein 1	EFN88384	31.8	6.4	1%	37	GPSNLGGLWR (Ion score: 37)
16	Glutathione S-transferase	EGI70566	28.4	5.5	2%	88	LIYFPITALAEPIR (Ion score: 49) KRPPAIFSPN (Ion score: 45)
17	Glutathione S-transferase	EFN78063	27.9	5.8	9%	40	DDWEAMEIDATVDTIH DLR (Ion score: 40)
18	Putative aminopeptidase W07G4.4	EFN76290	26.0	5.6	3%	63	NSVGENCYVSDEVITAK (Ion score: 27) LKDHWVWVNDIK (Ion score: 65)
19	Peroxiredoxin – 6	EFN89160	28.8	6.5	16%	170	DHVDWVNDIK (Ion score: 23) VIDSLQLVDR (Ion score: 53) RPEIATPANWVPGEK (Ion score: 29)
20	Putative long-chain fatty acid transport protein-	Q1Z7T2_PH OPR	18.9	5.0	2%	45	NPAAMAMFDR Oxidation (M) (Ion score: 39)
21	Lipase 3	EFN70010	18.9	6.9	2%	46	FNHIDYLWGR (Ion score: 21)
22	fatty acid binding protein	ADE27971	14.1	5.7	6%	44	VDDIVCTR (Ion score: 44)
23	Protein abnormal spindle	EFN67743	17.9	7.3	1%	52	INMYIVKGALCVR Oxidation (M) (Ion score: 34) MTMYSRK Oxidation (M) (Ion score: 14)
24	PREDICTED: acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b-like	XP_0034246 21	17.23	7.4	2%	49	RLMGLLLPALLLLAR (Ion score: 49)
25	ecdysis triggering hormone preproprotein	NP_001136 107	61.3	5.8	9%	31	IGRSEPYDEYAIK (Ion score: 31)
26	MGC108409 protein sterol carrier protein 2	NP_001015 795	32.9	5.5	3%	43	NVYVGVGVTGKFMKP R + Oxidation (M) (Ion score 43)

A tabela 2 apresenta a porcentagem das proteínas diferencialmente expressas em cada uma das três comparações realizadas (0 h X Óleo 4 h; 0 h X Óleo 120 h; Óleo 4 h X Óleo 120 h). Na tabela 3 encontra-se a relação das proteínas identificadas por MALDI TOF-TOF, a partir dos extratos das glândulas pós-faríngeas das rainhas tratadas com óleo de soja e do grupo que não recebeu suplementação lipídica e em quais dessas condições essas proteínas tiveram sua expressão aumentada ou reprimida. As proteínas identificadas foram separadas em grupos funcionais para facilitar a discussão dos dados.

Tabela 2. Número de correspondências total de spots e o número de correspondências de proteínas diferencialmente expressas dos géis de eletroforese bidimensional nas comparações realizadas entre as três condições que as glândulas pós-faríngeas de *Atta sexdens rubropilosa* foram submetidas (0 h X Óleo 4 h; 0 h X Óleo 120 h e Óleo 4 h X Óleo 120 h).

Comparações		Total do N° de Correspondências	N° de Correspondências com proteínas diferencialmente expressas	% de Correspondências com proteínas diferencialmente expressas
Comparação 1	0 h X Óleo 4 h	69	28	40%
Comparação 2	0 h X Óleo 120 h	77	59	76%
Comparação 3	Óleo 4h X Óleo 120 h	76	36	47%

Tabela 3. Relação das proteínas das glândulas pós-faríngeas de *Atta sexdens rubropilosa* identificadas por meio do espectrômetro de massas MALDI TOF-TOF, com indicação de sub ou superexpressão nas diferentes comparações analisadas (0 h X Óleo 4 h; 0 h X Óleo 120 h e Óleo 4 h X Óleo 120 h). (=): representa sem diferença de expressão; (+): representa superexpressão; (-): representa subexpressão; (0): o spot não foi detectado no gel.

Grupo Funcional	Spot	Identificação	Comparação 1		Comparação 2		Comparação 3	
			0h	Óleo 4 h	0h	Óleo 120 h	Óleo 4 h	Óleo 120 h
Regulação Metabólica	3	PREDICTED: similar to 1D-myo-inositol-trisphosphate 3-kinase	+	0	-	+	0	+
	8	arginine kinase, partial	=	=	+	-	=	=
	9	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic	=	=	+	-	+	-
	15	Protein tyrosine phosphatase domain-containing protein 1	=	=	-	+	=	=
	18	Putative aminopeptidase W07G4.4	=	=	=	=	=	=
Transdução de Sinal	13	Annexin-B9	=	=	-	+	-	+
	14	Rhopilin-2	=	=	-	+	=	=
Proteína de Membrana	6	CKLF-like MARVEL trnsmembrane domain-containing protein 4	+	-	+	-	=	=
Restauração do Citoesqueleto	5	Tubulin beta-1 chain	=	=	+	-	+	-
	7	beta actin	=	=	=	=	+	-
	12	CLIP-associating protein, partial	=	=	+	-	=	=
	23	Protein abnormal spindle	-	+	-	+	-	+
Metabolismo Energético	10	Malate dehydrogenase, cytoplasmic, partial	=	=	=	=	=	=
	11	Isocitrate dehydrogenase (NADP) cytoplasmic	-	+	-	+	=	=

Continuação...

	2	Calreticulin	-	+	-	+	-	+
Mecanismo de Defesa	4	E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1	=	=	-	+	-	+
	16	Glutathione S-transferase	-	+	-	+	=	=
	17	Glutathione S-transferase	-	+	-	+	=	=
	19	Peroxiredoxin – 6	-	+	-	+	=	=
	1	Fatty acyl-CoA reductase 1	=	=	+	-	+	-
	20	Putative long-chain fatty acid transport protein	=	=	-	+	-	+
Metabolismo de Lipídios	21	Lipase 3	=	=	-	+	-	+
	22	fatty acid binding protein	=	=	-	+	=	=
	24	PREDICTED: acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b-like	-	+	-	+	=	=
	26	MGC108409 protein sterol carrier 2	0	0	0	+	0	+
Metabolismo de Esteróides	25	ecdysis triggering hormone preprotein	0	0	0	+	0	+

4.2 Dados obtidos por meio do espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF

Com o objetivo de aumentar o número de proteínas identificadas neste estudo, foram realizados experimentos através da técnica de “shotgun” com as 3 amostras de glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa* (0 h, Óleo 4 h e Óleo 120 h). Os dados gerados pelo espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF são qualitativos neste caso, não podendo ser quantificados. Em outras palavras, não é possível inferir se as proteínas identificadas por esta técnica estão super ou subexpressas nas rainhas tratadas com o óleo de soja ou naquelas que não receberam a suplementação de lipídios.

Para exemplificar um espectro gerado pelo equipamento LCMS-IT-TOF, na figura 6 está representado um espectro de MS (6A) e um espectro de MS/MS (6B) gerados a partir da amostra de formigas tratada com Óleo 4 h. A tabela 4 apresenta a relação das proteínas identificadas a partir desta segunda técnica utilizada no estudo.

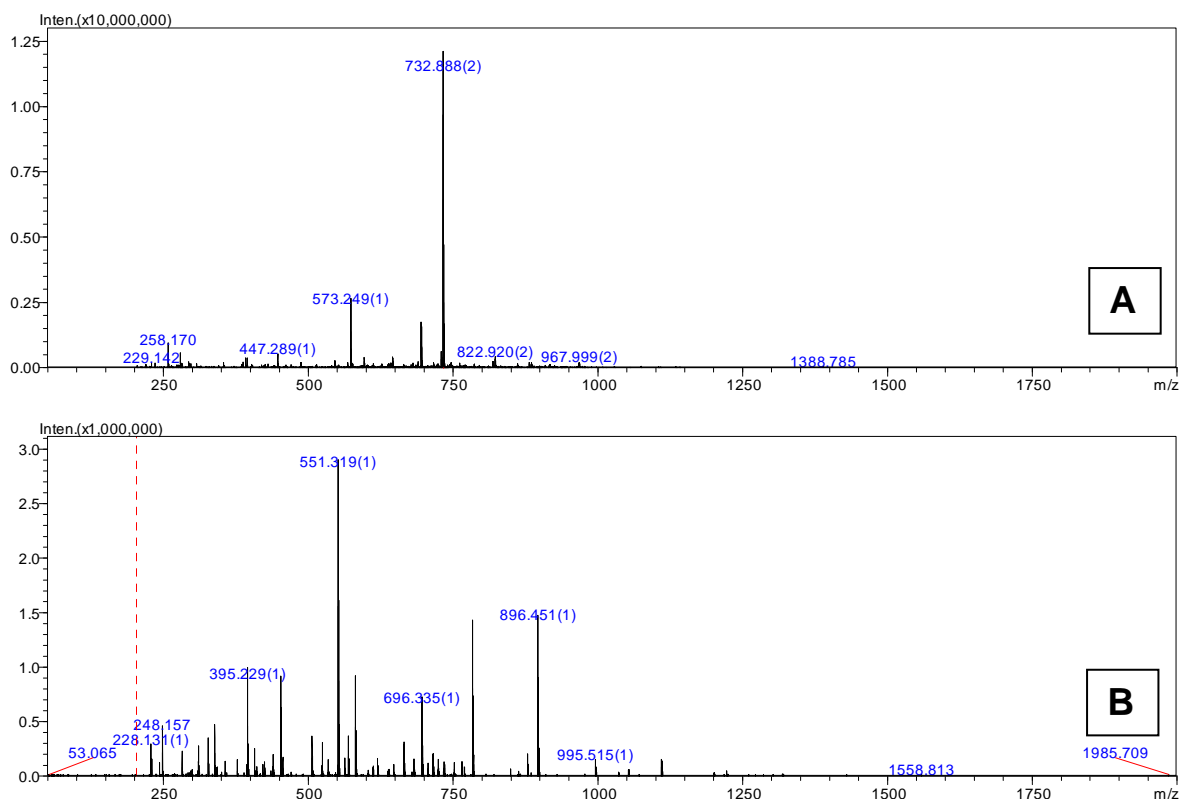


Figura 6 – A – Espectro MS referente ao tempo de retenção entre 41 e 42 min obtido a partir da análise LC-MS em coluna C-18 Shim-pack XR-ODS (3x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)]. B – Espectro MS/MS do peptídeo de massa molecular 1463.76 Da representado na figura A como o íon precursor 732.88 (carga +2). A amostra utilizada para este experimento é referente às glândulas pós-faríngeas das rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com óleo e dissecadas após 4 h do tratamento.

Tabela 4. . Relação de proteínas identificadas por meio do espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF, a partir dos extratos das glândulas pós-faríngeas de *Atta sexdens rubropilosa* do grupo que não recebeu suplementação de lipídios e dos grupos tratados com óleo, 4 h e 120 h. (Os nomes das proteínas estão em inglês, conforme resultado obtido no banco de dados).

Tratamento	Identificação e Grupo Funcional	Código de acesso	% Cobertura	Mascot Score	Sequência Ion Score
0 h	PREDICTED: ubiquitin-like protein 4A-like isoform 2 Mecanismo de Defesa	XP_624109	4%	32	KVIVKK (Ion score 32)
	Protein disulfide-isomerase Mecanismo Defesa	EGI70251	4%	50	YKPKPEITTENVLEFVTA FVEGK (Ion score 50)
	cytochrome c oxidase subunit II Metabolismo Energético	AAG17159	3%	20	LLDTANR (Ion score 20)
Óleo 4 h	Glutathione S-transferase Mecanismo de Defesa	EGI70566	2%	84	LIYFPITALAEPIR (Ion score 47) KIDQSTAIR (Ion score 17) IDQSTAIR (Ion score 20)
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Regulação Metabólica	EFN69158	10%	50	VVHDNFEIVEGLMTTVH AITATQK (Ion score 44)
	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9 Transdução de Sinal	EGI69223	4%	38	ILTLK (Ion score 30)
	Putative fatty acyl-CoA reductase, partial Metabolismo de lipídio	EGI69897	3%	23	LYQLNENDSMLKDSRR (Ion score 23)
	cytochrome c oxidase subunit II, partial Metabolismo Energético	AAF69222	2%	22	LINNK (Ion score 22)
	Transferrin Mecanismo de Defesa	EGI69239	5%	54	DRYDCIER (Ion score 13) TKEEPDAIYR (Ions score 19)
	Protein disulfide-isomerase Mecanismo de Defesa	EGI70251	4%	22	YKPKPEITTENVLEFVTA FVEGK (Ion score 22)
	beta actin Restauração do Citoesqueleto	ACX37099	5%	23	AVFPSIVGRPR (Ion score 19)
Peroxidasin-like protein Mecanismo de Defesa	EGI69034	2%	31	NLPMASPK (Ion score 24)	

5 Discussão

Em geral, as formigas não encontram disponíveis na natureza grandes quantidades de lipídios em suas fontes de alimento. Porém, quando submetidas à ingestão desses compostos, suas glândulas pós-faríngeas alteram profundamente sua morfologia (BUENO, 2005; DECIO et al., 2013). Bueno (2005) verificou que a aplicação de óleo de soja diretamente entre as peças bucais da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* resultou em um acúmulo gradativo no lúmen das glândulas pós-faríngeas, atingindo o máximo volume entre 4 e 8 h após a aplicação. Após 120 h essas glândulas permaneciam túrgidas, com menor volume, redução da quantidade de óleo no lúmen e, conseqüente aumento de vesículas lipídicas no interior das células.

Os resultados obtidos com a expressão diferencial de proteínas foram coerentes com as observações de Bueno (2005) e Decio e colaboradores (2013). A análise estatística (resumida na tabela 2) revelou diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo que não recebeu óleo de soja (0 h), sendo que a diferença de expressão protéica foi maior entre o grupo 0 h e o grupo tratado com Óleo 120 h (76%) do que entre 0 h e Óleo 4 h (40%) e entre os dois grupos tratados (47%). Portanto, após 4 h da aplicação, apesar das glândulas pós-faríngeas atingirem seu volume máximo e acumularem grande quantidade de óleo em seu lúmen houve um baixo aumento da expressão diferencial protéica, enquanto que após 120 h da aplicação, mesmo com a redução do volume total, houve grande aumento do número das proteínas diferencialmente expressas, indicando que na presença do óleo de soja há maior diferença no metabolismo das glândulas pós-faríngeas após as 4 primeiras horas do tratamento.

Acrescenta-se que os gráficos apresentados na figura 5 revelam a distribuição por grupos funcionais das proteínas diferencialmente expressas entre as comparações feitas no estudo, evidenciando um maior número de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios sendo expressas diferencialmente entre o grupo 0 h e o grupo com Óleo 120 h e entre os dois grupos tratados com óleo. Esses dados sugerem que, provavelmente, as glândulas estão apenas cheias de lipídios 4 h após a aplicação do óleo de soja, mas a atividade metabólica se diferencia significativamente somente horas depois.

Por outro lado, as proteínas envolvidas com o mecanismo de defesa apresentaram maior diferença de expressão na comparação entre os grupos 0 h e Óleo 4 h, indicando que o ambiente no interior das glândulas pós-faríngeas com alto teor de lipídios torna-se nocivo para

o metabolismo, desencadeando respostas ao estresse oxidativo. Este tipo de estresse decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al. 2010). Diversas etapas na via de redução do oxigênio nas mitocôndrias tem o potencial de produzir radicais livres altamente reativos, que podem danificar as células, reagindo com enzimas, lipídios de membranas e ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2009). Como a porcentagem relativa do número de proteínas diferencialmente expressas relacionadas ao mecanismo de defesa diminui nas comparações com o grupo tratado com óleo 120 h, é possível inferir que há uma tendência do sistema se reajustar depois das respostas ao estresse oxidativo ocasionadas pelo excesso de óleo no tratamento 4 h (gráficos da figura 5).

As proteínas identificadas como responsáveis pela transdução de sinal e pelo metabolismo de esteróides não apresentaram expressão diferencial 4 h após o tratamento com óleo de soja, enquanto que as proteínas de membrana e do metabolismo energético não apresentaram diferença de expressão entre os dois grupos de rainhas tratadas com óleo. Esses resultados apresentados nos gráficos da figura 5 revelam uma tendência da diferença de expressão entre os grupos funcionais de proteínas identificadas nas glândulas pós-faríngeas quando o óleo de soja está presente. De uma maneira geral, os grupos funcionais que apresentaram maior número de proteínas com diferença de expressão entre as comparações realizadas foram os grupos das proteínas envolvidas com o metabolismo de lipídios, com o mecanismo de defesa celular e com a restauração do citoesqueleto.

As proteínas dos spots **3, 8, 9, 15** e **18** foram identificadas como proteínas envolvidas com a **Regulação Metabólica**. As proteínas integrantes deste grupo funcional, também conhecidas como “housekeeping” são essenciais para a manutenção normal do metabolismo celular (FERGUSON, et al., 2005). A tabela 3 mostra que a proteína identificada como uma predita similar a “1D-myo-inositol-trisphosphate 3-kinase” (spot 3) e a “Protein tyrosine phosphatase domain-containing protein 1” (spot 15) apresentaram aumento de expressão na presença de óleo (grupo 120 h) em relação ao grupo que não recebeu tratamento (0 h). Essas duas proteínas estão relacionadas com o metabolismo de fosfato. As proteínas quinases são enzimas responsáveis por catalisar a fosforilação, transferindo grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia (como o ATP) para moléculas-alvo específicas (substratos), enquanto que as fosfatases atuam no sentido inverso, removendo os grupos fosfatos no processo de desfosforilação dos substratos. Estes dois tipos de enzimas trabalhando em conjunto

constituem um dos mecanismos mais importantes de regulação na célula eucariótica, permitindo que a adição/remoção do grupo fosfato altere a ligação de novos ligantes na superfície da proteína, atuando assim na sinalização celular e no processo de montagem e desmontagem de complexos protéicos em resposta aos estímulos externos. (VOET; VOET; PRATT, 2008; NELSON; COX, 2009).

A proteína “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”, também classificada aqui como uma proteína da regulação metabólica, foi identificada pelo segundo experimento realizado neste estudo (LCMS-IT-TOF) a partir da amostra das rainhas que receberam a suplementação lipídica 4 h (tabela 4). Esta enzima é responsável por catalisar a sexta etapa da glicólise convertendo o gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, que consiste na primeira das duas reações de conservação de energia da glicólise que no final leva à formação de ATP (VOET; VOET; PRATT, 2008; NELSON; COX, 2009). Além disso, a “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” desempenha funções relacionadas com a ativação da transcrição (ZHENG, et al. 2003), com a iniciação da apoptose (HARA, et al., 2005) e em células de mamíferos estas enzimas teriam um papel na fusão de membranas, na agregação de microtúbulos, na atividade da fosfotransferase, na exportação de RNA nuclear, na replicação e no reparo do DNA, entre outras funções relacionadas a patologias (SIROVER, 1999).

Este trabalho permitiu ainda a identificação de dois spots, **13** e **14**, como proteínas que desempenham um papel na **Transdução de Sinal**. A família das “Annexins” ou anexinas (spot 13) consiste de proteínas que ligam-se a fosfolipídios e são dependentes de cálcio e possuem um modo único de interagir com as membranas (GERKE; MOSS, 2002), enquanto que a “Rophilin-2” (spot 14) é uma proteína que atua na transdução de sinal através da formação de complexos com outras moléculas sinalizadoras intracelulares e quando está vinculada a enzima RhoA GTPases, desempenha um importante papel na organização do citoesqueleto, induzindo a formação de fibras de stress de actina e adesões focais (PECK et al., 2002). Ambas foram super expressas no tratamento com óleo 120 h em comparação com as rainhas que não receberam o tratamento (tabela 3). Uma tirosina fosfatase também foi identificada como uma proteína envolvida com a transdução de sinal pela técnica de shotgun com sequenciamento por LCMS-IT-TOF com a amostra das glândulas das rainhas tratadas com óleo 4 h (tabela 4). Em contrapartida, a única proteína do estudo classificada como uma **Proteína de Membrana**, referente ao spot **6** “CKLF-like MARVEL transmembrane domain-

containing protein 4”, teve sua expressão reprimida com as glândulas pós-faríngeas na presença do óleo.

As proteínas referentes aos spots **5, 7, 12 e 23** foram classificadas como pertencentes ao grupo funcional da **Restauração do Citoesqueleto**. O citoesqueleto, presente somente nas células eucarióticas, é responsável por dar estrutura e suporte as células, além de desempenhar um papel no transporte intracelular, na contratibilidade, mobilidade e na organização espacial das células (KARP, 2005). Apresenta uma estrutura altamente dinâmica, composta por três filamentos principais, os filamentos intermediários, os filamentos de actina e os microtúbulos, que formam uma espécie de malha interativa, capaz de se reorganizar continuamente sempre que a célula altera a sua forma, se divide ou responde ao ambiente (KARP, 2005; ALBERTS, et al, 2004).

A proteína de spot número 23, identificada como uma “Protein abnormal spindle” (fuso anormal), apresentou super expressão nos grupos de formigas tratadas com óleo em comparação com o grupo que não recebeu tratamento. Esta proteína é importante para direcionar o fuso mitótico nos pólos. Sua remoção causa a perda do centro de organização dos microtúbulos, gerando problemas durante a citocinese na divisão celular (AIDES; GLOVER, 1999; RIPARBELLI, et al, 2002). A proteína 12, por sua vez, identificada como “CLIP-associating protein, partial”, faz parte das proteínas que se associam especificamente com as extremidades dos microtúbulos atuando na instabilidade dinâmica podendo agir como fatores anti-catástrofe, contribuindo para a recuperação da polimerização dos microtúbulos (AKHMANOVA et al., 2001; KOMAROVA et al., 2002). As diferenças de expressão protéica neste grupo funcional (ver tabela 3) sugerem que as mudanças no epitélio das glândulas causadas pela turgidez devido a presença do óleo no tratamento 4 h e seu posterior esvaziamento já no tratamento com óleo 120 h, causam mudanças na expressão das proteínas responsáveis por manter a organização do citoesqueleto.

As duas proteínas identificadas como parte do **Metabolismo Energético**, referentes aos spots **10 e 11**, fazem parte do Ciclo do Ácido Tricarboxílico, responsável pela oxidação da Acetil CoA, que a cada volta no ciclo gera duas moléculas de CO₂ e conserva a energia livre liberada nos compostos NADH e FADH₂ (VOET; VOET; PRATT, 2008). A proteína identificada como a enzima “Isocitrate dehydrogenase (NADP) cytoplasmic” (spot 11), responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa do citrato para formar α -cetoglutarato (NELSON; COX, 2009), foi super expressa nos dois tratamentos com suplementação lipídica quando comparados com o as rainhas que não foram tratadas. Porém, a “Malate

dehydrogenase, cytoplasmic, partial” (spot 10), que catalisa a oxidação de L-malato a oxaloacetato (NELSON; COX, 2009), não apresentou diferença de expressão em nenhuma das comparações (tabela 3).

Outra proteína relacionada a esse grupo funcional foi identificada nas amostras das rainhas que não receberam suplementação lipídica e das que foram tratadas com óleo 4 h pela estratégia de shotgun com o sequenciamento pelo LCMS-IT-TOF (tabela 4). A “cytochrome c oxidase subunit II, partial” é uma enzima localizada na membrana mitocondrial nos eucariotos, e é a última proteína da cadeia transportadora de elétrons que catalisa a redução do oxigênio para a água, recebendo um elétron de cada uma das moléculas de citocromo c e transferindo-os para uma molécula de oxigênio, convertendo assim o oxigênio molecular em duas moléculas de água. Neste processo, dá-se a translocação de quatro prótons, que ajudam na formação de um potencial quimiosmótico que é usado pela ATP sintase para a formação de ATP (VOET; VOET; PRATT, 2008; NELSON; COX, 2009).

Além destas, não foram identificadas outras proteínas envolvidas com o metabolismo energético, tão pouco com a β -oxidação lipídica, processo pelo qual os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA para a entrada deste no Ciclo do Ácido Tricarboxílico para geração de energia (NELSON; COX, 2009). Assim, os resultados obtidos com este trabalho sugerem que as glândulas pós-faríngeas não estariam desempenhando um papel relevante na produção de energia.

Alguns dados obtidos neste estudo indicam também que quando as glândulas pós-faríngeas estão sob efeito do óleo de soja, as células começam a responder expressando proteínas ligadas aos **Mecanismos de Defesa**. O excesso de óleo ou os seus produtos metabólicos parecem intoxicar as células glandulares. As proteínas identificadas pelos experimentos de MALDI TOF-TOF relacionadas com estes mecanismos foram a **2, 4, 16, 17 e 19**.

A “Calreticulin” (spot 2) desempenha a função molecular de uma chaperona, que são um grupo de proteínas que interagem com polipeptídios parcialmente dobrados ou dobrados de forma incorreta, facilitando assim os mecanismos de enovelamento correto (NELSON; COX, 2009). Algumas vezes, chaperonas adicionais são necessárias para recuperar proteínas desnaturadas pelo calor ou para evitar o dobramento errôneo em condições de estresse (VOET; VOET; PRATT, 2008). Por sua vez, a “E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1” (spot 4) é ligada a ubiquitina que desempenha uma função importante na regulação de proteínas marcando aquelas que são indesejadas (por exemplo proteínas mal-dobradas) para que sejam

degradadas por organelas chamadas proteassomas (ROBINSON; ARDLEY; 2004). A presença dessas proteínas indica um mecanismo de defesa celular contra alguma condição estressante em que o organismo está sendo submetido, no caso o alto teor lipídico ao que as glândulas pós-faríngeas foram expostas.

A “Glutathione S-transferase” (referente aos spots 16 e 17) pertence a uma família multi-funcional, mas é muito conhecida por possuir um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). Por sua vez, a “Peroxiredoxin - 6” (spot 19) é uma peroxidase multifuncional dependente de tiol que catalisa a redução de diversos substratos de peróxido como hidroperóxido de hidrogênio (H_2O_2), outros hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito, desempenhando também função protetora em ambiente submetido ao estresse oxidativo (KNOOPS; LOUMAYE; VAN DER EECKEN, 2007). Uma importante organela para as reações oxidativas são os peroxissomos, que funcionam como sítios de utilização do oxigênio (ALBERTS, et al., 2004). Segundo Falco (1992) e Caetano (1998) encontram-se grande quantidade de peroxissomos no citossol das células das glândulas pós-faríngeas. Essas organelas apresentam enzimas responsáveis pela oxidação de diferentes substratos orgânicos que ocorre pela retirada de átomos de H^+ que são transferidos ao O_2 produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela reação das enzimas peroxidases. Como o O_2 é muito reativo para a célula, outra enzima, a catalase o converte em H_2O e O_2 . Por meio destas reações, os peroxissomos detoxificariam as células convertendo substâncias insolúveis (etanol, aldeídos, fenóis) em substratos solúveis e excretáveis (ALBERTS et al. 2004).

As duas “Glutathione S-transferase” e a “Peroxiredoxin – 6” foram super expressas nos dois tratamentos com óleo de soja em comparação com o grupo sem suplementação lipídica (tabela 3), indicando que o ambiente atípico nas glândulas pós-faríngeas com alto teor de lipídios provoca super expressão de proteínas envolvidas com a proteção das células contra o estresse oxidativo.

A técnica de shotgun com o sequenciamento pelo LCMS-IT-TOF permitiu identificar cinco tipos de proteínas envolvidas com os mecanismos de defesa celular (dados da tabela 4), algumas delas identificadas também pelo outro método utilizado neste estudo. A “Protein disulfide-isomerase” é uma enzima encontrada no retículo endoplasmático das células eucarióticas que funciona como chaperona, uma vez que catalisa a formação e a ruptura das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína das proteínas, permitindo com que elas encontrem rapidamente o arranjo correto para seu enovelamento (WANG; TSOU, 1993). Já a

“Transferrin” de insetos é uma proteína vitelogenética que é regulada pelo hormônio juvenil. Ela tem um papel no transporte de ferro para os ovos em alguns insetos, além de possuir a função de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a sobrevivência em casos de infecção (GEISER, D. L.; WINZERLING, 2012). Por sua vez, a “Peroxidasin” apresenta uma estrutura híbrida que combina um domínio funcionando como peroxidase com motivos que ocorrem tipicamente como partes de proteínas de interação extracelular. Esta proteína, potencialmente multifuncional, participa de diversos processos biológicos significativos como a remoção e a destruição de células que sofreram morte celular programada, além de ser segregada e ter funções associadas com a estabilização da matriz extracelular (NELSON, et al., 1994).

Em relação ao objetivo principal do estudo, que seria o de tentar inferir um possível papel das glândulas pós-faríngeas no **Metabolismo de Lipídios**, pela análise dos dados demonstrados na tabela 3, foram classificadas dentro deste grupo funcional as proteínas referentes aos spots **1, 20, 21, 22, 24 e 26**.

As gorduras são uma forma altamente eficiente de armazenamento de energia metabólica, pois os triacilgliceróis são menos oxidados do que as proteínas e os carboidratos, fornecendo mais energia por unidade de massa na sua oxidação completa (VOET; VOET; PRATT, 2008). De acordo com Arrese e Soulages (2010) os lipídios mais simples originados a partir de ácidos graxos são os triacilgliceróis ou triglicerídeos que são armazenados no corpo gorduroso dos insetos em gotículas de lipídios de modo semelhante ao tecido adiposo de mamíferos. A mobilização do depósito de triacilgliceróis é obtida por ação de lípases que hidrolisam estas moléculas liberando principalmente ácidos graxos e diacilglicerol, sendo esses últimos transportados via lipoforina hemolinfática para os devidos locais de utilização (CANAVOSO et al., 2001). Diferentemente dos mamíferos, onde o transporte de lipídios é feito por diversas lipoproteínas, nos insetos a lipoforina desempenha sozinha esse papel, transportando as diversas classes entre os vários órgãos (CHINO; TAKAHASHI, 1985).

Neste estudo, foi identificada uma “Lipase 3” (o spot 21) que foi super expressa nos tratamentos com suplementação lipídica em relação ao grupo que não recebeu tratamento, sugerindo que as glândulas pós-faríngeas estariam envolvidas diretamente na mobilização dos lipídios, que envolveria a quebra lipídica em ácidos graxos provocada pela ação das lipases para absorção pelas glândulas e, posteriormente, o transporte dos derivados resultantes dessa degradação via lipoforinas para os corpos gordurosos, outros órgãos alvos ou tecidos de armazenamento para possível utilização dessa fonte de energia. Em estudos com *Camponotus pennsylvanicus* Forbes e Macfarlane (1961) e Delage (1968) creditaram às glândulas pós-

faríngeas a digestão de gorduras ingeridas, por apresentarem também enzimas digestivas no lúmen celular, principalmente lipases.

Segundo Bueno (2005) e Massuretti (2012) o trajeto dos alimentos hidrossolúveis compreende a cavidade infrabucal, papo, ventrículo e reto; ao passo que os alimentos de origem lipídica passam pela cavidade infrabucal, glândulas pós-faríngeas e papo, mas não atingem o ventrículo. No entanto, Massuretti (2012) observou que operárias de *Atta laevigata* desenvolveram mecanismos aparentemente diferentes para utilizar os lipídeos ingeridos. As glândulas pós-faríngeas desta espécie de formiga teriam a função de absorver e armazenar os lipídeos que entram no sistema digestório, para posteriormente deslocá-los para a hemolinfa. Nessas formigas, se a quantidade de lipídeos ingerida for grande, o excesso é deslocado para o intestino médio a fim de ser eliminado.

A proteína 1, identificada como “Fatty acyl-CoA reductase 1” é uma enzima que pertence a família das oxidoredutases, e catalisa a formação de um álcool graxo a partir de uma acil-CoA em uma reação que requer NADPH como cofator para realizar esta redução (METZ et al., 2000). Álcoois graxos primários de cadeia longa são comumente encontrados em sua forma livre ou como um componente de ésteres de cera em plantas, insetos e mamíferos. Frequentemente, eles compõem a camada de ceras epicuticulares que fazem barreira nesses organismos em relação ao ambiente externo protegendo-os contra a dessecação, umedecimento e ataque de patógenos (METZ, et al. 2000; CHENG; RUSSEL, 2004). Esta foi a única proteína do grupo funcional do metabolismo de lipídios que foi sub expressa no grupo com óleo 120 h nas comparações com o grupo sem suplementação lipídica e com grupo com óleo 4 h. No experimento com LCMS-IT-TOF uma proteína putativa similar a esta foi identificada na amostra do grupo de rainhas alimentadas com óleo e dissecadas após 4 h.

A “Putative long-chain fatty acid transport protein” (spot 20) e a “Fatty acid binding protein” (spot 22) direcionam o deslocamento de lipídios para dentro ou para fora da célula, funcionando como transportadoras (UNIPROT, 2012). Ambas não apresentaram diferença de expressão entre o grupo 0 h e o grupo tratado com óleo 4 h, mas indicaram que o transporte de lipídios entre o lúmen e o interior celular das glândulas pós-faríngeas ocorreu de forma mais significativa no grupo com óleo 120 h, devido a super expressão dessas proteínas na comparação deste tratamento com o grupo que não recebeu suplementação lipídica.

Os esfingolipídios são muito abundantes na bicamada lipídica das membranas celulares. As esfingomielinas, esfingolipídios mais comuns, são ceramidas (estruturalmente

similares ao diacilglicerol) que parecem modular especificamente as atividades de proteínas quinases e fosfatases que estão envolvidas na regulação do crescimento e na diferenciação celular (VOET; VOET; PRATT, 2008). A proteína predita identificada a partir spot 24, “Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b-like” semelhante a esfingomielinase fosfodiesterase ou simplesmente esfingomielinase seria uma enzima hidrolase que estaria envolvida nas reações metabólicas dos esfingolipídios e seria responsável pela quebra de esfingomielinase em fosfocolina e ceramida. A ativação destas enzimas tem sido sugerida como uma via principal para a produção de ceramida em resposta ao estresse celular (HANNUM; OBEID, 2002). Os dados aqui apresentados sugerem que o excesso de óleo de soja nas glândulas pós-faríngeas ativa esta enzima em resposta ao ambiente celular submetido a estresse oxidativo, uma vez que houve super expressão desta proteína nos dois grupos tratados com óleo em relação ao grupo que não recebeu tratamento.

A “MGC108409 protein sterol carrier protein 2” (spot 26) classificada no grupo funcional das proteínas envolvidas com o metabolismo de lipídios, também está relacionada com o metabolismo de esteróides. Conhecida como “proteína de transferência de lipídios não específicos”, ela estimula o transporte de lipídios entre membranas *in vitro* (RITTER; DEMPSEY, 1971 apud ZHENG et al. 2008). Os esteróis são esteróides com 27 a 29 átomos de carbono. Sua estrutura química deriva do esterano, a molécula dos esteróides que contém 17 átomos de carbono dispostos em três anéis hexagonais e um pentagonal. Os esteróis possuem uma cadeia adicional lateral curta de oito ou mais átomos de carbono, ligada ao carbono-17, e a diferença deles para os esteróides é um grupo álcool ou hidroxila (-OH), ligado ao carbono-3 (NELSON; COX, 2009). Portanto, os esteróis são alcoóis secundários que desempenham diversas funções celulares e estão presentes na maioria das membranas celulares das células eucariotas, sendo o colesterol o principal esterol das células animais, uma vez que sua molécula é precursora de uma variedade de compostos com atividade biológica, tais como os hormônios esteróides, a vitamina D ou os sais biliares (VOET; VOET; PRATT, 2008; NELSON; COX, 2009). Segundo Clark e Block (1959) os insetos dependem da utilização de esteróides encontrados na dieta para sintetizarem seus próprios esteróides, como o colesterol e os hormônios ecdsteróides. O spot que gerou a identificação da proteína transportadora de esterol foi detectado com precisão apenas no gel do grupo de rainhas tratadas com óleo 120 h, indicando que o transporte de moléculas do tipo esterol aumentou 120 h após as rainhas receberem a suplementação de lipídios.

Com isso, a maior parte das proteínas envolvidas com o metabolismo de lipídios começou a atuar de maneira diferencial somente após 4 h da aplicação do tratamento com óleo, o que reforça a hipótese de que possivelmente nas primeiras 4 horas o lúmen das glândulas pós-faríngeas está carregado de lipídios, mas a metabolização destes dentro das células só se dá horas depois.

Outra proteína envolvida no **Metabolismo de Esteróides** foi identificada com o spot **25** como “Ecdysis triggering hormone preprotein”, ou seja, uma pré-proteína do hormônio desencadeador da ecdise. O hormônio promotor da ecdise dos insetos é a ecdisona, que juntamente com o hormônio juvenil, são os dois principais hormônios que regulam o polietismo temporal, no qual os insetos mais jovens são influenciados por uma quantidade maior de hormônio juvenil e com o decorrer da idade essa quantidade cai gradativamente com o concomitante aumento da concentração da ecdisona (ROBINSON, 1987). Os ecdisteróides como a ecdisona estão presentes não somente nos insetos mais jovens, mas também nos adultos reprodutores (CHAPMAN, 1998). De forma semelhante a proteína transportadora de esterol 2, o spot 25 só foi detectado com precisão no gel do grupo de rainhas tratadas com óleo 120 h. Porém, não é possível explicar exatamente o papel das glândulas pós-faríngeas no metabolismo de esteróides das rainhas de *A. sexdens rubropilosa*, partindo dos nossos resultados.

Os resultados obtidos neste trabalho são extremamente relevantes, uma vez que não há dados na literatura sobre o conteúdo protéico das glândulas pós-faríngeas na formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa*. O estudo da expressão diferencial das proteínas também foi importante para tentar entender o que ocorre com as glândulas pós-faríngeas quando as formigas recebem uma suplementação lipídica e de que maneira elas poderiam metabolizar esse excesso de lipídios.

A análise proteômica, por meio de técnicas como a eletroforese bidimensional, estratégia de shotgun e espectrometria de massas, mostrou ser uma abordagem eficiente na busca de ampliar os conhecimentos sobre as possíveis funções das glândulas pós-faríngeas. No entanto, este trabalho também fornece subsídios para a realização de novas pesquisas que procurem adotar abordagens diferentes para tentar elucidar completamente a função das glândulas pós-faríngeas e o significado biológico dessas estruturas estarem presentes somente nas formigas e em algumas vespas solitárias, suas precursoras filogenéticas.

Conclusões

- A abordagem proteômica permitiu a obtenção de um perfil protéico geral das glândulas pós-faríngeas de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, por meio da eletroforese bidimensional. Com o auxílio das ferramentas da bioinformática foram identificadas 26 proteínas a partir dos spots dos géis, submetidos à digestão e ao espectrômetro de massas MALDI TOF-TOF. Essas proteínas foram classificadas entre grupos funcionais como metabolismo de lipídios, energético e de esteróides, mecanismo de defesa, regulação metabólica, transdução de sinal, restauração do citoesqueleto e proteína de membrana. A utilização da estratégia de shotgun junto ao espectrômetro LCMS-IT-TOF permitiu a identificação de mais 7 proteínas diferentes, também classificadas entre estes mesmos grupos funcionais.

- O maior número de proteínas diferentemente expressas ocorreu na comparação entre o grupo de rainhas que não foi submetida a nenhum tratamento e o grupo que recebeu suplementação lipídica e foi dissecado 120 h depois do tratamento. Isto indica que 4 h após o tratamento, apesar das glândulas estarem túrgidas, o tempo percorrido é suficiente somente para o óleo atingir o lúmen. As maiores alterações no perfil protéico ocorreram no grupo tratado com óleo 120 h, momento em que os lipídios já estariam no interior das células, portanto já estariam sendo metabolizados.

- O aumento do volume das glândulas devido a presença do óleo de soja juntamente com o retorno ao estado natural das células epiteliais glandulares, quando os lipídios já foram metabolizados, deve provocar a expressão diferencial de proteínas envolvidas com a restauração do citoesqueleto.

- Além disso, a exposição das glândulas pós-faríngeas ao alto teor de lipídios provoca a super expressão de proteínas envolvidas com mecanismos de defesa celular em resposta ao estresse oxidativo, indicando um importante papel dessas glândulas na detoxificação celular quando há um excesso de lipídios.

- Os dados encontrados neste estudo sugerem que as glândulas pós-faríngeas não desempenhariam um papel relevante da produção de energia. Em contrapartida, a presença do óleo após 120 h provocou o aumento da expressão de uma proteína precursora de ecdisteróide, sugerindo a importância dos lipídios no metabolismo de esteróides.

- Os resultados obtidos sugerem que as glândulas pós-faríngeas atuam como órgão responsável pela retenção e absorção dos lipídios ingeridos, conseqüentemente promovem sua

mobilização com a participação de lípases na quebra lipídica gerando ácidos graxos. Desta forma, os lipídios seriam absorvidos pelas glândulas e, posteriormente, os derivados resultantes da degradação lipídica seriam transportados pela hemolinfa, via lipoforinas, para reserva no corpo gorduroso ou para outros órgãos alvos de intensa atividade metabólica na obtenção energia.

- Mais estudos são necessários com a utilização de novas abordagens para esclarecer totalmente as funções dessas glândulas, exclusivas das formigas e de algumas vespas solitárias.

Referências Bibliográficas

- AIDES, M. C.; GLOVER, D. M. Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers. **Science**, [S.I.], v. 283 p. 1733-1735, 1999.
- AKHMANOVA, A.; HOOGENRAAD, C. C.; DRABEK, K.; STEPANOVA, T.; DORTLAND, B.; VERKERK, T. VERMEULEN, W.; BURGERING, B. M.; ZEEUW, C. I.; GROSVELD, F.; GALJART, N. CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. **Cell**, Cambridge, v. 104, p. 923–935, 2001.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4th Edition. New York: Garland Science, 2002.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 34, n.4, p. 321- 329, 1967.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.**, Stanford, v. 55, p. 207-225, 2010.
- ATTYGALLE, A. B.; BILLEN, J. P. J.; MORGAN, E. D. The post- pharyngeal gland of workers of *Solenopsis geminata* (Hymenoptera : Formicidae) **Actes. Colloq. Insect. S.**, Toulouse, v.2, p. 75-86, 1985.
- AYRE, G. L. Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). **Ent. Exp. & Appl.**, Amsterdam, v. 6, p. 165- 70, 1963.
- BAGNÈRES, A.-G.; MORGAN, E.D. 1991: The postpharyngeal gland and the cuticle of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons. – **Experientia**, Basel, v, 47, p. 106-111, 1991.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23 p. 629-643, 2010.
- BUENO, O. C. **Filtro infrabucal e glândulas pós-faríngeas da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae)**. 2005. 107f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Rio Claro, SP. 2005.
- CAETANO, F. H.; CAMPOS, F. D. C. L.; FALCO, J. R. P.; DE LIMA, V. L. Presence of nematodes in the post- pharyngeal gland of ants *Camponotus rufipes* (Hymenoptera : Formicidae). In: **Jornada Paulista de Parasitologia**, Campinas. IEL - Centro Acadêmico Unicamp. p.8., 1990.
- CAETANO, F. H. **Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae)**. 1998, 137 f. Tese (Livre - Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Rio Claro, SP. 1998.

CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: Biologia e Anatomia**. Araras: Topázio. 2002. 131p.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v. 21, p. 23-46, 2001.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Folha técnica: Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CELIS, J. E.; OSTERGAARD, M.; RASMUSSEN, H. H.; GROMOV, P.; GROMOVA, I.; VARMARK, H.; PALSDOTTIR, H.; MAGNUSSON, N.; ANDERSEN, I.; BASSE, B.; LAURIDSEN, J. B.; RATZ, G.; WOLF, H.; ORNTOFT, T. F.; CELIS, P.; CELIS, A. A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, n. 2, p. 300-309, 1999.

CHAPMAN, P. J. Petroleum oils for the control of orchard pests. **New York State Agricultural Experiment Station Bulletin** n.814, 1967.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**, 4th Edition. United Kingdom: Cambridge University Press, 1998. p.770.

CHAVES, D. F. S. **Análise proteômica das estirpes selvagem, ntrC- e nifA- DE *Herbaspirillum seropedicae***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CHENG, J. B.; RUSSELL, D.W. Mammalian wax biosynthesis – I. Identification of two fatty acyl-coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 279, p. 37789–37797, 2004.

CHINO, H., TAKAHASHI, K. Action of Adipokinetic Hormone on Lipophorin in Locusts. **Zool. Sci.** [S.I.], v. 2, p. 906-906, 1985.

CLARK, A. J.; BLOCK, K. The absence of sterol synthesis in insects. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 234, p. 2578-2582, 1959.

DECIO, P.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; BUENO, F. C.; BUENO, O. C. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Micron**, New York, v. 45, p. 22-31, 2013.

DELAGE, B. Recherches sur les fourmis moissonneuses du Bassin Aquitain: éthologie. Physiologie de l' alimentation. **Ann. Sci. Nat. Zool.**, Paris, v.10, p. 197 - 266. 1968.

DELAGE-DARCHEN, B. Les glandes post-pharyngiennes des fourmis connaissances actuelles sur leur structure, leur fonctionnement, leur rôle. **Annee. Biol.**, Paris, v. 15, n. 4, p. 63- 76, 1976.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. 262p.

DIAS, N. B. **O uso de um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MSn na prospecção de novos componentes peptídicos do veneno da vespa social *Polybia paulista***. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. Box 1: Principles of shotgun (or discovery) proteomics. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 28, p.710–721, 2010.

DUNN, M. J. Studying heart disease using the proteomic approach. **Drug. Discov. Today**, Kidlington, v. 5, p. 76-84, 2000.

FALCO, J. R. **Comparação ultraestrutural entre glândulas pós-faríngeas de *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: Formicidae) parasitadas e não por nematóides**. 1992. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1992.

FERGUSON, R. E.; CARROLL, H. P.; HARRIS, A.; MAHER, E. R.; SELBY, P. J.; BANKS, R. E. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 566-571, 2005.

FERREIRA, C. R.; FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, J. S.; SANVIDO, G. B.; PERECIN, F.; CATHARINO, R. R.; SIMAS, R. C.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; JUNIOR, M. H.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; MEIRELLES, F. V.; COELHO, M. B.; D'ANGELO, M.; EBERLIN, M. N. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. In: Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal, 2. 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009, p. 109-136.

FORBES, J.; MACFARLANE, A. M. The comparative anatomy of digestive glands in the female castes and the male of *Camponotus pennsylvanicus* Degeer (Formicidae, Hymenoptera). **J. N. Y. Entomol. Soc.**, Lawrence, v. 69, p. 92 - 103, 1961.

GAMA, V. O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera: Formicidae). **Rev. Brasil. Biol.**, São Carlos, v. 45, n. 3, p. 317-359, 1985.

GEISER, D. L.; WINZERLING, J. J. Insect transferrins: Multifunctional proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1820, p. 437–451, 2012.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: From Structure to Function. **Physiol. Rev.**, Baltimore, v. 82, p. 331-371, 2002.

GRAVES P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiol. Mol. Biol R.**, New York, v. 66, n. 1. p. 39-63, 2002.

HAINES, B. L. Element and energy flows through colonies of leaf-cutting ant, *Atta colombica*, in Panama. **Biotropica**, Hoboken, v. 10, n. 4, p. 270-277, 1978.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 277, n. 29, p. 25847–25850, 2002.

HARA, M. R.; AGRAWAL, N.; KIM, S. F.; CASCIO, M. B.; FUJIMURO, M.; OZEKI, Y.; TAKAHASHI, M.; CHEAH, J. H.; TANKOU, S. K.; HESTER, L. D.; FERRIS, C. D.; HAYWARD, S. D.; SNYDER, S. H.; SAWA, A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **Nat. Cell Biol.**, London, v. 7, n. 7, p. 665–74, 2005.

HARTREE, E.F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.** New York. v, 48, n.2, p. 422-427, 1972.

HERZNER, G.; GOETTLER, W.; KROISS, J.; PUREA, A.; WEBB, A. G.; JAKOB, P. M.; RÖSSLER, W.; STROHM, E. Males of a solitary wasp possess a postpharyngeal gland. **Arthropod Struct. Dev.**, Oxford, v. 36, p. 123-133, 2007.

HERZNER, G.; RUTHER, J.; GOLLER, S.; SCHULZ, S.; GOETTLER, W.; STROHM, E. Structure, chemical composition and putative function of the postpharyngeal gland of the emerald cockroach wasp, *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). **Zoology**, [S.I.] v. 114, p. 36–45, 2011.

HESLER L. S.; PLAPP, F. W. Jr. Uses of oils in insect control. **Southwest. Entomol. Suppl.** [S.I.] v.11, p.1-8, 1986.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732p.

HUBER P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA. Glutationa e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**. São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JANET, M. **Anatomie de la tête du *Lasius niger***. Paris: Limoges. Imprimeire-libraire Ducourtieux et Gout. 1905. 40p.

JEONG, H.; RHIM, T.; AHN, M. H.; YOON, P. O.; KIM, S. H.; CHUNG, I. Y.; UH, S.; KIM, S. I.; PARK, C. S. Proteomic analysis of differently expressed proteins in a mouse model for allergic asthma. **J. Korean Med. Sci.**, Korea, v.20, p. 579-585, 2003.

KARP, G. **Biologia Celular e Molecular**. 3 Ed. Barueri: Manole, 2005. p. 333-396.

KNOOPS, B.; LOUMAYE, E.; VAN DER EECKEN, V. Evolution of Peroxiredoxin. **Sub-cell Biochem**. New York, v. 44, p. 27-40, 2007.

KOMAROVA, Y.; AKHMANOVA, A. S.; KOJIMA, S.; GALJART, N.; BORISY, G. G. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. **J. Cell Biol.**, New York, v.159, n. 4, p. 589-599, 2002.

KÜSTER, B.; SHEVCHENKO, A.; MANN, M. Mass spectrometry of proteolysis-derived peptides for protein identification IN: BEYNON, R.; BOND, J. S. (Ed.) **Proteolytic Enzymes** 2nd. New York: Oxford University Press, 2001, p. 149-185.

LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, M. B. A química analítica do proteoma. **Revista Analytica**. [S.I.] n. 06, p. 60-66, 2003.

LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.) **Fire ants and leaf-cutting ants**. Biology and management. Boulder and London: Westview Press. 1986. 435p.

MASSURETTI, C. J. Análise comparativa das glândulas pós-faríngeas e sua participação na utilização de lipídeos pelas formigas (Hymenoptera: Formicidae). 2012. 127f. Tese de Doutorado (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2012.

MATSUMURA, F. **Toxicology of insecticides**. New York: Plenum Press, 1975, 503p.

METZ, J. G.; POLLARD, M. R.; ANDERSON, L.; HAYES, T. R.; LASSNER, M. W.; Purification of a Jojoba embryo fatty acyl-Coenzyme A reductase and expression of Its cDNA in high erucic acid rapeseed. **Plant Physiol.**, Minneapolis, v. 122, p. 635-644, 2000.

MORGAN, D. Chemical sorcery for sociality: Exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, Vienna, v. 11, p. 79-90, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.) **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1273 p.

NELSON, R. E.; FESSLER, L. I.; TAKAGI, Y.; BLUMBERG, B.; KEENE, D. R.; OLSON, P. F.; PARKER, C. G.; FESSLER, J. H. Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. **Embo J.**, Oxford, v.13 n.15 p.3438-3447, 1994.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. London, v. 405, p. 837-846, 2000.

PECK, J. W.; PECK, J. W.; OBERST, M.; BOUKER, K. B.; BOWDEN, E.; BURBELO, P. D. The RhoA-binding protein, Rhophilin-2, regulates actin cytoskeleton organization. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 277, n. 46, p. 43924-43932, 2002.

PEREGRINE, D. J.; MUDD, A.; CHERRETT, J. M. Anatomy and preliminary chemical analysis of post-pharyngeal glands of leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae). **Insect Soc.**, Paris, v. 20, n. 4, p. 355- 363, 1973.

PEREGRINE, D. J.; MUDD, A. 1974. The effects of diet on the composition of the postpharyngeal glands of *Acromyrmex octospinosus* (Reich). **Insect Soc.**, Paris, v. 21, n. 4, p. 417-424.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

- QUEIROGA, C. L. **Espectrometria de Massas**. Capítulo 2: Analisadores de Massas. 2.8-QTRAP. 2012. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=44&numero=8>> Acesso em: 08 nov. 2012.
- RABILLOUD, T. **Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification Methods**. Berlim: Springer-Verlag, 2000. 245p.
- RIPARBELLI, M. G.; CALLAINI, G.; GLOVER, D. M.; AVIDES, M. C. A requirement for the Abnormal Spindle protein to organise microtubules of the central spindle for cytokinesis in *Drosophila*. **J. Cell Sci.**, London, v. 115, p. 913-922, 2002.
- ROBINSON, G. E. Regulation of honey bee age polyetism by juvenile hormone. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, New York, v. 230, p. 329-338, 1987.
- ROBINSON, P. A.; ARDLEY, H. C. Ubiquitin-protein ligases. **J. Cell Sci.**, London, v. 117, p. 5191-5194, 2004.
- SAWAYA, A. C. H. F. **Espectrometria de Massas**. Capítulo 2: Analisadores de Massas. 2.1-TOF. 2012. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=24&numero=1>> Acesso em: 08 nov. 2012.
- SCHOETERS, E.; BILLEN, J. The postpharyngeal gland in *Dinoponera* ants (Hymenoptera: Formicidae): unusual morphology and changes during the secretory process. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.**, Oxford, v. 25 n. 4, p. 443- 447, 1997.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M.; Mass spectrometric sequencing of proteins in silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, p. 850-858, 1996.
- SILVA, A. M. S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica - Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em revista**. Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2007.
- SIROVER, M. A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1432, p. 159-184, 1999.
- SOROKER, V.; HEFETZ, A. 2000: Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 46, p. 1097-1102, 2000.
- SOROKER, V.; VIENNE, C., NOWBAHARI, E.; HEFETZ, A. The post-pharyngeal gland as a “gestalt” organ for nestmate recognition in ant *Cataglyphis niger*. **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v. 81, p. 510- 513, 1994.
- SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O. Análise de Proteomas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. [S.I.], n. 29, p. 12-14, 2002.
- STEEN, H.; KUSTER, B.; MANN, M. Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning. **J.**

Mass Spectrom., Nashville, v. 36, n. 7, p. 782-790, 2001.

SUMIDA, S. **Análise Morfológica dos túbulos de Malpighi, do ventrículo e das glândulas pós-faríngeas das operárias adultas de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908, tratadas com compostos químicos.** 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP. 2007.

THOMPSON, M. J.; GLANCEY, B. M.; ROBBINS, W. E.; LOFGREN, C. S.; DUTKY, S. R.; KOCHANSKY, J.; VANDER MEER, R. K.; GLOVER, A. R. Major hydrocarbons of the postpharyngeal glands of mated queens of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*. **Lipids**. [S.I.], v. 16, n. 7, p. 485- 495, 1981.

UNIPROT, 2012. Disponível em: <<http://www.uniprot.org>> Acesso em: 08 nov. 2012.

VANDER MEER, R. K.; GLANCEY, B. M.; LOFGREN, C. S. Biochemical changes in the crop, oesophagus and post-pharyngeal gland of colony- founding red imported fire ant queens (*Solenopsis invicta*). **Insect Biochem.**, Londres, v. 12, n. 1, p. 123- 127, 1982.

VINSON, S. B.; PHILLIPS, S.A.; WILLIAMS, H.J. The function of the post- pharyngeal glands of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 20, p. 645- 650, 1980.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A vida em nível Molecular.** 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264 p.

WANG, C. -C; TSOU C. -L. Protein disulfide isomerase is both a enzyme and a chaperone. **FASEB J.**, Bethesda, v. 3, p. 1515-1517, 1993.

WHEELER, W. N. **Ants: their structure, development and behavior.** New York: Columbia Univ. 1926. 663p.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. R. (Ed.) **Proteome research: new frontiers in functional genomics.** Berlim: Springer -Verlag, 1997. 239p.

ZHENG, L.; ROEDER, R. G.; LUO, Y. "S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component". **Cell**, Cambridge, v. 114, n. 2, p. 255–66, 2003.

ZHENG B. S.; RÖNNBERG, E.; VIITATEN, L.; SALMINEN, T. A.; LUNDGREN, K.; MORITZ, T.; EDQVIST, J. *Arabidopsis* sterol carrier protein-2 is required for normal development of seeds and seedlings. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 3485–3499, 2008.

ZYLBERBERG, L.; JEANTET, A.Y.; DELAGE-DARCHEN, B. Particularités structurales del' intima cuticulaire des glandes post- pharyngiennes des fourmis. **J. Microscopie**, Paris, v. 21, p. 331-342, 1974.