

JULIANA MALTA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE ESPERMATECAS DE FÊMEAS VIRGENS E
RAINHAS FECUNDADAS DE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M261a
2012

Malta, Juliana, 1985-

Análise proteômica de espermatecas de fêmeas virgens e rainhas fecundadas de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) / Juliana Malta. – Viçosa, MG, 2012.

x, 69f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 57-69.

1. Formiga-cortadeira. 2. Saúva (Formiga). 3. Proteínas. 4. Espermateca. 5. Proteínas - Análise. 6. Formiga - Reprodução. 7. Hymenoptera. 8. Formicidae. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.796

JULIANA MALTA

ANÁLISE PROTEÔMICA DE ESPERMATECAS DE FÊMEAS VIRGENS E
RAINHAS FECUNDADAS DE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA:17 de fevereiro de 2012.

Maria Cristina Baracat-Pereira

Myriam M. Ramos Ribeiro

Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

*Aos meus pais, por sempre acreditarem
que seria possível, não me deixando
desistir, e por todas as vezes que
abdicaram dos seus sonhos em função
dos meus e dos meus irmãos, Aos meus
irmãos pelo carinho e amizade, Ao
meu amado Vi, por todo amor e
incentivo sempre,
Dedico e ofereço...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde e fé,

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Geral (DBG), pela oportunidade de formação que me foi proporcionada pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Prof^a. Tânia Maria Fernandes Salomão, pela orientação, confiança, amizade, paciência, pelos conselhos e palavras boas sempre. Por me ensinar a também ser paciente e por ter acreditado no meu trabalho e não ter me deixado desistir quando pensei que não seria possível.

Ao meu co-orientador Prof. Gustavo Ferreira Martins, pelas sugestões durante a realização deste trabalho, pelo apoio e pela confiança.

À Prof^a. Maria Cristina Baracat-Pereira, pelo apoio e confiança, por permitir a realização de alguns experimentos em seu laboratório e também pela ajuda de seus orientandos, pelas sugestões na realização desse trabalho.

À Prof^a Teresinha Maria Castro Della Lúcia, por permitir a utilização do insetário no início do experimento, e por conceder o técnico para ajuda nas coletas de campo.

Ao Sr. Manoel, técnico do Insetário Central da UFV, pessoa sempre alegre, que cativa a todos que o conhecem, pela imensa ajuda durante as coletas de campo.

À Beth, secretária da Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela atenção que sempre tem com todos os alunos.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP), Ana Ermelinda, Patrícia Games, Marcos Jorge, Lana Clícia e estagiários, por toda ajuda durante esse trabalho pela amizade, pelos bons momentos.

Às amigas de Caratinga, Tamara, Ivny, Micheli e Flaviane, pela amizade, por torcerem sempre por mim.

Às amigas de república de Viçosa, Leilane, Patrícia, Ana Claudia e Leila, pela amizade e companheirismo, pelas boas risadas compartilhadas, pelo carinho e por tornarem meus dias mais alegres.

Aos meus queridos pais Maria Madalena Malta de Freitas e Genício Malta de Freitas, pelo amor, confiança, por sempre me fazerem acreditar que seria possível e que eu seria capaz. Por sempre fazerem da educação dos filhos uma prioridade, mesmo com tantas dificuldades que a vida nos impôs. Por entenderem a minha ausência em alguns momentos.

Aos meus queridos irmãos Alexandra, Juninho e Guilherme, pela infância alegre que tivemos, que ajudou a formar minha personalidade de hoje, pelo imenso amor que temos uns pelos outros, pela amizade que me faz tão bem.

À minha sobrinha Maria Alice, por alegrar minha tanto minha vida desde que veio ao mundo.

Ao meu amado Vicente pelo amor, confiança, amizade e carinho sempre. Pela compreensão, quando por muitas vezes estive ausente. Foi com você que aprendi o verdadeiro significado das palavras companheirismo, otimismo, respeito e paciência, obrigada por estar ao meu lado e entender meus momentos de ausência. Ter você ao meu lado me fez entender que a vida só é mais feliz quando se é amada e quando se ama de verdade.

Aos meus avós Alexandre Quintino, Alzira Freitas (in memoriam) e Tarcilia Angélica, pelas orações e palavras de apoio, sempre me incentivando e que mesmo sem terem a oportunidade de estudar, sabiam que este seria o melhor caminho,

À Dorinha, minha querida amiga, pelas orações, pelo cuidado e carinho que tem comigo, por ser minha família em Viçosa e tornar meus dias mais felizes aqui.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho.

Agradeço...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - O gênero <i>Atta</i>	1
1.2 - A espermateca dos insetos	3
1.3 – Proteoma	5
1.4 - Metodologias aplicadas em análise proteômica	6
1.4.1- Eletroforese Bidimensional (2DE)	6
1.4.1.1- Primeira Dimensão - Focalização isoeletrica (IEF)	7
1.4.1.2- Segunda Dimensão - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	7
1.4.2 - Espectrometria de Massas (MS)	9
1.5 - Estudos proteômicos em insetos	11
2 - OBJETIVO	16
3 – METODOLOGIA	18
3.1- Amostras	18
3.2 - Extração das proteínas	18
3.3 - Determinação da concentração protéica	19
3.4 - Eletroforese bidimensional	19
3.4.1- Primeira Dimensão - Focalização Isoeletrica (IEF)	19
3.4.2- Segunda Dimensão (SDS-PAGE)	23

3.4.3- Coloração dos géis obtidos pela eletroforese bidimensional	23
3.4.4 - Captura das imagens e análise dos géis bidimensionais	24
3.4.5 - Excisão dos spots e digestão trípica das proteínas	24
3.4.6 - Análise por espectrometria de massas	26
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 - Método de extração de proteínas	29
4.2- Análise comparativa com base nas imagens obtidas	30
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando as etapas da eletroforese bidimensional 2DE.....	8
Figura 2 – Desenho esquemático simplificado ilustrando algumas etapas envolvidas na análise por espectrometria de massas.....	10
Figura 3 - Sistema de Focalização Isoeletrica Ettan IPGphor 3, modelo <i>Ettan IPGphor cup loading manifold</i> (GE Healthcare).....	20
Figura 4 - Ilustração dos procedimentos utilizados durante a Focalização Isoelétrica (Fonte: Manual 2-D <i>Electrophoresis Principles and Methods</i> 2004/modificado).....	22
Figura 5 - Seleção dos parâmetros de busca no <i>Peptide Mass Fingerprint</i> (PMF) do algoritmo MASCOT 4.....	27
Figura 6 – Perfil eletroforético de proteínas da espermateca de rainhas fertilizadas.....	29
Figura 7 – Géis bidimensionais de referência, evidenciando (em verde) os <i>spots</i> indicando proteínas diferencialmente expressas nos grupos analisados.....	31
Figura 8 – Réplicas dos perfis bidimensionais dos extratos protéicos de espermatecas de rainhas virgens.....	35
Figura 9 – Réplicas dos perfis Bidimensionais dos extratos protéicos de espermatecas de rainhas fecundadas.....	36
Figura 10 - Expressão diferencial da proteína Lipase 3.....	38
Figura 11 - Expressão diferencial da proteína Yolk Protein.....	41
Figura 12 - Expressão diferencial da proteína Vitelogenina.....	42
Figura 13 - Expressão diferencial da proteína Citocromo P450.....	43
Figura 14 - Expressão diferencial da proteína Subunidade Catalítica da enzima ativadora E1 - Nedd8.....	45
Figura 15 - Expressão diferencial da proteína Receptor Dopamina D2-like.....	46
Figura 16 - Expressão diferencial da proteína Fator de alongação 1 Alpha.....	48
Figura 17 - Expressão diferencial da proteína Cdc6.....	49
Figura 18 - Expressão diferencial da proteína Fator de Replicação C.....	51
Figura 19 - Expressão diferencial da proteína Actina 5-C.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para focalização isoeétrica.....	22
Tabela 2 – Dados obtidos por análises dos perfis bidimensionais utilizando software <i>Image Master</i>	32
Tabela 3 – Proteínas preditas por <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> (PMF).....	33
Tabela 4 - Distribuição das proteínas identificadas por PMF de acordo com a categoria funcional de cada uma	37

RESUMO

MALTA, Juliana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Análise proteômica de espermatecas de fêmeas virgens e rainhas fecundadas de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão.

As formigas cortadeiras do gênero *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas, pertencem à Tribo *Attini*, família Formicidae e ordem Hymenoptera, a qual também inclui as abelhas e as vespas. Assim como na maioria das fêmeas de insetos, as rainhas deste gênero possuem um órgão que armazena espermatozoides após o acasalamento, conhecido como espermateca. A estocagem do esperma na espermateca permite a fertilização dos ovos independentemente da presença do macho. O tempo de armazenamento do esperma varia entre os insetos, podendo chegar a 20 anos nas formigas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar proteínas diferencialmente expressas na espermateca de fêmeas virgens e de rainhas fecundadas da espécie de formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, visando obter dados que poderão contribuir para o entendimento da biologia reprodutiva dessa espécie. Para isso, fêmeas virgens e rainhas fecundadas foram coletadas no campo no dia da revoada e as espermatecas dissecadas. Posteriormente, as proteínas das espermatecas foram extraídas e submetidas à eletroforese bidimensional. Os perfis protéicos foram analisados e 22 *spots* que indicavam expressão diferencial foram excisados e submetidos à espectrometria de massas para identificação. Dentre as proteínas presentes nestes 22 *spots*, 16 apresentaram possível homologia com proteínas descritas nos bancos de dados utilizados, sendo que seis foram consideradas proteínas desconhecidas. Apenas a proteína Actina 5-C, identificada na espermateca de rainhas fecundadas, apresentou dados de identificação significativa, embora os valores de massa e pI da maioria das outras proteínas tenham sido próximos aos da proteína com a qual houve homologia. Além disso, valores de % de cobertura da sequência, *scores* e número de *matches* foram consideráveis para algumas das proteínas avaliadas, o que indica que estudos mais detalhados com essas proteínas poderão ser úteis para ampliar os conhecimentos acerca das mesmas e facilitar a sua real identificação. Os resultados obtidos poderão também ser úteis em estudos futuros objetivando a compreensão do papel de proteínas da espermateca de *A. sexdens rubropilosa* e, conseqüentemente, de outros insetos, no processo de armazenamento e manutenção de grandes quantidades de gametas viáveis nesse órgão.

ABSTRACT

MALTA, Juliana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2012. **Proteomic analysis of the spermathecae in inseminated and virgin queens of *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**. Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão.

The leaf-cutting ants of the *Atta* genus, popularly known as ants belong to the Attini tribe, Formicidae family and Hymenoptera order, which also includes bees and wasps. Like most female insects, queens of this genus have an organ that stores sperm after the mating act, known as the spermatheca. The sperm storage inside of spermatheca allows the fertilization of ant eggs, regardless the presence of the male. The sperm storage time varies among insects, reaching 20 years in ants. Thus, this study aimed to evaluate the differentially expressed proteins that were found inside the spermatheca of two different groups of ants: virgin females and fertilized queens, both species of leaf cutter ant called *Atta sexdens rubropilosa*. The main purpose of this work was to obtain data that could contribute to understand the reproductive biology of this specie. For this, the first step was collect virgin females and inseminated queens during the nuptial flight on the field. In a second stage, the spermatheca was dissected. Subsequently, the spermatheca proteins were extracted and subjected to two-dimensional electrophoresis. The protein profiles were analyzed and 22 spots that showed differential expression were excised and subjected to mass spectrometry for identification. Among the proteins present in these 22 spots, 16 showed homology with proteins that can be found into known databases, and six ones were considered unknown proteins. Only the protein actin 5-C, identified in the fertilized queens spermatheca has presented significant identification. On the other hand, most of remaining proteins molecular weight and isoelectric point have been presented to be similar to those ones that the homology was matched. Furthermore, the coverage percentage values of the sequence and the number of scores were significant for some evaluated proteins previously matched. The results may also be useful in future studies aimed at understanding the role of proteins inside the spermatheca of this species and hence to other insects, specially during the process of storage and maintenance of large viable quantities of this organ.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- O GÊNERO *ATTA*

Popularmente conhecidas como “saúvas”, as formigas do gênero *Atta*, pertencem à tribo *Attini* da família Formicidae e ordem Hymenoptera a qual também inclui as abelhas e as vespas. As formigas desta tribo são exclusivas do novo mundo, e apresentam vasta distribuição na região neotropical (Weber, 1972). A tribo *Attini* é composta atualmente por cerca de 230 espécies distribuídas em 12 gêneros. (Brandão & Mayhé-nunes, 2001; Della Lucia & Souza, 2011).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* abrigam as formigas mais comumente conhecidas como formigas-cortadeiras e caracterizam-se por apresentarem ninhos grandes, colônias populosas e ambos cultivam seu fungo pela incorporação de partes frescas de vegetais, principalmente folhas. (Hölldobler & Wilson, 1990; Della Lucia & Souza, 2011). O gênero *Atta* apresenta ampla distribuição geográfica no continente americano desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, inexistindo no Chile, no Canadá e em algumas ilhas das Antilhas (Mariconi, 1970).

As formigas do gênero *Atta* são consideradas insetos eussociais por apresentarem sobreposição de gerações, alto grau de organização, cuidado com a prole e divisão em castas. A casta temporária é constituída pelos reprodutores machos e fêmeas (alados) que são encontrados na colônia somente em determinadas épocas do ano, e saem do ninho na revoada (vôo nupcial), e as castas permanentes são formadas pela rainha, fêmea áptera e fundadora do saueiro, além das operárias estéreis as quais possuem diferentes funções na colônia (Hölldobler & Wilson, 1990; Caetano *et al* 2002; Souza *et al* 2011).

A fêmea alada de *Atta* (içá ou tanajura) possui aparelho reprodutor desenvolvido e, portanto, potencial para ser fertilizada, podendo se tornar rainha ao ser fecundada (Hölldobler & Wilson, 1990). A fecundação das fêmeas ocorre durante o vôo nupcial, que nas espécies de *Atta*, acontece quando o ninho é adulto, pouco mais de três anos após a fundação do mesmo (Mariconi, 1970; Della Lucia & Bento, 1993). Após o início da fundação da colônia, geralmente monogínica (apresentam uma só rainha), ainda na primeira câmara ou “panela”, as rainhas alimentam-se de ovos tróficos (ovos de “alimentação”) que são ricos em proteínas (Hölldobler & Wilson, 1990).

Os ninhos de *Atta* são subterrâneos e caracterizados por apresentarem numerosas câmaras e galerias (Mariconi, 1970). Outra característica destas formigas é que habitam praticamente todos os tipos de ambientes terrestres, principalmente nas regiões tropicais, e possuem importante papel mantendo a estabilidade do ambiente ao reciclar nutrientes, promover aeração das camadas superficiais do solo, polinizar plantas e realizar a dispersão das sementes. Porém, quando o ambiente é alterado, esses insetos podem se tornar pragas incontroláveis e maléficas à agricultura (Hölldobler & Wilson, 1990; Agosti *et al* 2000; Teixeira *et al* 2007).

Na condição de pragas polípagas na agricultura, as formigas da tribo *Attini* utilizam exclusivamente substratos vegetais para o cultivo do fungo simbiote, sendo o do gênero *Leucoagaricus* predominante para os gêneros *Atta* e *acromyrmex* (Silva-Pinhati *et al* 2004). São chamadas de formigas-cortadeiras, pelo hábito de cortar grandes quantidades de vegetais incluindo pastagens, florestas e plantas cultivadas COMO EUCALIPTOCULTURA, causando consideráveis prejuízos econômicos ao afetarem a agricultura e a pecuária em diferentes regiões das Américas. O material vegetal cortado pelas formigas não é usado por elas como fonte direta de alimento e sim empregado no cultivo do fungo simbiote do qual às operárias adultas obtêm parte de suas necessidades alimentares, enquanto as larvas e a rainha a sua totalidade (Mariconi, 1970; Della Lucia *et al* 1993; Vo *et al* 2009).

Tamanha é a dependência das formigas da tribo *Attini* pelo fungo simbiote, que ao deixar o ninho no momento da revoada a fêmea alada leva na cavidade infra-bucal um fragmento (*pellet*) do fungo simbiote. Logo após a escavação, assim que se fecha na câmara, a futura rainha regurgita o fragmento de fungo, o qual será cuidado por ela que lambe e defeca sobre o mesmo para assegurar a assepsia e prover nutrientes para o desenvolvimento do fungo (Mariconi, 1970).

O fragmento de fungo levado pela futura rainha é coletado no seu formigueiro de origem, alguns momentos antes do vôo nupcial. Este vai garantir que a futura rainha e sua prole prossigam com seu ciclo de vida, por possuir potencial para dispersar micélios, que servirá como partida para o cultivo de um jardim na nova colônia que se estabelecerá (Mueller *et al* 2001, Green *et al* 2002).

Apesar da condição de pragas, atribuída às formigas cortadeiras aos agroecossistemas, estes insetos são também muito importantes ecologicamente. Possíveis benefícios podem ser relacionados a essas formigas em determinadas situações ou ambientes. Segundo Moutinho *et al* (1993), a presença de formigas cortadeiras pode trazer impactos positivos sobre a estrutura química e física do solo, que pode ser benéfico à vegetação. O solo de áreas com ninhos torna-se menos resistente permitindo a penetração das raízes que juntamente com a presença de matéria orgânica nas câmaras de lixo dos ninhos, pode estabelecer uma maior variedade de plantas no local, contribuindo, assim, para a manutenção da biodiversidade da região (Moutinho *et al* 1993; Hölldobler & Wilson, 1990; Agosti *et al* 2000).

Atta sexdens rubropilosa, objeto de estudo deste trabalho, é uma espécie de formiga-cortadeira popularmente conhecida, no Brasil, por “saúva-limão” pelo odor característico que exala ao ser esmagada. É encontrada nos estados de Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (Mariconi,1970; Della Lucia *et al* 1993).

1.2- A ESPERMATECA DOS INSETOS

A espermateca é um órgão de origem ectodérmica que compõe o sistema reprodutor feminino dos insetos. Ela é responsável por manter os espermatozóides viáveis durante a vida reprodutiva das fêmeas, fornecendo gametas para a fecundação dos ovócitos. Geralmente, a espermateca consiste em uma bolsa única, entretanto duas estruturas foram observadas em *Blaps* (Coleoptera) e *Phlebotomus* (Diptera), e três ocorrem na maioria das moscas. Em formigas, em geral, apenas uma espermateca foi descrita (Chapman,1998).

O armazenamento de espermatozóides na espermateca após o acasalamento é um fenômeno generalizado em insetos. Esta estocagem do esperma no trato reprodutivo de fêmeas após a cópula garante que os ovos sejam fertilizados sem a presença do macho. O período deste armazenamento de esperma pode variar entre os insetos. Em Hymenoptera sociais com ninhos monogínicos, por exemplo, a rainha pode armazenar espermatozóides por anos em seu trato reprodutivo interno, desde a cópula, que ocorre apenas uma vez no início da vida adulta, até a fertilização dos ovócitos. A rainha de formigas-cortadeiras é um exemplo de inseto

que pode viver por 20 anos em laboratório produzindo milhões de indivíduos, o que indica que podem manter enormes quantidades de espermatozóides viáveis durante toda sua vida (Autuori, 1950; Holldobler & Wilson, 1990; Keller, 1998; Klenk *et al* 2004).

A espermateca em Hymenoptera consiste de um reservatório revestido com epitélio simples, um par de glândulas e um ducto da espermateca (Martins *et al* 2005; Gobin *et al* 2006; Gotoh *et al* 2008).

O epitélio do reservatório espermatecal é simples e geralmente formado por células colunares. Em vespas, o citoplasma dessas células é basicamente preenchido por mitocôndrias (Gotoh *et al* 2008; Martins *et al* 2008). Essa característica subcelular aliada à presença de invaginações na base das células sugere a existência de um mecanismo de transporte da hemolinfa para o lúmen espermatecal. De acordo com esse modelo, as células colunares seriam responsáveis pelo transporte de substâncias, contribuindo para a manutenção da viabilidade dos gametas (Wheeler & Krutzsch, 1994; Gobin *et al* 2006).

O componente glandular da espermateca em formigas é composta por duas unidades (Chapman, 1998). Foi mostrado em *Anthrenomous grandis* (Coleoptera) que as glândulas espermatecais produzem glicoproteínas e mucopolissacarídeos que supostamente auxiliam no transporte e migração dos espermatozóides da vagina para a espermateca. Na presença desses componentes, a motilidade dos espermatozóides aumenta, de forma que, quando as glândulas são removidas, os gametas perdem a motilidade (Villavaso, 1975; Grodner & Steffens 1978). Em abelhas, as secreções das glândulas acessórias consistem basicamente de proteínas, mas podem também incluir açúcares e lipídeos (Baer *et al* 2000; Boomsma *et al* 2005; Collins *et al* 2006). Estas substâncias são adicionadas ao esperma e afetam todas as fases da biologia reprodutiva da fêmea após a cópula, incluindo a proteção, estocagem e ativação do esperma, competição entre espermatozóides e reforço da fecundidade (Baer *et al* 2009a).

Quando os ovócitos estão completamente formados, eles são liberados nos ductos ovarianos e seguem para a vagina. Foi demonstrado que o ducto espermatecal em *Bombus mori* (Hymenoptera) não apenas encaminha os gametas no trajeto vagina-receptáculo e vice-versa, mas também é capaz de fornecer nutrientes para os

espermatozoides. A luz dos dutos é rica em polissacarídeos e acredita-se que tais nutrientes sejam originados das células epiteliais do duto (Schoeters & Billen, 2000). Mais recentemente foi demonstrado que a espermateca, além de produzir nutrientes, também expressa RNAs mensageiros que codificam enzimas responsáveis pela proteção contra radicais livres nas fêmeas de *A. mellifera*. Considerando que espermatozoides retêm as atividades respiratórias dentro da espermateca, sugere-se que a produção dessas enzimas pode reduzir danos causados pela oxi-redução (Collins *et al* 2004).

A estrutura da espermateca em rainhas de formigas mostra duas características notavelmente distintas de outros Hymenoptera. A parede do reservatório de rainhas de formigas é constituída por células epiteliais colunares apenas na região hilar próxima á abertura do duto da espermateca, enquanto que células pavimentosas ocorrem na região distal (Wheeler & Krutzsch, 1994; Gobin *et al* 2006). Entretanto, em fêmeas de outros Hymenoptera sociais incluindo *A. mellifera* e algumas espécies de vespas, a parede do reservatório é composta por epitélio colunar de espessura uniforme (Schoeters & Billen, 2000; Martins & Serrão, 2002; Martins *et al* 2005).

1.3- PROTEOMA

As proteínas são polímeros de aminoácidos que exercem funções importantes nos sistemas biológicos, além de serem responsáveis pelo fenótipo definitivo da célula. Suas atividades específicas, modificações, associações com outras biomoléculas e os seus níveis de expressão são essenciais para a descrição dos sistemas biológicos.

Embora já sejam conhecidas as sequências de bases do genoma de diversos organismos, o conhecimento adquirido com o estudo do proteoma, tem demonstrado que a informação genética sozinha é insuficiente para explicar eventos biológicos e padrões de expressão do RNAm e que nem sempre esta informação se correlaciona com o nível de expressão protéica (Anderson *et al* 1997). Desta forma, o estudo dos produtos gênicos representados pelas proteínas, tornou-se essencial para o completo entendimento e a determinação do padrão de expressão nos tecidos. Surgiu, assim, um novo campo experimental conhecido como análise proteômica. Esta análise consiste na aplicação de um conjunto de métodos visando caracterizar o conjunto de

proteínas expressas por um determinado genoma em uma célula, tecido, ou sistema biológico num determinado momento. Esta nova ferramenta foi chamada de PROTEÔMICA e proposta pela primeira vez por Wilkins e Willians em 1995 (Wilkins *et al* 1996).

Em condições fisiológicas específicas, o proteoma reflete o estado atual de funcionamento do sistema, ou seja, a expressão funcional do genoma. Portanto, o proteoma nada mais é que um complemento protéico do genoma que pode esclarecer melhor os mecanismos bioquímicos e fisiológicos a nível molecular (Wasinger *et al* 1995; Dutt & Lee, 2000). Embora o estudo do proteoma seja considerado um desafio, pois a expressão gênica de uma célula é bastante dinâmica, a proteômica é a ferramenta mais usada para entender o funcionamento dos genes por analisar o produto final dos mesmos (Pandey & Mann, 2000).

Em geral, a proteômica possui diversas aplicações que permitem identificar e quantificar proteínas (avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas do sistema biológico em estudo), avaliar as modificações pós-traducionais, a expressão diferencial dos genes e interação proteína-proteína (Chen & Harmon; 2006Dias *et al* 2007). A identificação de cada proteína é feita pela análise de sequências parciais com o auxílio de ferramentas de bioinformática.

1.4 – METODOLOGIAS APLICADAS EM ANÁLISE PROTEÔMICA

Embora algumas técnicas utilizadas no estudo do proteoma tenham sido iniciadas há alguns anos atrás com um protocolo básico de eletroforese bidimensional (2-DE), descrito por dois pesquisadores, O'Farrell (1975) e Klose (1975), os estudos proteômicos são relativamente recentes. Os primeiros artigos científicos que relatam este tipo de estudo datam de 1995 (Wasinger *et al* 1995).

O estudo estrutural e funcional simultâneo de um grande número de proteínas requer o uso de diferentes técnicas associadas. Atualmente, a eletroforese bidimensional (2-DE) juntamente com a espectrometria de massas (MS) são as principais técnicas utilizadas na proteômica (Gorg *et al* 2004).

1.4.1- ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)

A 2DE baseia na migração das moléculas carregadas, numa solução, em

função da aplicação de um campo elétrico. A 2DE separa as proteínas de acordo com dois parâmetros independentes, o ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão pela focalização isoelétrica (IEF) e a massa molecular (MM) da proteína na segunda dimensão, por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas separadas por 2DE podem ser visualizadas pela coloração com Coomassie blue, coloração por prata, corantes fluorescentes, detecção imunológica ou por radio marcação (Westermeier & Naven, 2002; López, 2007).

Contudo, mesmo sendo uma técnica eficaz, a 2DE não representa a totalidade do proteoma analisado, pois existem ainda algumas limitações como reprodutibilidade e boa resolução de proteínas pouco abundantes como as proteínas hidrofóbicas e as de alta massa molecular. O processo de solubilização de proteínas é um passo muito importante em estudos proteômicos, representando um desafio aos pesquisadores. Devido à sua alta hidrofobicidade, as proteínas de membrana, por exemplo, podem apresentar baixa solubilidade e demonstrar uma tendência para agregação (Braun *et al* 2007).

1.4.1.1 – PRIMEIRA DIMENSÃO – Focalização isoelétrica (IEF)

A focalização isoelétrica (IEF) envolve a separação de moléculas anfóteras sob um gradiente de pH. Moléculas anfóteras são aquelas que podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, dependendo da sua estrutura e do pH do meio. A IEF é um método eletroforético que separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). A carga líquida ou carga total de uma proteína é a soma de todas as cargas (positivas e negativas) das cadeias laterais de seus aminoácidos e grupamentos amino e carboxi-terminal. Desta forma, em um gradiente de pH e submetida a um campo elétrico, as proteínas irão migrar para a posição do gradiente onde sua carga líquida é igual a zero, focalizando-se nessa posição, caracterizando, assim, seu ponto isoelétrico (Nelson & Cox 2002).

1.4.1.2 – SEGUNDA DIMENSÃO - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Uma vez separadas por seus pontos isoelétricos (pI) durante a IEF, as proteínas são submetidas à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), onde serão separadas em função

da massa molecular (MM) (Figura 1). A eletroforese bidimensional é um método muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas. O gel é formado por uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N,N – metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida dependendo da faixa de massa protéica que se deseja abranger, lembrando que quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros da malha formada (Di Ciero & Bellato; 2003 Rocha *et al* 2005).

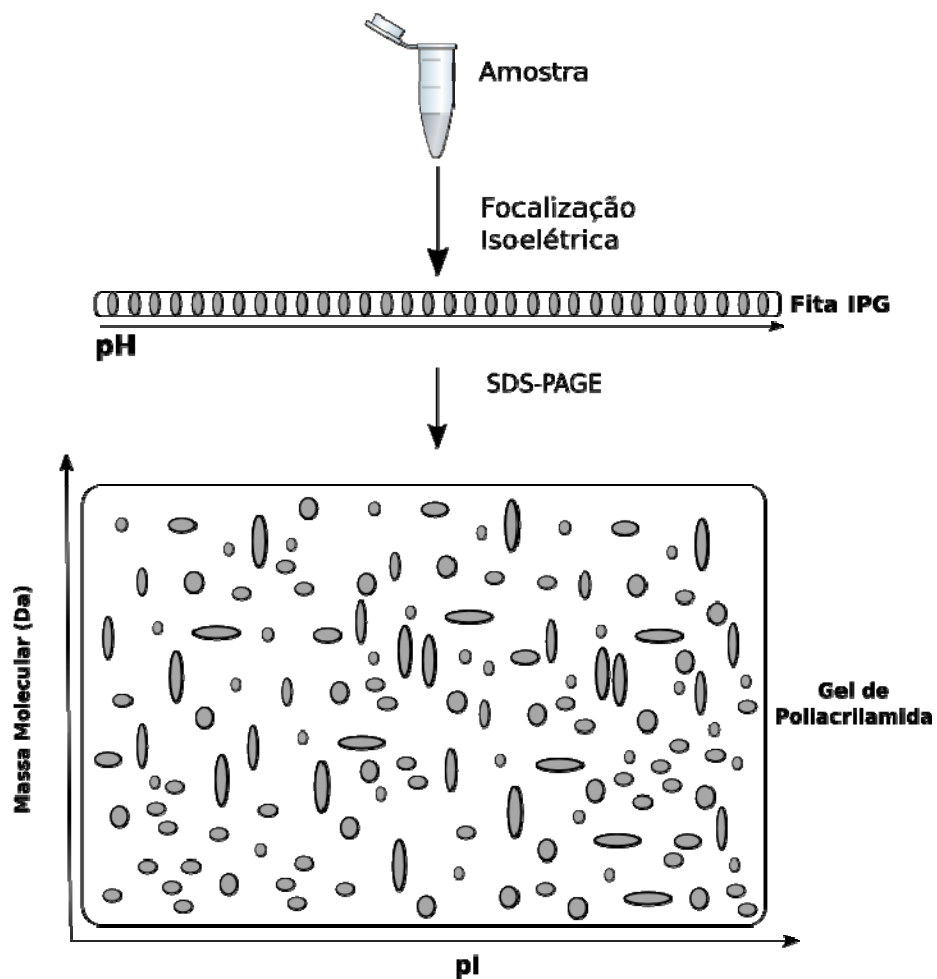


Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando as etapas da eletroforese bidimensional (2DE). Inicialmente as proteínas da amostra são submetidas à focalização isoelétrica e separadas de acordo com seu pI (1ª dimensão), após a focalização as proteínas são transferidas para um gel de poliacrilamida onde são separadas pelas massas moleculares (2ª dimensão).

A presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) no preparo das amostras para 2DE é essencial para que algumas variáveis como a forma e a carga nativa das proteínas sejam eliminadas e a separação dependa apenas da massa molecular da

proteína. Dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente anfipático cuja função é desnaturação. Quando o SDS não está presente, as proteínas que possuem massas iguais podem migrar de maneira diferente na malha do gel devido ao diferencial de cargas de suas estruturas tridimensionais. Além da adição do SDS, as proteínas podem ser também fervidas na presença de um agente redutor, como por exemplo, o ditioneitol (DTT) ou β -mercaptoetanol. Tais agentes são capazes de desfazer as pontes de dissulfetos, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos (Rocha *et al* 2005).

1.4.2 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Nos últimos anos a espectrometria de massas (MS) tem sido uma das técnicas mais utilizadas na análise de biomoléculas, tornando-se a principal ferramenta da proteômica. Técnicas de ionização mais brandas conhecidas como “soft”, que incluem MALDI (“Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization”) ou a “nano-electrospray/ionization” (ESI), permitem analisar peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, os avanços recentes na bioinformática têm permitido o acesso e a manipulação de enormes quantidades de dados provenientes de bancos de dados contendo sequências gênicas e protéicas (Godovac-Zimmermann & Brown 2001; Rocha *et al* 2005).

A MS mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa. De uma maneira geral, um espectrômetro de massa é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização, moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa, e no analisador de massas, os íons formados são separados de acordo com suas relações m/z e posteriormente detectados (Gross, 2004; Dass 2007) (Figura 2).

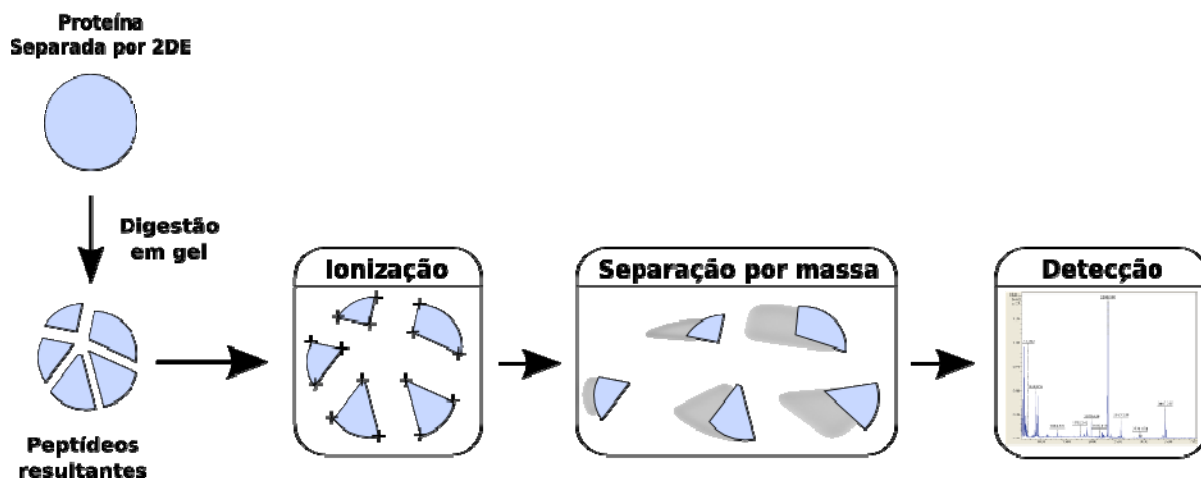


Figura 2 – Desenho esquemático simplificado ilustrando algumas etapas envolvidas na análise por espectrometria de massas dos peptídeos provenientes da digestão enzimática de uma proteína (*spot*) (Adaptado de Dass, 2007).

As principais análises utilizadas em espectrometria de massas para o estudo de biomoléculas são a espectrometria de massas com base na dessorção e ionização das proteínas a laser, auxiliado pela matriz que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (ToF – “Time of Flying”) e a espectrometria de massas com base na ionização por pulsos elétricos em médio líquido (ESI – “ElectroSpray Ionization”) (Rocha *et al* 2005; Dass, 2007). De acordo com Mann *et al* (2001), o MALDI é uma técnica de ionização branda que se baseia na utilização de matrizes orgânicas sólidas que absorvem o laser, permitindo a vaporização de moléculas biológicas não voláteis. As matrizes empregadas são, na sua maioria, ácidos orgânicos sólidos, cujo comprimento de absorção de onda é próximo ao do laser utilizado.

A funcionalidade da matriz é muito importante, pois impede que a amostra a ser analisada seja degradada pela força do laser incidido, sendo esta prevenção possível devido ao fato da matriz ser cristalizada junto com a macromolécula a ser analisada. A matriz absorve a energia do laser, vaporizando a amostra, minimizando o dano e contribuindo, assim, para o processo de ionização (Mann *et al* 2001).

O analisador de massas tipo MALDI-TOF analisa a massa de peptídeos obtidos por digestão com enzima proteolítica, geralmente, a tripsina. O padrão de massas adquirido através desta análise é caracterizado como mapa de massas de peptídeos (“Peptide Mass Fingerprinting” – PMF). Softwares apropriados permitem comparar o resultado do PMF da proteína que se quer identificar com os dados presentes nas sequências de proteínas disponíveis nos bancos de dados. Assim, se a

sequência da proteína em questão estiver no banco de dados, ela será imediatamente identificada (De Sousa *et al* 2004).

1.5 – ESTUDOS PROTEÔMICOS EM INSETOS

A abelha *A. mellifera* é um dos exemplos de insetos que têm sido alvo de estudos com abordagem proteômica.

Klenk *et al* (2004) analisaram proteínas na secreção das glândulas e fluido da espermateca em rainhas de *A. mellifera*, por SDS-PAGE. Foi identificada no fluido espermatecal uma proteína de 29 kDa homóloga à enzima glicolítica triosefosfato isomerase (TPI). Embora essa proteína tenha apresentado baixa atividade enzimática, os autores sugeriram que a mesma, assim como as secreções produzidas pelas glândulas espermatecais, estariam exercendo um papel importante no armazenamento de espermatozóides pela espermateca. Ainda ressaltando a importância das secreções glandulares no armazenamento de espermatozóide em *A. mellifera*, Boer *et al* (2009) sugeriram que os machos e as fêmeas usam diferentes proteínas para aumentar a viabilidade espermática antes da ejaculação e no armazenamento final de espermatozóides.

Collins *et al* (2006), utilizando eletroforese bidimensional e análises por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), com proteínas provenientes da vesícula seminal e sêmen de zangões adultos de *A. mellifera*, identificaram 18 proteínas no extrato obtido da vesícula seminal e do sêmen juntos. Ao analisarem o extrato da vesícula e do sêmen separadamente foram identificadas um total de 36 e 15 proteínas, respectivamente. As proteínas identificadas foram associadas a diversas funções celulares, sendo que, proteínas relacionadas ao metabolismo foram encontradas principalmente na vesícula seminal. Dentre as 69 proteínas, 66 apresentaram homologia com proteínas de *Drosophila melanogaster*, indicando que essas proteínas são conservadas entre esses insetos.

Em um estudo onde aplicaram proteômica quantitativa e qualitativa para analisar amostras de hemolinfa de abelhas *A. mellifera*, durante o desenvolvimento e em diferentes castas dessa espécie, Chan *et al* (2006) encontraram grandes diferenças na composição de proteínas da hemolinfa especialmente entre larva e adulto. O resultado deste estudo, segundo os autores, inclui dados importantes que poderão servir de base para futuros estudos bioquímicos relacionados à imunidade

inata em insetos.

Peiren *et al* (2008), analisaram a glândula de veneno de operárias de *A. mellifera* buscando a identificação de proteínas responsáveis pela proteção das células secretoras contra as toxinas do veneno. Para isso, as proteínas das glândulas de veneno foram extraídas e separadas por eletroforese bidimensional, o que resultou em cerca de 350 *spots*, sendo que apenas 62 deles foram submetidos à identificação por espectrometria de massas utilizando MALDI TOF/TOF-MS e LC-MS/MS. Como resultado desse estudo, foram identificadas 4 enzimas com atividade antioxidante e de resposta ao estresse oxidativo, sendo elas a superóxido dismutase (SOD1), glutathione-S-transferase sigma 1 isoforma A (GSTS1), peroxirredoxina 2540 (PXR2540) e tioredoxina peroxidase 1 isoforma A (TPX1).

Baer *et al* (2009a) avaliaram os perfis protéicos da glândula da espermateca e fluido espermatecal de fêmeas virgens e rainhas fecundadas de *A. mellifera*, e encontraram uma grande sobreposição nos perfis de bandas protéicas do fluido da espermateca em virgens e fecundadas. Além disso, o perfil protéico das secreções das glândulas da espermateca mostrou-se muito semelhante ao fluido da espermateca, tanto para fecundadas como para as virgens. Baer *et al* (2009a), ao comparar seus resultados com o perfil protéico do fluido seminal e espermatozoides isolados de ejaculados de machos de *A. mellifera* obtido por Baer *et al* (2009b), observaram grande diferença entre os perfis protéicos. Com isso, Baer *et al* (2009a) sugerem que o trato reprodutivo das fêmeas fornece ao esperma armazenado uma mistura complexa de proteínas, sendo algumas diferentes daquelas fornecidas pelo macho, e que o trato reprodutivo feminino oferece mecanismos fisiológicos essenciais ao armazenamento de esperma após a cópula.

Outros insetos-alvo de estudos proteômicos são o vetor da malária *Anopheles gambiae*, o *Triatoma infestans*, vetor da doença de chagas, e o *Aedes aegypti*, vetor da dengue.

Kalume *et al* (2005) realizaram análise proteômica das glândulas salivares de fêmeas de *Anopheles gambiae* por LC-MS/MS, o que permitiu identificar 69 proteínas, um pouco menos que o esperado segundo os autores. Uma grande proporção das proteínas identificadas estão envolvidas no metabolismo de carboidratos e ácidos nucléicos, vias de transporte ou energia, entretanto nenhuma

função biológica foi atribuída a cerca de 25% das mesmas. Segundo os autores, a caracterização do proteoma das glândulas salivares desse inseto permite uma melhor compreensão do desenvolvimento do parasita a nível molecular, e pode fornecer novos alvos para a interrupção do ciclo de vida parasitária e sua subsequente transmissão.

Charneau *et al* (2007) utilizando eletroforese bidimensional (2-DE) e nanoLC-MS/MS, avaliaram proteínas da saliva de *Triatoma infestans*. Mais de 200 proteínas foram identificadas, sendo a maioria com funções relacionadas à hematofagia, o que é típico desse inseto. Essas proteínas são particularmente inibidoras de agregação plaquetária pertencentes às famílias das lipocalinas e apirases. Segundo os autores, a análise da composição protéica da saliva desse inseto indica um mecanismo molecular altamente específico de resposta à agregação de plaquetas, provendo uma base para melhor entendimento do mecanismo de transmissão dessa doença.

Sirot *et al* (2007) estudaram proteínas produzidas nas glândulas acessórias e ducto ejaculatório do trato reprodutivo masculino de *Aedes aegypti*, e compararam os resultados obtidos com proteínas do trato reprodutivo de fêmeas para verificar qual o impacto destas no comportamento de fêmeas. Foram identificadas 63 proteínas nas glândulas do trato reprodutivo de machos. Dessas 63 proteínas, 21 foram encontradas no trato reprodutivo de fêmeas fecundadas, mas não no de fêmeas virgens. Com isso os autores sugeriram que essas proteínas são transferidas de machos para fêmeas durante a cópula e, portanto podem exercer influência sobre o comportamento feminino, fisiologia, sobrevivência e reprodução desses vetores.

Recentemente, Sirot *et al* (2011), usando um método de isótopo-estável e análise proteômica, avaliaram o conjunto de proteínas do fluido seminal (SFPs) produzidas em glândulas do trato reprodutivo de *A. aegypti*, para identificar quais proteínas são transferidas para as fêmeas durante o acasalamento. Os autores identificaram que 145 proteínas do fluido seminal e esperma foram transferidas de machos para fêmeas durante a cópula. As proteínas identificadas nesse estudo foram relacionadas com a fertilidade e atividade hormonal. Segundo os autores, os resultados obtidos estabeleceram bases importantes para novas estratégias de controle pela identificação de proteínas que podem influenciar na biologia reprodutiva e na hematofagia exercida pelas fêmeas deste inseto vetor.

Considerando a importância econômica e ecológica das formigas-cortadeiras, aliada ao fato de não terem sido encontrados na literatura disponível relatos de estudos proteômicos com formigas, o estudo proposto nesse trabalho certamente contribuirá com dados que permitirão ampliar os conhecimentos relativos à biologia de formigas.

Desta forma, o presente estudo tem como proposta avaliar proteínas diferencialmente expressas na espermateca de fêmeas virgens e rainhas fecundadas de *Atta sexdens rubropilosa*, visando obter dados que poderão contribuir para o entendimento da biologia reprodutiva dessa espécie. Os resultados obtidos poderão também ser úteis em estudos futuros objetivando a compreensão de estratégias utilizadas pelas fêmeas no armazenamento, por meses ou anos, de grandes quantidades de gametas masculinos viáveis.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Identificar proteínas diferencialmente expressas na espermateca de fêmeas virgens e de rainhas fecundadas de formigas-cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. METODOLOGIA

As etapas iniciais deste trabalho (extração de proteínas, determinação da concentração protéica e eletroforese bidimensional) foram realizadas no laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP) do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, e os procedimentos posteriores a estas etapas citadas foram realizados no Núcleo de Análises de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa, NUBIOMOL – UFV.

3.1- AMOSTRAS

Rainhas virgens e fertilizadas de saúva-limão (*Atta sexdens rubropilosa*) foram coletadas no campo (região de Viçosa-MG) em dia do vôo nupcial. As rainhas foram transferidas para o Insetário Central da UFV onde foram mantidas em uma sala climatizada com foto período, umidade e temperatura controlados até o momento da dissecação. As espermatecas das fêmeas virgens foram dissecadas no dia seguinte da coleta, enquanto que as rainhas fertilizadas foram mantidas no insetário e dissecadas depois da primeira postura, aproximadamente 15 dias após a coleta no campo. As espermatecas foram dissecadas e preservadas em tubos tipo eppendorfs de 1,5 mL contendo inibidor de protease 1X (PMSF, Benzamidina). As amostras foram mantidas em freezer -20 °C para posterior extração de proteínas.

3.2 – EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A extração de proteínas foi realizada de acordo com o protocolo de Shen (2002) com algumas modificações. Às amostras armazenadas foi acrescentado 1mL de Tampão Tris-HCl 40mM pH 7,5, com adição de inibidor de protease PMFS (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*). Em seguida, o material foi lisado por sonicação utilizando 3 ciclos de 10 segundos, intercalando a sonicação com banhos de 2 minutos no gelo. Posteriormente o material foi centrifugado por 15 minutos a 20.000 g a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo o sobrenadante reservado para posterior utilização. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 40 mM pH 7,5, e em seguida o material foi novamente centrifugado a 20.000 g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante dessa etapa foi misturado ao sobrenadante previamente reservado e a mistura foi utilizada para precipitação de proteínas.

As proteínas foram precipitadas a -20°C *overnight*, adicionando-se às amostras ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona absoluta gelada, na proporção de 1:6. (1 mL do extrato/ 6 mL da solução TCA 10% - acetona). As amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 30 minutos a 4°C , para obtenção do *pellet* de proteínas. O precipitado foi lavado com acetona gelada por quatro vezes e seco à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. O pó protéico resultante foi ressuscitado em 100 μL de tampão de solubilização (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2 %, DTT 0,3 %). A mistura contendo o extrato protéico foi armazenada em ultra-freezer a -80°C para posterior utilização.

3.3-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A concentração de proteínas dos extratos das espermatecas foi determinada de acordo com o método desenvolvido por Bradford (1976) utilizando BSA como padrão. A quantificação foi realizada em triplicata utilizando microplacas de 96 poços. Para a quantificação, 1 μL de amostra diluída (extrato protéico) em 39 μL de água purificada por osmose reversa foi adicionado a 160 μL do reagente de Bradford concentrado 1,25 vezes. Após 10 min em repouso, em temperatura ambiente, fez-se a leitura da absorvância a 595 nm utilizando um leitor de microplacas. A absorvância da placa vazia foi subtraída do valor obtido da absorvância de cada amostra. A comparação dos resultados da absorvância determinada com a curva padrão permite a determinação da concentração de proteínas.

3.4.- ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

3.4.1- PRIMEIRA DIMENSÃO - FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF)

A IEF foi realizada em tiras de 7 cm com gradiente linear de pH imobilizado (*Immobilized pH gradient* – IPG - ImmobilineTM DryStrip, *GE Healthcare*) em gel de poliacrilamida. As faixas de pH utilizadas foram pH 3-10. As análises foram realizadas em triplicata.

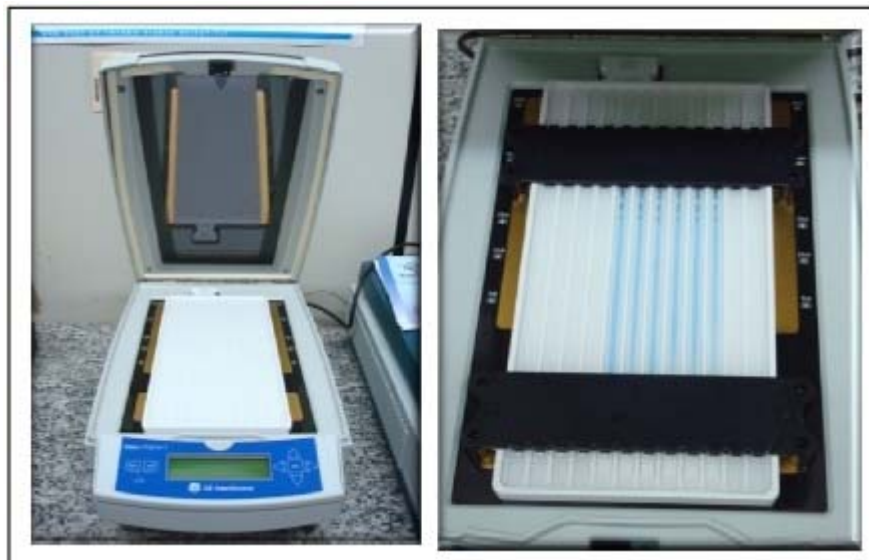


Figura 3 - Sistema de Focalização Isoeletrica Ettan IPGphor 3, modelo *Ettan IPGphor cup loading manifold* (GE Healthcare).

Volumes correspondentes a 150 μg do extrato protéico foram misturados com DTT 40 mM e 2% de anfólito *IPG Buffer pH-3-10*, e completados para um volume final de 137,5 μl de tampão de reidratação (*DeStreak Rehydration Solution*). Antes da adição do tampão o mesmo permaneceu alguns minutos a temperatura ambiente para total descongelamento e solubilização da Uréia. A mistura obtida foi aplicada nas canaletas da bandeja de reidratação e, posteriormente, as fitas, após cuidadosa remoção do plástico protetor, foram posicionadas nas canaletas com o lado contendo gel voltado para baixo, evitando a formação de bolhas entre a fita e a solução na canaleta. A reidratação das fitas seguiu-se a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas.

Após a reidratação, as fitas foram transferidas da bandeja para um suporte de cerâmica (*Manifold*), devidamente posicionado no equipamento *Ettan IPGphor 3*, marca *GE Healthcare* (Figura 3), seguindo-se a eletrofocalização conforme recomendações do fabricante. Cada fita foi posicionada na canaleta do *Manifold* com o gel voltado para cima de modo a fazer contato com os eletrodos que foram encaixados nas extremidades positiva e negativa das fitas e um pedaço de papel filtro foi colocado em cada extremidade das fitas permitindo perfeito contato do eletrodo e, assim, a passagem de corrente elétrica. As canaletas foram cobertas com óleo mineral *dry strip Cover Fluid* para evitar superaquecimento da eletrofocalização. As condições de temperatura e amperagem foram de 20°C e 50 μA respectivamente. A Figura 4 ilustra o procedimento descrito. Os passos

utilizados durante a IEF e seus respectivos parâmetros encontram-se na Tabela 1.

Concluída a IEF, as tiras foram colocadas separadamente em tubos tipo Falcon com capacidade para 10 mL e armazenadas em ultra-freezer -80°C para posterior análise por SDS-PAGE.

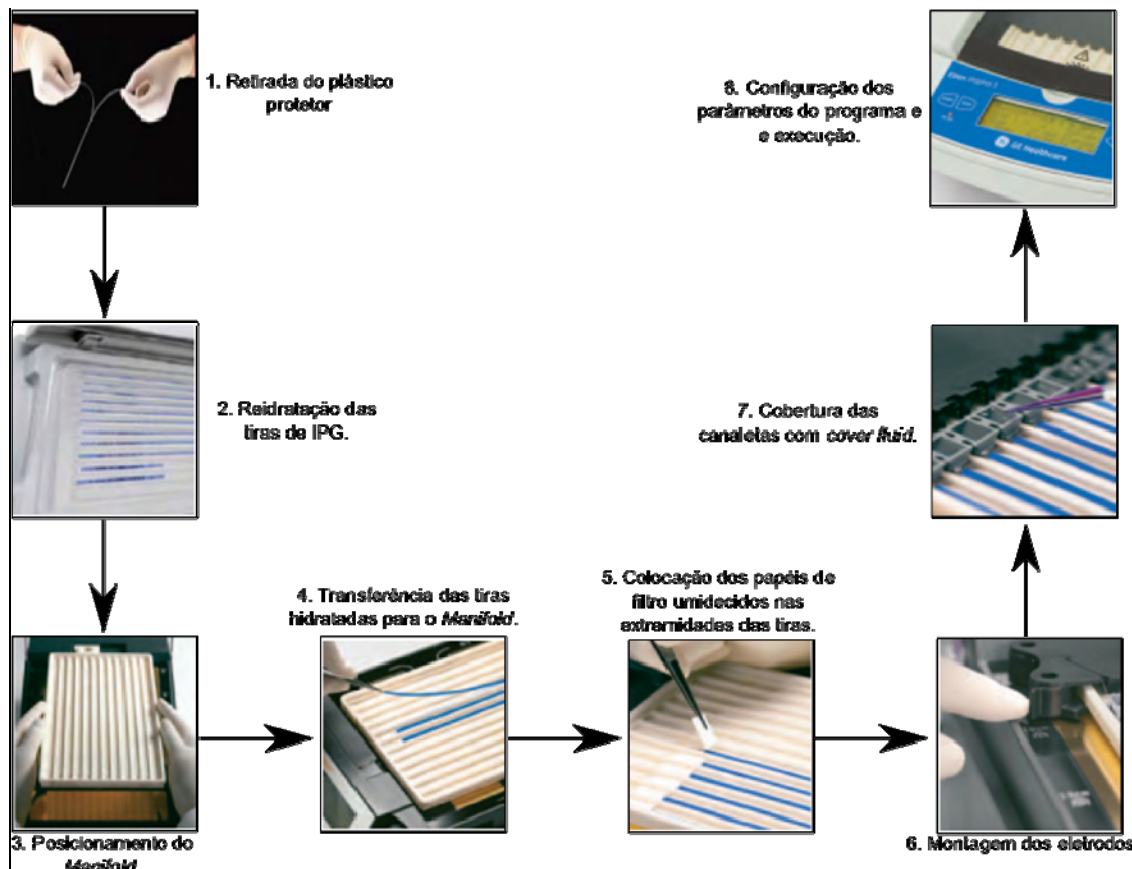


Figura 4 - Ilustração dos procedimentos utilizados durante a Focalização Isoelétrica (Fonte: Manual 2-D *Electrophoresis Principles and Methods* 2004/modificado).

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para focalização isoelétrica.

Passos	Tipo de Voltagem	Voltagem (V)	Tempo (h) ou Vh
1	<i>Step</i>	200 V	12 h
2	Gradiente	1000 V	300 Vh
3	Gradiente	2000 V	1 h
4	<i>Step</i>	2000 V	2000 Vh
5	Gradiente	3000 V	1:30 hr
6	<i>Step</i>	3000 V	3000 Vh
7	Gradiente	5000 V	1:30 hr
8	<i>Step</i>	5000 V	3000 Vh
9	<i>Step</i>	200 V	1 h

3.4.2- SEGUNDA DIMENSÃO (SDS-PAGE)

As tiras de IPG (gradiente de pH imobilizado) submetidas à focalização isoeétrica foram reduzidas por adição de 5 ml de Tampão SDS de equilíbrio contendo DTT (Tris-HCl 75mM pH 8,8, Uréia 6M, Glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% e DTT 1%). Após 15 minutos sob leve agitação foram adicionado 5 ml de Tampão SDS de equilíbrio contendo iodoacetamida (Tris-HCl 75mM pH 8,8, Uréia 6M, Glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% e iodoacetamida 2,5%), seguindo-se 15 minutos sob leve agitação para alquilação das proteínas.

Em seguida, as tiras de IPG foram lavadas em tampão Tris-Glicina (250 mmol/L de Tris base, 1,90 mol/L de Glicina, 10 mmol/L de EDTA e 35,0 mmol/L de SDS) e imediatamente seguiu-se o procedimento para SDS-PAGE 10% adicionado de SDS utilizando cuba *Mini Protean 3 Gel Electrophoresis System Bio Rad*. Inicialmente, as extremidades das tiras (parte que não continha gel) foram cortadas para facilitar a acomodação das mesmas na parte superior do gel. Em seguida, foram posicionadas horizontalmente no topo dos géis, fazendo contato com os mesmos sendo a parte das tiras que continham as proteínas separadas por seus pontos isoeétricos, voltada para frente do aparato. Uma tira de papel de filtro de aproximadamente 5 mm de largura embebido de uma solução contendo o marcador *Broad Range BioRad* (6.500 – 200.000 kDa) foi colocada na extremidade esquerda superior do gel, evitándose o contato do papel de filtro com as tiras de IPG.

Para garantir a perfeita acomodação e o contato preciso das tiras com o gel de poliacrilamida, foi aplicado em cima de cada gel com as tiras já devidamente posicionadas 1 mL de uma solução de agarose - *Agarose Sealing Solution* (agarose 0,5 %, SDS 1 % e azul de bromofenol 0,002 %). A corrida do gel foi a 90 V, 30 mA, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos.

3.4.3 - COLORAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS PELA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Os géis foram corados utilizando o método de coloração por *Coomassie Brilliant Blue colloidal* modificado de Neuhoff *et al* (1983). Inicialmente, foram adicionados aos géis aproximadamente 100 mL de solução fixadora (ácido acético 10%, methanol 40%), por 1 hora, para prevenir a mobilidade das proteínas. Em

seguida, os géis foram lavados em água destilada e corados em solução de coloração contendo 20% de metanol, 8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico e 0,08% de *Coomassie brilliant blue* G-250. Os géis foram mantidos nessa solução de coloração por 72 horas, sob leve agitação. Ao final deste período, os géis foram retirados desta solução e lavados com água destilada para remoção do corante residual e posteriormente, estocados em uma solução de ácido acético 7% e glicerol 5% até a excisão dos *spots*.

3.4.4 - CAPTURA DAS IMAGENS E ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS.

Os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando *scanner ImageScan III (GE Healthcare)* com auxílio do programa *LabScan 6.0 (GE Healthcare)*. As imagens foram geradas em formato *.mel* e analisadas utilizando o programa *ImageMaster™ III 2D platinum* da mesma empresa. As massas moleculares foram determinadas com base em padrões de massa molecular (*Broad Range –Molecular Weight Marker*) e os pontos isoelétricos foram estimados. A detecção dos *spots* e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático pelo programa utilizado e, em seguida, foram feitas correções manuais adotando os seguintes parâmetros, *smooth* = 2, área mínima= 30 e *saliência* = 30. Dentro de cada grupo analisado, o gel com maior número de *spots* foi escolhido como gel de referência representativo para comparação dos *spots* entre as réplicas pela sobreposição das imagens. Foram consideradas proteínas diferencialmente expressas àquelas que apresentaram porcentagem de volume igual ou maior que 1,2 vezes (média de 3 géis). Os *spots* que indicavam presença de proteína com expressão diferencial significava segundo a análise estatística (ANOVA, $p \leq 0,05$) foram selecionados para a excisão.

3.4.5 - EXCISÃO DOS SPOTS E DIGESTÃO TRIPTICA DAS PROTEÍNAS

Utilizando iluminação adequada, os géis de cada grupo foram posicionados em placas de vidro e com o auxílio de ponteiras (capacidade para 200 mL) estéreis e com a ponta cortada, os *spots* selecionados foram excisados manualmente. Os *spots* excisados foram preparados para espectrometria de massas de acordo com o protocolo de Shevchenko (2006) com algumas modificações. Inicialmente, para a

remoção do excesso de corante e SDS, os fragmentos de gel excisados foram transferidos para tubos de 0,6 mL e lavados 2 vezes com solução composta de 200 μ L de Acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,8, e agitação em vórtex. Após a segunda lavagem, as amostras foram novamente submetidas à agitação em vórtex e mantidas *overnight* a temperatura ambiente. Após esse período, mais uma lavagem com a mesma solução foi realizada. As amostras foram, então, submetidas ao procedimento de desidratação, por 2 vezes, na presença de 200 μ L de Acetonitrila 100% durante 5 minutos e secos em centrifuga a vácuo (*speedvac*) por 15 minutos.

Após a secagem, as amostras foram reduzidas em 100 μ L de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, por 30 minutos a 56 °C, e posteriormente alquiladas com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, com agitação em vórtex por 10 minutos. A solução de lavagem foi removida e as amostras foram desidratadas com 200 μ L de acetonitrila 100%, por 5 minutos sob agitação em vórtex. A solução de acetonitrila foi removida, e as amostras reidratadas com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0. Após a desidratação com 200 μ L de acetonitrila 100% por 5 min sob agitação em vortex, a solução de acetonitrila foi removida e as amostras foram secas em centrifuga à vácuo durante 15 minutos ou até apresentarem aparência opaca e esbranquiçada.

Para a digestão triptica das proteínas foram adicionadas às amostras secas, 20 μ L de solução de tripsina diluída - *Tripsin Gold, Mass Spectrometry Grade*, PROMEGA – em banho-de-gelo por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de uma de solução contendo bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e acetonitrila 10%, de forma a cobrir as amostras. Após *overnight* a 37°C, as amostras foram sonicadas (Lavadora ultrassônica modelo USC-1850A, marca UNIQUE) por 10 minutos, agitadas em vórtex por 20 segundos e a solução com tripsina foi removida e transferida para um tubo Eppendorf limpo. Ao restante foram adicionados 30 μ L de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%, e as amostras agitadas em vórtex por 20 segundos. Após 15 minutos em repouso, a temperatura ambiente, as amostras foram sonicadas por 2 minutos e novamente agitadas em vórtex por 20 segundos. A solução foi removida e adicionada àquela removida anteriormente. As amostras contendo peptídeos foram concentradas em sistema de centrifugação a vácuo até

atingirem um volume de cerca de 10 μ L.

As amostras concentradas foram dessalinizadas utilizando ponteiras C18 Zip-Tip[®] (Millipore), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Primeiramente as micro-colunas das ponteiras foram lavadas 10 vezes com 10 μ L de solução de acetonitrila 100% dispensando a solução a cada lavagem. Em seguida, as micro-colunas foram equilibradas com solução de TFA (ácido trifluoroacético) 0,1% repetindo o procedimento três vezes e dispensando a solução a cada lavagem. As micro-colunas foram carregadas aspirando e dispensando, por 20 vezes, a amostra de peptídeos concentrada. As micro-colunas foram então lavadas com TFA 0,1 % (três vezes) a solução dispensada e os peptídeos eluídos em 10 μ L de uma solução de Acetonitrila 80% com TFA 0,1% aspirando e dispensando o volume por cerca de 20 vezes.

3.4.6 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras dessalinizadas foram submetidas à espectrometria de massas utilizando equipamento do tipo MALDI TOF/TOF, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, modelo *Ultraflex III*, marca BRUKER (*Bruker Daltonics*[®]). Este procedimento foi realizado no Núcleo de Análises de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa, NUBIOMOL – UFV.

As amostras foram aplicadas nos poços da placa de aço do espectrômetro de massa, MTP 600/384 TF (*Bruker Daltonics*[®]), na proporção 1:3 de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (1 μ L de amostra e 3 μ L de matriz). O programa utilizado para a obtenção dos espectros foi o *Flex Control 2.0* (*Bruker Daltonics*[®]). Espectros adquiridos com tiros a laser de nitrogênio foram somados para gerar o perfil de massas dos peptídeos. Os perfis obtidos foram analisados e editados manualmente utilizando o software *Flex Analysis 3.0*.

Conforme a Figura 5, a identificação dos peptídeos foi conduzida utilizando análises de PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) do algoritmo MASCOT4 (<http://www.matrixscience.com>). As buscas foram conduzidas nos bancos de dados NCBI e *Swiss-Prot*. Como grupo taxonômico de busca foi utilizado *Drosophila melanogaster* (fruit flies). Os parâmetros utilizados para a busca foram: “todas as massas moleculares”; como modificação fixa foi assinalada “carbamido-metilação da cisteína” e como modificações variáveis, “oxidação da metionina”. Foi aceito no

máximo uma clivagem tríptica perdida, e considerada uma variação de massa dos peptídeos de 0,5 e 0,1 Da. Durante a identificação, outros parâmetros como massa molecular e pI, cobertura da sequência (%) e número de match foram também considerados.

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: Juliana Mata Email: jumalta@gmail.com

Search title: _____

Database(s): SwissProt, NCBIInr, contaminants, cRAP, MSDB Enzyme: Trypsin

Allow up to: 1 missed cleavages

Taxonomy: Drosophila (fruit flies)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) > < mTRAQ:13C(3)15N(1) (Y), mTRAQ:13C(6)15N(2) (K), mTRAQ:13C(6)15N(2) (N-term), mTRAQ:13C(6)15N(2) (Y), NIPCAM (C), Oxidation (HW), Phospho (ST), Phospho (Y), Propionamide (C), Pyridylethyl (C), Pyro-carbamidomethyl (N-term C)

Display all modifications

Variable modifications: Oxidation (M) > <

Protein mass: _____ kDa Peptide tol. ±: 0.1 Da

Mass values: MH⁺ M_r M-H⁻ Monoisotopic charge

Data file: Escolher arquivo amostra 1.xml

0.5
0.1
0.7

Figura 5: Seleção dos parâmetros de busca no *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) do algoritmo MASCOT4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – RESULTADOS

4.1 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

De maneira geral, o método de extração de proteínas empregado neste estudo permitiu a obtenção de resultados satisfatórios com perfis protéicos reproduzíveis e de boa qualidade. Um grande número de proteínas ácidas, básicas e de pesos moleculares variados foi detectado. A precipitação de proteínas com TCA/acetona, conforme o método utilizado, foi eficiente, podendo ser utilizada, também, na extração de proteínas da espermoteca de outros insetos. Vale ressaltar que a boa reprodutibilidade dos géis, ou seja, semelhança do perfil protéico entre as réplicas de cada grupo estudado é um fator de grande importância em análises comparativas.

Duas concentrações de acrilamida (10% e 16,5%) em géis monodimensionais foram testadas visando identificar aquela que permitiria um melhor padrão de separação das proteínas (Figura 6). Inicialmente, foi testada, com extratos protéicos das espermotecas de rainhas fecundadas, a concentração de acrilamida a 16,5% em gel para SDS-TRICINA-PAGE. Esta concentração evidenciou a predominância de proteínas de massas moleculares superiores a 30 kDa. Posteriormente, foi testada a concentração de acrilamida a 10% em SDS-PAGE, o que permitiu observar a presença de proteínas maiores. Desta forma, foi selecionada, para as análises posteriores, a concentração de 10% de acrilamida nos géis bi-dimensionais utilizados para a separação de proteínas do extrato protéico de espermotecas de fêmeas virgens e de rainhas fecundadas (Figuras 8 e 9). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

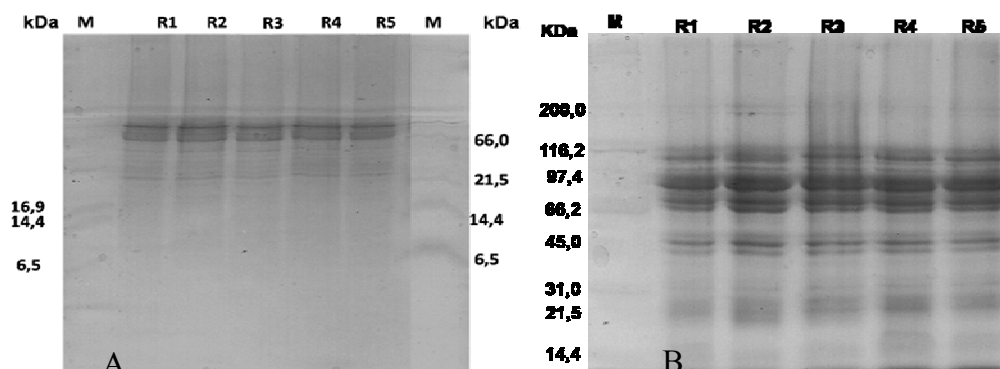


Figura 6 – Perfil eletroforético de proteínas da espermoteca de rainhas fertilizadas. A: SDS-TRICINA-PAGE 16,5%. B: SDS-PAGE 10%. Os géis foram revelados pelo método de coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250. R1 a R5 em A e em B indicam que o extrato utilizado foi de espermoteca de rainhas fecundadas.

4.2- ANÁLISE COMPARATIVA COM BASE NAS IMAGENS OBTIDAS

A análise comparativa das réplicas dos perfis protéicos em géis bidimensionais do extrato de espermatecas de rainhas fecundadas e fêmeas virgens, utilizando o software *Image Master*, resultou na identificação de 22 *spots* com expressão diferencial (Figura 7, Tabela 2).

Ao comparar o grupo de rainhas fecundadas com o de fêmeas virgens, observou-se que o grupo de rainhas fecundadas foi o que apresentou maior número de proteínas diferencialmente expressas (75% das submetidas à MS) (Tabela 2). Para definir a expressão diferencial foi considerada a presença e a ausência dos *spots* nas réplicas dos géis bidimensionais, bem como maior expressão em um dos grupos quando a proteína foi expressa em ambos. Expressão diferencial identificada por presença e ausência foi observada apenas para rainhas fecundadas. Como no grupo de rainhas virgens, todas as proteínas avaliadas foram também expressas no grupo de rainhas fecundadas. A identificação de expressão diferencial foi com base em cálculo de porcentagem de volume (% vol). Neste caso, foram consideradas proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram percentagem de volume igual ou maior que 1,2 vezes (média de 3 géis) (Tabela 2).

Os pontos isoelétricos e as massas moleculares teóricas das proteínas que apresentaram expressão diferencial foram estimados utilizando software apropriado. Foi observado que o perfil de menor pI foi 4,73 e o maior foi 9,61. Analisando separadamente o grupo de fêmeas virgens, observou-se pequena variação no pI (5,46 a 6,68). No entanto, quando a amostra era de rainhas fecundadas a variação foi maior (5,81 a 9,61), o que era esperado, considerando que o número de proteínas com expressão diferencial foi maior nesse grupo. Em relação às massas moleculares estimadas, grande variação foi observada sendo determinadas massas de 29 kDa a 106 kDa (Tabela 2).

Os 22 *spots* contendo as proteínas que apresentaram expressão diferencial foram excisados, submetidos à digestão com tripsina e analisados por espectrometria de massas.

Os espectros obtidos foram avaliados pela técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF), do algoritmo MASCOT. Essa comparação foi feita visando identificar proteínas homólogas às de *Drosophila melanogaster*, grupo taxonômico mais

próximo de *A. sexdens rubropilosa*. Observou-se que 72,7% das amostras submetidas a MS (16 amostras) apresentaram potencial homologia com proteínas conhecidas e relatadas nos bancos de dados utilizados. As outras 6 amostras não foram identificadas (Tabela 3 e 4). A maioria das proteínas analisadas apresentou *score* não significativo. Neste caso, outros parâmetros como massa e pI; percentagem de cobertura da sequência e número de matches foram considerados durante a avaliação das mesmas.

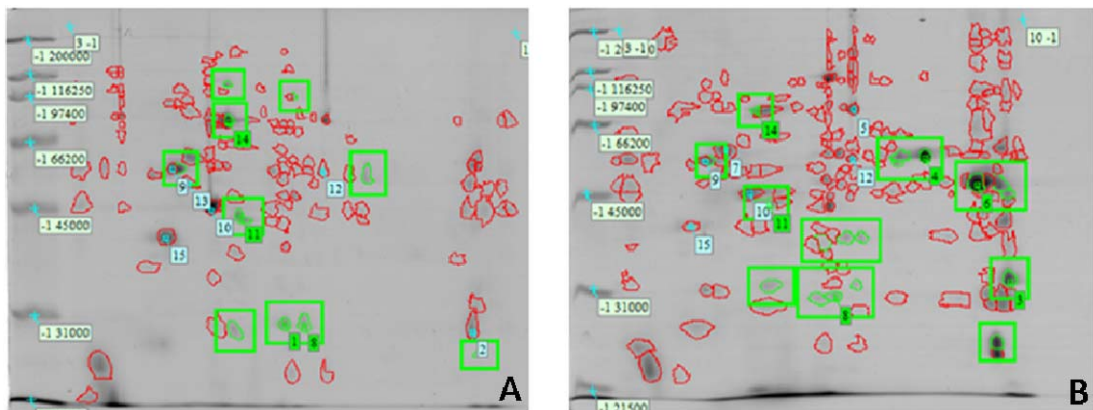


Figura 7 – Géis bidimensionais de referência, evidenciando (em verde) os spots indicando proteínas diferencialmente expressas nos grupos analisados. A: expressão diferencial no grupo de fêmeas virgens. B: expressão diferencial no grupo de fêmeas fecundadas. A primeira dimensão (focalização isoeétrica) foi realizada em tiras de 7cm gradiente de pH 3-10 e a segunda dimensão por SDS-PAGE 10%. Marcador de peso molecular: *Broad Range(BioRad)*. O géis foram corados pela técnica do Coomassie Brilliant Blue Colloidal.

Tabela 2 – Dados obtidos por análises dos perfis bidimensionais utilizando software *Image Master*. Massas moleculares (kDa) e pontos isoelétricos (pI) estimados pelo programa. Match count 1 ou 2, indicando, respectivamente, a ocorrência do *spot* em apenas 1 dos grupos ou em ambos (virgens e fecundadas). Percentagem de volume (%V) indicando a expressão diferencial, quando a presença do *spot* foi observada nos 2 grupos. Controle +: Marcador Molecular 45.000, Controle -: fragmento de gel branco *spots* protéicos.

Amostras	Massa Molecular/kDa	pI	Match count	%V	Grupo
1	58.565	8,14	1	-	Fecundada
2	58.745	7,78	1	-	Fecundada
3	29.050	5,58	2*	1,62	Virgem
4	78.446	5,50	2	6.05	Virgem
5	48.433	5,93	1	-	Fecundada
6	33.227	7,16	1	-	Fecundada
7	46.258	9,48	1	-	Fecundada
8	96.577	6,63	2*	3.32	Fecundada
9	32.640	5,81	1	-	Fecundada
10	43.542	5,67	2	1,90	Virgem
11	47.002	9,61	1	-	Fecundada
12	29.751	6,38	2	2,01	Virgem
13	33.161	9,53	1	-	Fecundada
14	56.106	4,73	2*	2,37	Virgem
15	53.560	7,65	2*	1,77	Fecundada
16	39.717	6,99	1	-	Fecundada
17	50.711	9,03	1	-	Fecundada
18	39.875	7,22	1	-	Fecundada
19	26.069	9,40	1	-	Fecundada
20	38.553	6,54	1	-	Fecundada
21	29.686	6,68	2	1,26	Virgem
22	106.000	5,46	1	-	Virgem
23					Marcador Molecular 45000
24					Fragmento de gel com ausência de <i>spots</i> protéicos

* indica que foi realizado cálculo de % de volume nas amostras.

Tabela 3 – Proteínas preditas por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). Massa molecular e pI teóricos. Proteínas sugeridas pelos bancos de dados utilizados com seus respectivos códigos de acesso, pI e massa molecular. *Score/score* significativo: pontuação que quantifica o grau de similaridade entre as duas sequências. % de cobertura: percentagem da sequência da proteína do banco de dados “coberta” pelos peptídeos da amostra. Número de Match: número de valores de massa encontrados.

Amostra	Match ID	pI teórico	Massa Molecular teórica	Identificação (organismo)	Acesso	pI	Massa Molecular	Score/Score Significativo	Cobertura da sequência (%)	Número de match	Banco de dados
1 - FEC	84	8,14	58.565	Citocromo P450 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	C6A14_DROME	9.12	58.451	45/50	24%	11	SwissProt/0,5
2 - FEC	83	7,78	58.745	Fator de alongação 1-alpha2 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	EF1A2_DROME	9.07	51.030	45/50	24%	10	SwissProt/0,5
4 - Vir	45	5,50	78.446	Cdc6 (<i>Drosophila mauritiana</i>)	gi 113197051	9.27	73900	49/66	20%	13	NCBI/0,5
5 - FEC	74	5,93	48.433	Actina-5C (<i>Drosophila melanogaster</i>)	ACT1_DROME	5.30	42.196	54/50	30%	8	SwissProt/0,5
6 - FEC	67	7,16	33.227	GL23619 (<i>Drosophila persimilis</i>)	gi 195144050	5.60	45970	47/66	11%	6	NCBI/0,5
7 - FEC	73	9,48	46.258	Subunidade C - Fator de Replicação 2 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	RFC2_DROME	7.62	37.549	44/50	34%	11	SwissProt/0,5
9 - FEC	66	5,81	32.640	GI24073 (<i>Drosophila mojavensis</i>)	gi 195117162	5.94	24.081	46/66	29%	5	NCBI/0,5

10 - VIR	14	5,67	43.542	Lipase 3 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	LIP3-DROME	5.36	45214	40/50	25%	6	SwissProt/0,5
11 - FEC	77	9,61	47.002	Vitellogenina-2 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	VIT2 -DROME	7.74	49.744	14/50	7%	2	SwissProt/0,1
14 - VIR	30	4,73	56.106	GL23714 (<i>Drosophila persimilis</i>)	gi 195143705	6.13	89443	50/66	13%	10	NCBI/0,5
15-FEC	24	7,65	53.560	Subunidade Catalitica da enzima ativadora E1-NEDD8 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	UBA3_DROME	5.26	50.855	35/50	10%	5	SwissProt/0,5
17- FEC	78	9,03	50.711	Receptor Dopamina D2-like (<i>Drosophila melanogaster</i>)	DRD2L_DROME	8.95	57.182	15/50	13%	2	SwissProt/0,5
18 - FEC	54	7,22	39.875	Yolk protein 1 (<i>Drosophila macrothrix</i>)	gi 1490463	6.02	31013	33/66	20%	4	NCBI/0,1
19 - FEC	3	9,40	26.069	GI13461 (<i>Drosophila mojavensis</i>)	gi 195127850	9.88	22.686	47/66	29%	6	NCBI/0,5
20 - FEC	69	6,54	38.553	GM23230 (<i>Drosophila sechellia</i>)	gi 194865752	8,90	34.358	45/66	17%	8	NCBI/0,5
21 -VIR	7	6,68	29.686	GG14359 (<i>Drosophila erecta</i>)	gi 194865752	8.69	19.672	58/66	34%	7	NCBI/0,5

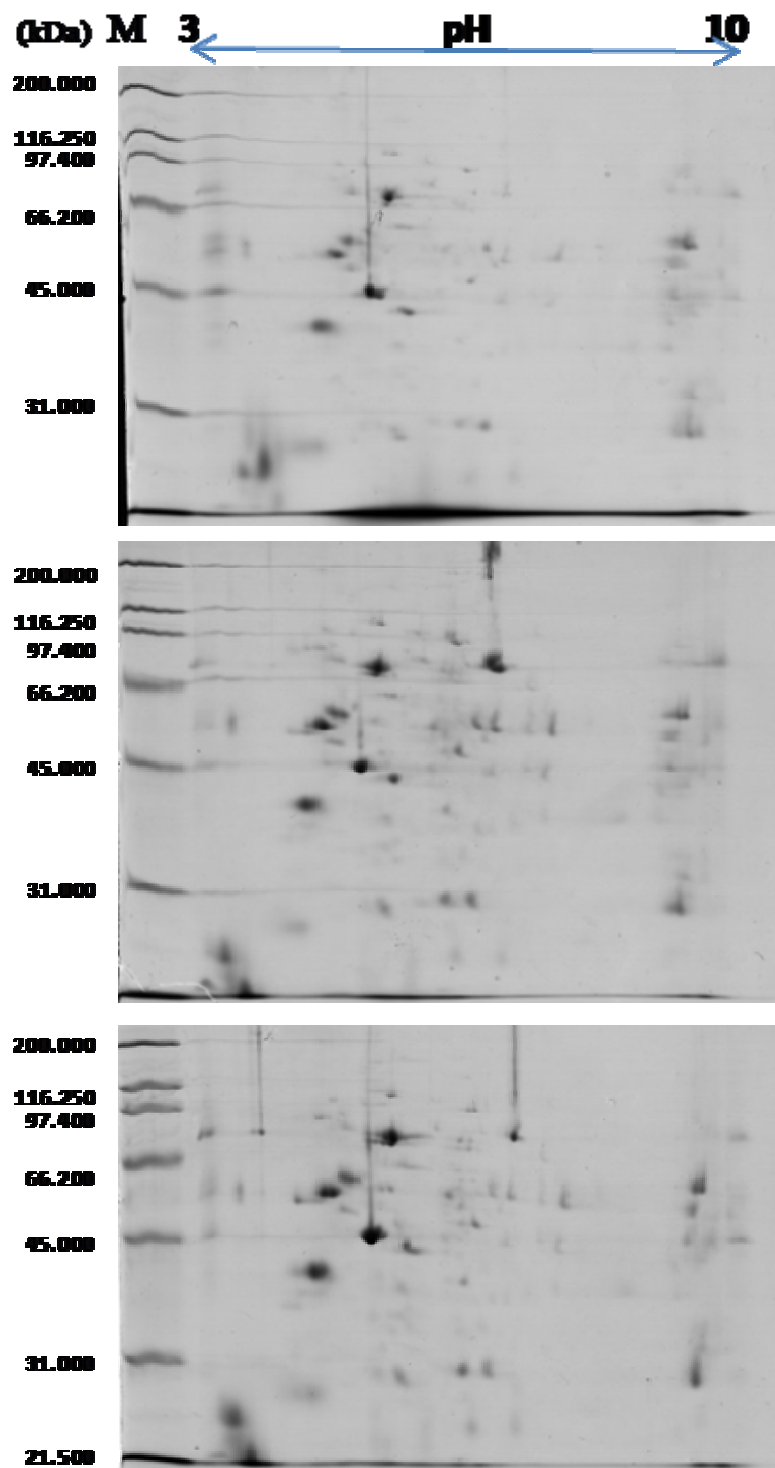


Figura 8 – Réplicas dos perfis bidimensionais dos extratos protéicos de espermatecas de rainhas virgens. A primeira dimensão (focalização isoeétrica) foi realizada em tiras de 7cm com gradiente de pH 3-10 e a segunda por SDS-PAGE 10%. M: Marcador de massa molecular: *Broad Range*. Os géis foram corados pela técnica de Coomassie Blue Coloidal.

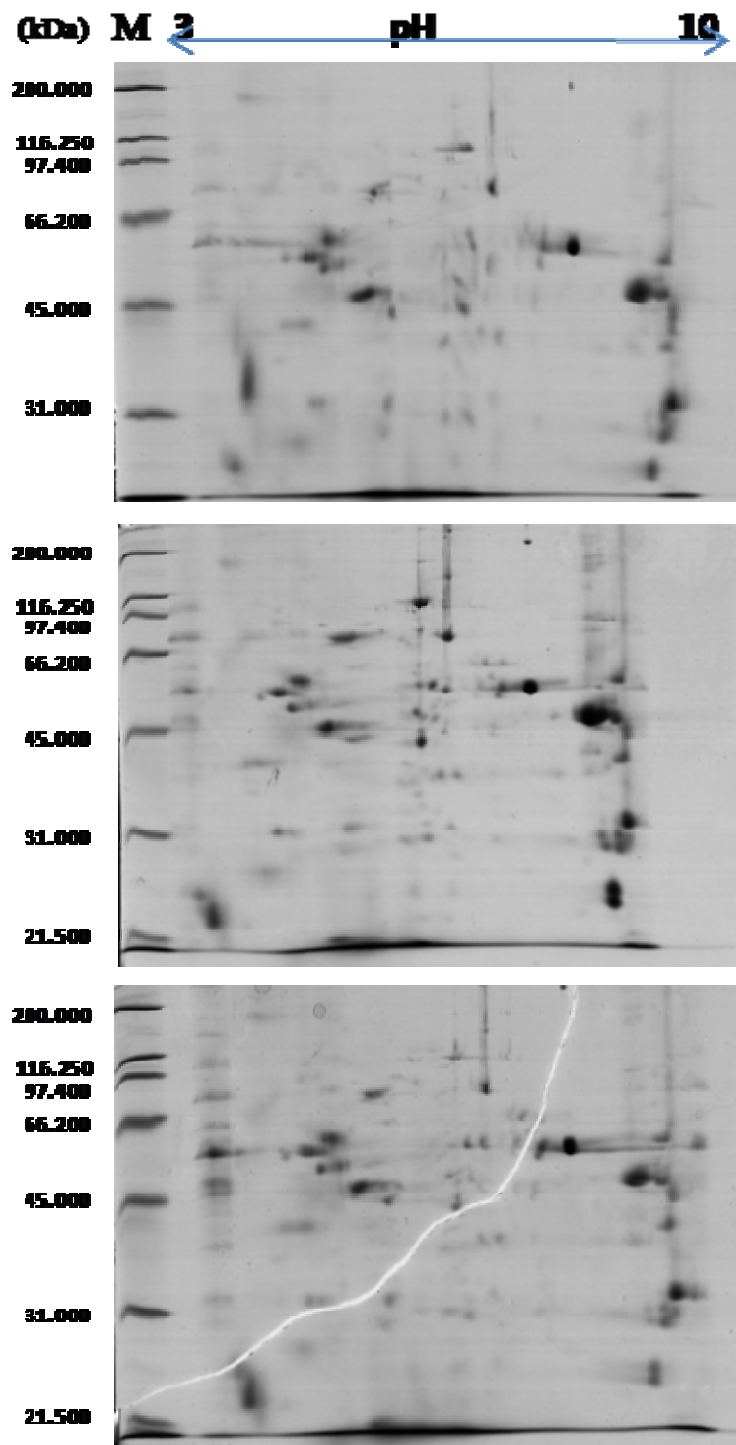


Figura 9 – Réplicas dos perfis bidimensionais dos extratos protéicos de espermatecas de rainhas fecundadas. A primeira dimensão (focalização isoelétrica) foi realizada em tiras de 7cm com gradiente de pH 3-10 e a segunda dimensão por SDS-PAGE 10%. M: Marcador de massa molecular: *Broad Range*. Os géis foram corados pela técnica de Coomassie Blue Coloidal.

As proteínas identificadas neste estudo foram classificadas em categorias funcionais (metabolismo; processos celulares; vias de informação, e estrutura e organização celular) conforme Rison e colaboradores (2000) (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição das proteínas identificadas por PMF de acordo com a categoria funcional de cada uma.

Amostra	pl	MASSA MOLECULAR	Identificação (organismo)	Acesso	Categoria funcional
1 - FEC	9.12	58.451	Citocromo P450	C6A14_DROME	Processos celulares
16-FEC	5.36	45214	Subunidade Catalitica da enzima ativadora NEDD8 - E1	UBA3_DROME	
18- FEC	7.74	49.744	Receptor Dopamine D2-like	DRD2L_DROME	
2 - FEC	9.07	51.030	Fator de alongação 1-alpha2	EF1A2_DROME	Vias de informação
4 - Vir	9.27	73900	Cdc6	gi 113197051	
7 - FEC	5.60	45970	Subunidade C - Fator de Replicação 2	RFC2_DROME	
5 – FEC	5.30	42.196	Actina-5C	ACT1_DROME	Estrutura e organização estrutural
10 - VIR	7.62	37.549	Lipase 3	LIP3-DROME	Metabolismo
11 - FEC	5.94	24.081	Vitellogenina-2	VIT2 -DROME	
19 - FEC	6.13	89443	Yolk protein 1	gi 1490463	
20 - FEC	5.26	50.855	GI13461	gi 195127850	NÃO IDENTIFICADAS
21 - FEC	8.95	57.182	GM23230	gi 194865752	
22 -VIR	6.02	31013	GG14359	gi 194865752	
15 - VIR	9.88	22.686	GL23714	gi 195143705	
9 - FEC	8,90	34.358	GI24073	gi 195117162	

Das 16 proteínas avaliadas, três foram classificadas dentro da categoria “metabolismo”, sendo elas a lipase, vitelogenina e *yolk protein* (proteína do ovo). Esta categoria reúne as proteínas envolvidas no metabolismo de energia (autotrófico), metabolismo de macromoléculas como polissacarídeos e glicoproteínas, bem como de pequenas moléculas como lipídios, ácidos graxos e esterol.

A proteína presente no *spot match* ID 14 foi detectada nos dois grupos analisados, no entanto, apresentou maior expressão na amostra de espermatecas de fêmeas virgens (Figura 10). De acordo com os dados obtidos, a massa molecular e pI teóricos sugeridos para essa proteína foram de 43.542 kDa e 5,67 respectivamente. Essa proteína apresentou homologia com a proteína Lipase-3 de *D. melanogaster* (Tabela 3), cuja massa molecular e pI são respectivamente, 45.214 kDa e 5.36. Essa proteína apresentou *score* não significativo porém alto (40), tendo sido considerado como significativo o valor de *score* maior ou igual a 50.

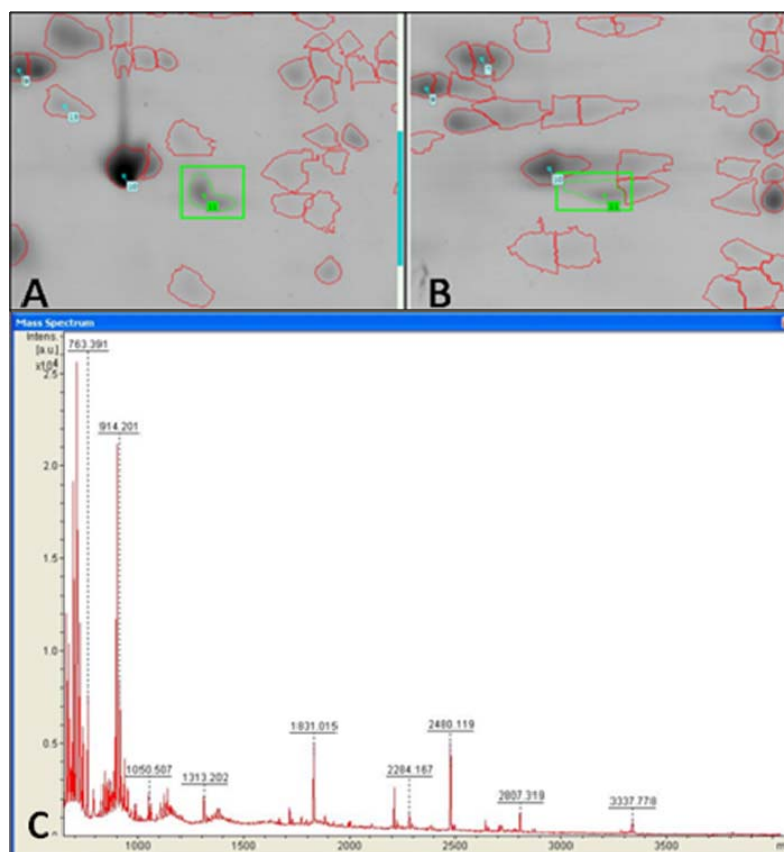


Figura 10 - Expressão diferencial da proteína Lipase 3. A: mostrando a expressão da proteína (marcada em verde), B: proteína menos expressa (em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

A presença desta proteína nas amostras analisadas pode estar relacionada com a presença de células do corpo gorduroso no material dissecado.

A presença de lipase, com expressão diferencial nas amostras de fêmeas virgens, pode estar associada ao acúmulo de corpo gorduroso e, assim, de lipídeos em fêmeas virgens como preparação para a entrada na fase reprodutiva. De acordo com Chapman (1998), o corpo gorduroso dos insetos tem como uma de suas funções o armazenamento de reservas alimentares. A quantidade e a natureza destas reservas alimentares dentro do corpo gorduroso podem variar dependendo de condições fisiológicas ou ambientais, assim como do ciclo de vida, estado nutricional ou estágio de desenvolvimento do inseto (Cunha & Cruz-landim, 1983) o que pode justificar o aumento de lipase em fêmeas virgens. Segundo Cunha & Cruz-landim (1983), as fêmeas virgens de *Atta sexdens rubropilosa* eclodem com o corpo gorduroso muito desenvolvido, com reservas advindas da alimentação larval e sobras do que não foi gasto durante a metamorfose, sendo essas reservas consumidas quase totalmente até 60 dias após a nidificação. Comparando fêmeas virgens com rainhas fecundadas, observou-se redução na massa de corpo gorduroso nas fêmeas fecundadas (dados não mostrados) o que é coerente com o fato das espermatecas de rainhas fecundadas terem sido dissecadas cerca de 15 dias após a coleta.

Relatos de identificação da enzima lipase em espermateca de outros insetos não foram encontrados na literatura. Porém, esta enzima tem sido identificada em outros órgãos de diferentes insetos. Sirot *et al* (2007), utilizando análise proteômica por Nano-LC-MS/MS, identificaram lipase em extratos de glândulas reprodutivas de machos de *Aedes aegypti*. Utilizando a mesma técnica, Sirot *et al* (2011) observaram a presença dessa proteína no fluido seminal do ejaculado de machos de *Aedes aegypti*. Esta mesma enzima foi identificada por Zimbae *et al* (2008) em glândulas salivares e intestino médio de adultos de *C. suppressalis* (Lepidoptera). Estudando *Gryllus campestris* L. (Orthoptera), lipase foi totalmente ou parcialmente purificada no abdômen deste inseto (Orscelk *et al* 2007). Em 2003, Ponnuvel e colaboradores, purificaram no suco digestivo de *Bombyx mori* (Lepidoptera), lipase com atividade antiviral e Zouari *et al* (2005) purificaram esta enzima no hepatopâncreas do escorpião *Scorpio maurus* sendo a lipase digestiva com massa de 50 kDa.

A proteína presente no *spot* 54 (match ID) foi detectada somente nos géis bidimensionais de rainhas fecundadas de *A. sexdens rubropilosa* (Figura 11). A massa molecular e o pI da mesma foram, respectivamente, de 39.875 kDa e 7,22 (Tabela 2). Essa proteína apresentou homologia com a proteína *Yolk protein-1* de *D. macrothrix* (Tabela 3) que possui massa de 31.013 kDa e pI igual a 6.02. Além disso, a proteína avaliada apresentou *score* 33, sendo o *score* significativo igual a 66. A proteína do *spot* de ID 77 também teve sua presença detectada apenas em espermatecas de fêmeas fecundadas e apresentou massa molecular teórica de 47.002 kDa e pI teórico de 9.61 (Tabela 2 e Figura 12). Essa proteína mostrou similaridade com a proteína Vitellogenina-2 de *D. melanogaster*, com massa molecular de 49.744 e pI igual a 7,74 (Tabela 3). Mesmo apresentando *score* relativamente baixo (14) sendo o significativo ≥ 50 , essa proteína foi avaliada por apresentar valores de massa e pI próximos dos valores teóricos (Tabela 3).

No presente estudo a proteína vitelogenina foi encontrada somente em espermatecas de rainhas fecundadas. No entanto, Baer *et al* (2009a) identificaram a presença dessa proteína em espermatecas de fêmeas virgens e rainhas fecundadas da abelha *Apis mellifera* utilizando géis monodimensionais analisados por MS/MS. Além disso, a proteína *yolk protein* não foi encontrada em nenhum dos grupos analisados por. Baer *et al* (2009a).

As proteínas do ovo (*Yolk proteins – YPs*) são a base nutricional para o embrião em desenvolvimento em todos os animais ovíparos. A vitelogenina, considerada proteína específica de fêmeas, por estar relacionada à reprodução, é precursora da principal proteína do ovo que compõe o vitelo, a vitelina (Tadbowski & Jones, 1979).

Em insetos, a vitelogenese, processo de síntese, transporte e acúmulo de proteínas precursoras de vitelo é fundamental para biologia reprodutiva. Para que ocorra a vitelogenese, as *YPs* são sintetizadas no corpo gorduroso de fêmeas e secretadas na hemolinfa sob a forma de vitelogenina e endocitadas pelos oócitos durante a maturação.

Em abelhas, *Apis mellifera*, foi identificado que a Vitelogenina tem um papel

importante como antioxidante, pois apresenta capacidade de se ligar ao zinco. Esta proteína protege esse inseto contra o estresse oxidativo e apoptose em diversas rotas celulares, sendo considerada importante na imunidade e longevidade de abelhas (Amdam *et al* 2004, 2005; Seehuus *et al* 2006).

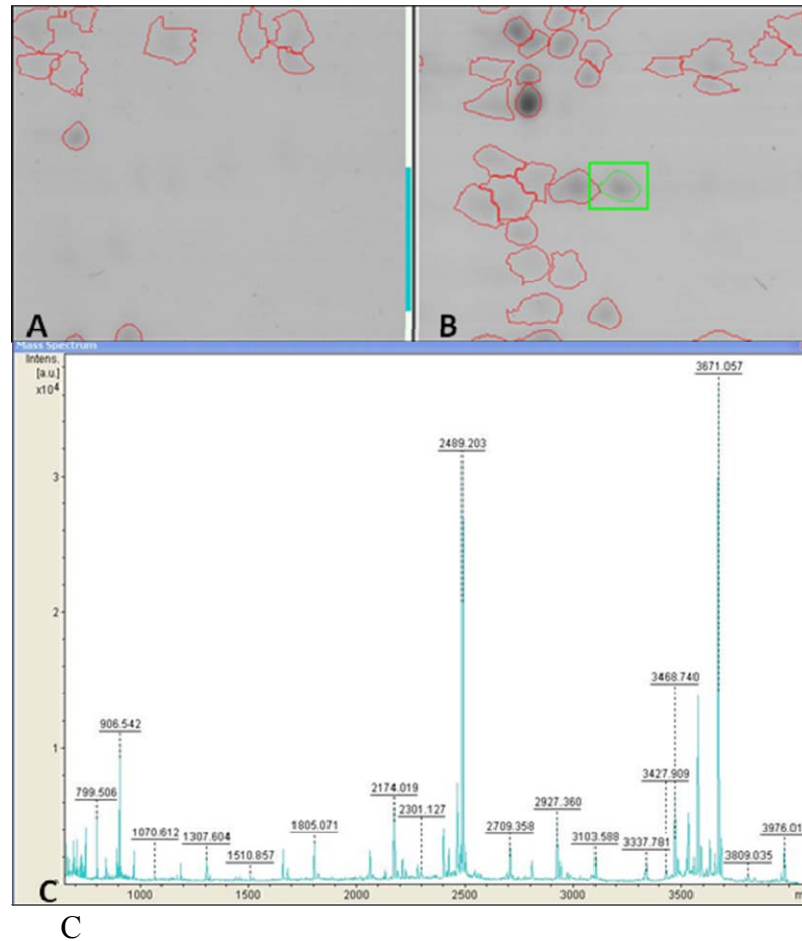


Figura 11 - Expressão diferencial da proteína *Yolk Protein*. A: ausência de expressão da proteína em rainhas virgens, B: presença da proteína (marcado em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

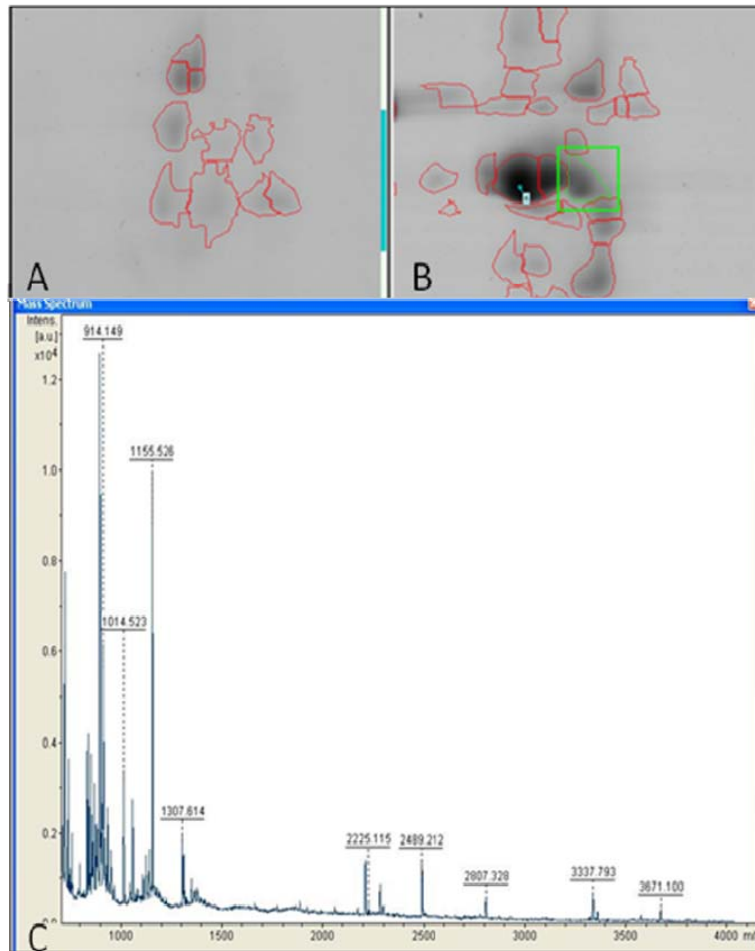


Figura 12 - Expressão diferencial da proteína Vitelogenina. A: ausência de expressão da proteína em rainhas virgens, B: presença da proteína (marcado em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

A categoria “processos celulares” inclui proteínas associadas à divisão celular, adaptação, proteção (respostas/detoxificação) e respostas a estímulos. Dentre as proteínas avaliadas, quatro (Citocromo P450, Subunidade Catalítica da enzima ativadora NEDD8– E1 e receptor de Dopamina D2-like) pertencem a esta categoria.

Os Citocromos P450 (CYPs) formam uma grande e diversificada família de Heme-proteínas capazes de realizar diversas reações enzimáticas por meio da oxidação de uma grande diversidade de moléculas orgânicas (Chung *et al* 2009). Estas proteínas são encontradas em quase todos os organismos, desde protistas e plantas até mamíferos incluindo o homem (Mansuy, 1998). Tem sido sugerido que a diversidade de genes que codificam para P-450s em genomas de insetos é necessária para proteger os insetos dos mais diferentes compostos prejudiciais do ambiente

(Claudianos *et al* 2006).

Neste estudo o *spot* de numero 84 possivelmente contém a proteína Citocromo P450 que foi identificada apenas no extrato de espermatecas de rainhas fecundadas (Figura 13). Essa proteína apresentou massa e pI teóricos de 58.565 kDa e 8,14, respectivamente (Tabela 2), e homologia com a proteína Citocromo P450 de *D. melanogaster* que possui massa molecular de 58.451 kDa e pI igual a 9.12 (Tabela 3). O *score* obtido (45) foi relativamente alto e muito próximo do *score* considerado significativo (≥ 50), sugerindo que a proteína avaliada pode de fato ser a proteína Citocromo P450. Além disso, os valores de massa molecular (valor teórico) da proteína analisada e o valor de massa da proteína de *D. melanogaster* são muito próximos, o que reforça a sugestão acima.

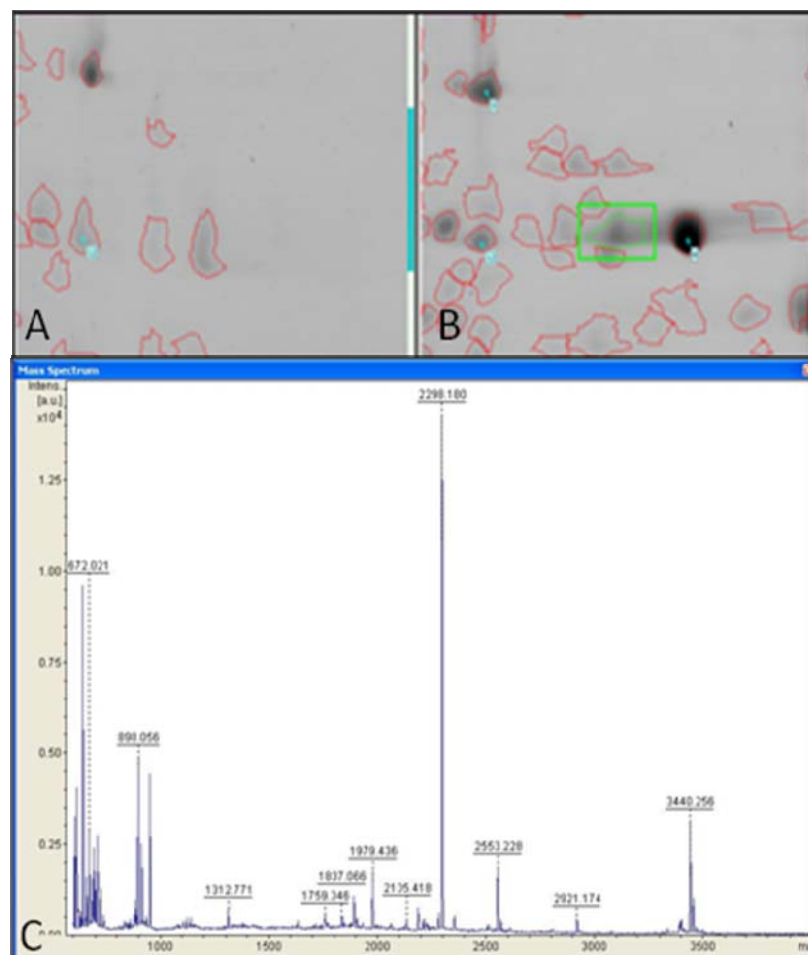


Figura 13 - Expressão diferencial da proteína Citocromo P450. A: proteína ausente na amostra de rainhas virgens, B: proteína presente (em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos obtidos por digestão com tripsina.

Foi avaliado, também, neste estudo a proteína do *spot* de numero 24 que foi expressa na espermateca de rainhas fecundadas e de fêmeas virgens (Figura 14). Entretanto, ao avaliar a porcentagem de volume do *spot* correspondente, verificou-se maior expressão em fêmeas virgens. Com base nas análises dos perfis bidimensionais, a massa molecular e pI dessa proteína foram estimados em 53.560 kDa e pI igual a 7.65, respectivamente, (Tabela 2). Essa proteína apresentou homologia com a proteína NEDD8-E1 de *D. melanogaster* que possui massa molecular de 50.865 kDa e pI igual a 5.26. No entanto, o *score* obtido foi relativamente baixo (35) em relação ao *score* significativo para esta proteína (≥ 50) (Tabela 3).

A proteína NEDD8-E1 (subunidade da enzima NEDD8-E1 NAE1-UBA3) atua catalizando a ativação de NEDD8, proteína (“Ubiquitin-like”), durante o processo de nedilação (marcação de proteínas a serem degradadas no proteossomo) (Gong, 1999). A proteína tipo ubiquitina NEDD8 regula muitos processos biológicos importantes incluindo divisão celular; transdução de sinal; desenvolvimento e embriogenese, e é essencial para a viabilidade de muitos organismos (Pan *et al* 2004; Kurz *et al* 2002).

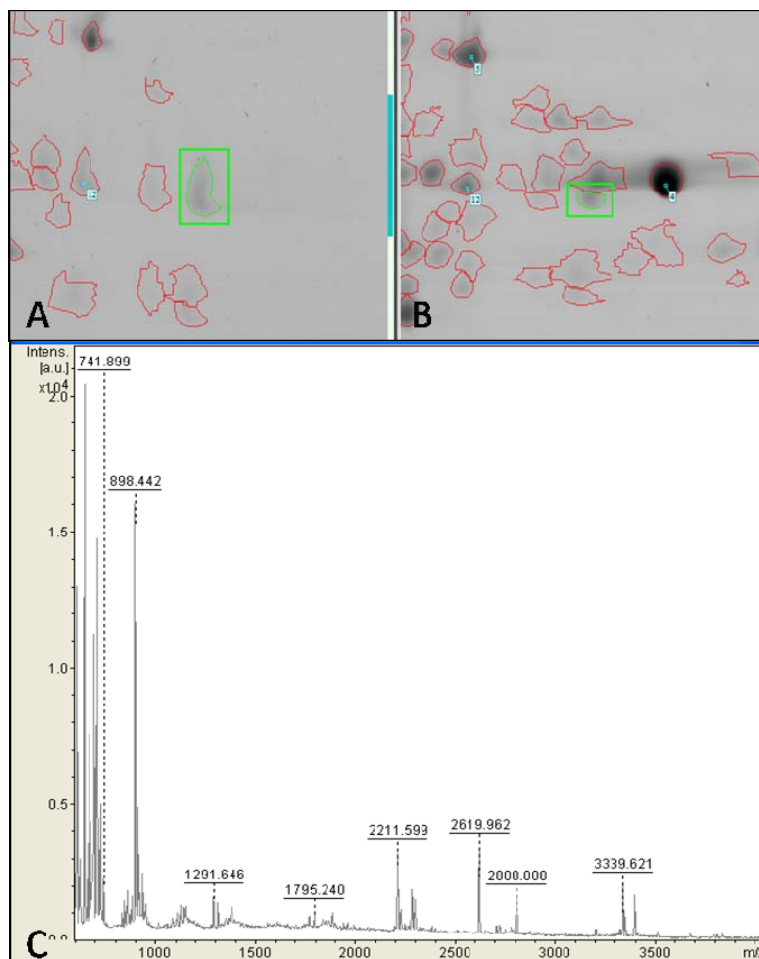


Figura 14 - Expressão diferencial da proteína Subunidade Catalítica da enzima ativadora E1 - Nedd8. A: expressão da proteína (em verde) em rainhas virgens. B: maior expressão da proteína (em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

A proteína no spot 78 presente somente nos géis bidimensionais contendo extrato protéico de rainhas fecundadas (Figura 15), apresentou massa molecular teórica de 50.711 kDa e pI teórico de 9.03 (Tabela 2). Essa proteína apresentou homologia com a proteína Receptor de Dopamina D2-like, de *D. melanogaster*, que possui massa molecular de 57.182 kDa e pI de 8.95. Embora a diferença de massas entre as duas proteínas seja relativamente pequena o *score* obtido para a proteína de *A. Sexdens rubropilosa* (15) foi muito menor que o significativo (≥ 50) (Tabela 3).

Receptores dopamina têm sido descritos há alguns anos por exercer um papel chave na neurotransmissão. Duas classes de receptores têm sido descritas bioquimicamente, e são denominadas de D1-like e D2-like, de acordo com as suas funções de estimular ou inibir, respectivamente a adenil-ciclase, como, também,

pelas suas diferenças farmacológicas (Anderson *et al* 1990; Civelli *et al* 1991; Sibley & Monsma, 1992).

O neurotransmissor Dopamina tem sido fortemente associado a funções de regulação da atividade motora (Yellman *et al* 1997, Feany & Bender, 2000; Friggi-Grelin *et al* 2003), comportamento sexual e desenvolvimento (Neckameyer, 1996; 1998) e função endócrina (Granger *et al* 1996, 2000). Em insetos possui ampla distribuição no sistema nervoso, onde tem sido proposto, apresentar função de neurotransmissor, neuro-hormônio e de um efector neuroglandular (Evans, 1980; Brown e Nestler, 1985).

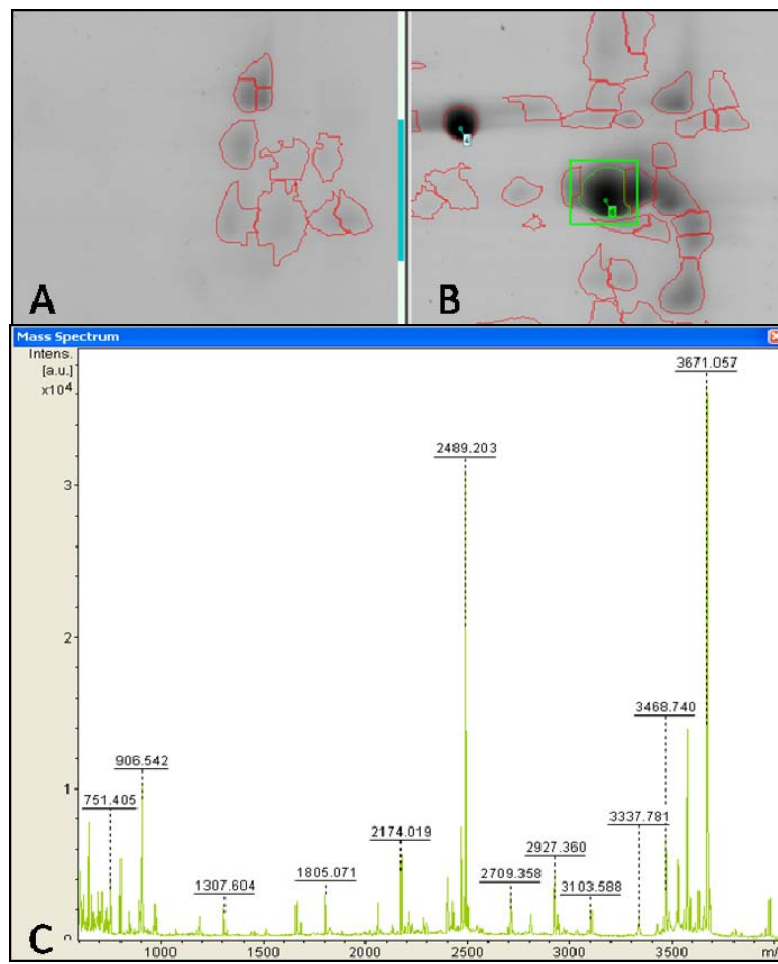


Figura 15 - Expressão diferencial da proteína Receptor Dopamina D2-like. A: ausência de expressão da proteína em rainhas virgens, B: presença da proteína (em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

Neste estudo foram identificadas, também, as proteínas Fator de alongação 1-alpha2, a proteína Cdc6 e a Subunidade C - Fator de Replicação-2. Estas proteínas estão incluídas na categoria “vias de informação” onde estão agrupadas as proteínas relacionadas a eventos associados ao DNA, seja atuando nos processos de síntese (transcrição e tradução) e replicação; modificação e reparo bem como recombinação ou degradação.

A proteína de massa molecular 58.745 kDa e pI igual a 7.78 foi detectada apenas no extrato de espermatecas de rainhas fecundadas (Figura 16, Tabela 2) apresentou homologia com o Fator de alongação1 Alpha (EF1-A ou EF1- α) de *D. melanogaster* que possui peso molecular de 51.030 kDa e pI igual a 9.07. Embora os valores de pI destas duas proteínas não sejam próximos, os valores de massa molecular podem ser considerados relativamente próximos e o *score* (45) muito próximo do significativo (≥ 50) (Tabela 3).

O Fator de alongação1 Alpha (EF1-A ou EF1- α) é um membro da família de proteínas G, e uma das quatro subunidades que compõem o fator de alongamento que em bactérias é denominado de EF-Tu e em células eucarióticas de EF-1 (Eriji, 2002 ; Alberts *et al* 2010). EF1-A, segunda proteína mais abundante, juntamente com a actina, compreendem 1 a 3 % do conteúdo normal de proteínas de células eucarióticas (Slobin, 1980; Condeelis, 1995; Eriji, 2002) o que justifica a presença de duas cópias do gene que codifica para esta proteína no genoma de *D. melanogaster* e de *A. mellifera* (Danforth, 1998). A sequência EF1A em diferentes organismos são altamente conservadas e, assim, amplamente empregadas em estudos filogenéticos em insetos (Caterino *et al* 2000; Mitchell *et al* 1997).

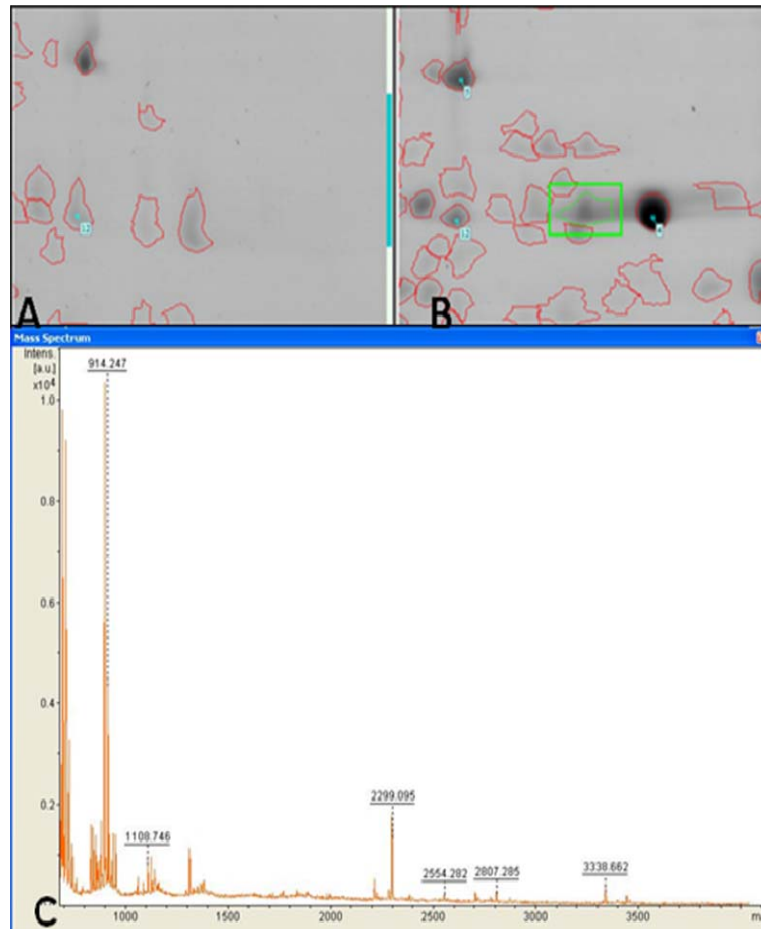


Figura 16 - Expressão diferencial da proteína Fator de alongação 1 Alpha. A: ausência de expressão da proteína em rainhas virgens. B: presença da proteína (em verde) em rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

A proteína presente no *spot* de número 45 (massa e pI teóricos de 78.446 kDa e 5.50, respectivamente) foi identificada nas espermatecas de rainhas fecundadas como de fêmeas virgens (Tabela 2), no entanto, observou-se maior expressão no extrato protéico de fêmeas virgens (Figura 17). Essa proteína apresentou homologia com a proteína Cdc6 (*cell division cycle 6*) de *Drosophila mauritiana* a qual possui massa molecular de 73.900 kDa , pI 9.27 e *score* igual a 49. Embora os valores de massa molecular destas duas proteínas sejam próximos, o valor de *score* (49) não se aproximou do significativo (≥ 66) (Tabela 3).

O gene que codifica para Cdc6 foi primeiramente identificado em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo, a proteína codificada, um dos componentes

necessários para a progressão do ciclo celular desse organismo (Hartwell, 1973). Esta proteína é conhecida por exercer um papel crucial no controle da replicação do DNA em leveduras e em células animais. As proteínas inibidoras de helicase Cdc6 e Cdt1 juntamente com o complexo MCM, formam o complexo de pré-replicação (*Pre-Replication Complex – pre-RC*) na fase G1 do ciclo celular (Bell e Dutta, 2002).

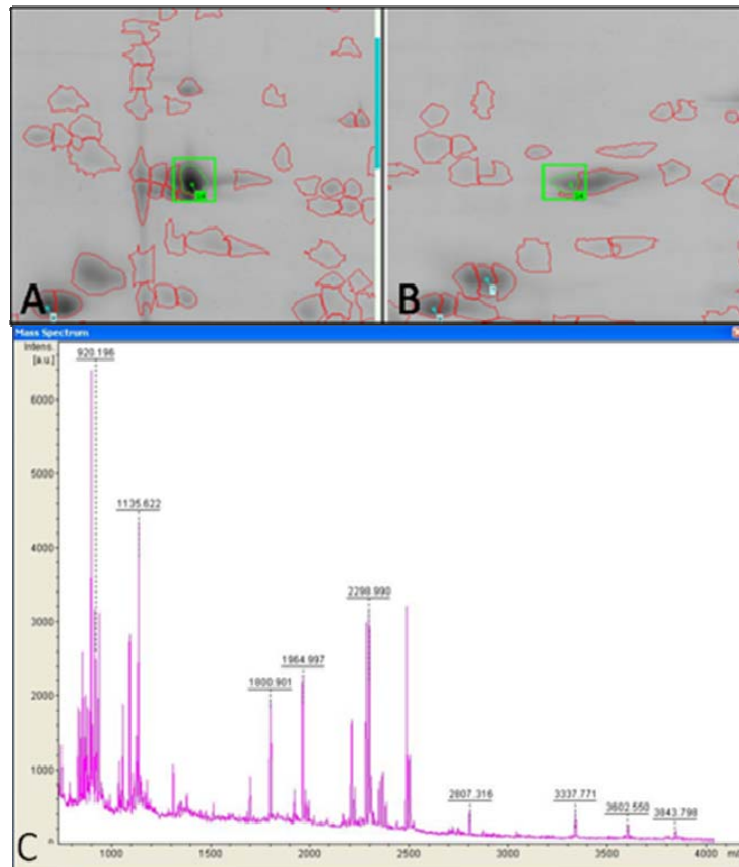


Figura 17 - Expressão diferencial da proteína Cdc6. A: maior expressão da proteína (em verde) em rainhas virgens (6,05 vezes mais expressa). B: menor expressão da proteína (em verde) em rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina

Outra proteína encontrada apenas no extrato protéico das espermatecas de rainhas fecundadas possui massa molecular teórica de 46.258 kDa e pI teórico de 9.48 (Figura 18 e Tabela 2). Essa proteína apresentou homologia com a proteína Subunidade 2 do Fator de replicação C (Rfc2) de *D. melanogaster* (37.549 kDa e pI = 7.62). Embora, os valores de massa sejam consideravelmente diferentes, o valor de

score da proteína analisada (44), é relativamente próximo ao considerado significativo (≥ 50) (Tabela 2).

O Fator de replicação C (RFC) exerce papel essencial na replicação e reparo do DNA em células eucarióticas. O RFC em eucariotos é um complexo pentamérico, consistindo de subunidades distintas, sendo uma subunidade maior, Rfc1 e quatro subunidades menores Rfc 2 a 5 denominadas subunidades α , δ , χ , ψ , respectivamente (Mossi & Hübscher, 1998).

Valor de massa molecular próximo ao da proteína Subunidade 2 do RFC avaliada neste estudo (37.549 kDa) foi relatado para essa proteína em humanos (40 kDa) (Tsurimoto *et al* 1989; Lee *et al* 1991) e em *S. cerevisiae* (39.9 kDa) (Nokov *et al* 1994; Cullmann, 1995). Ao comparar os valores de massa observa-se que existe alta similaridade da proteína identificada no presente estudo com a de *S. cerevisiae* e humanos.

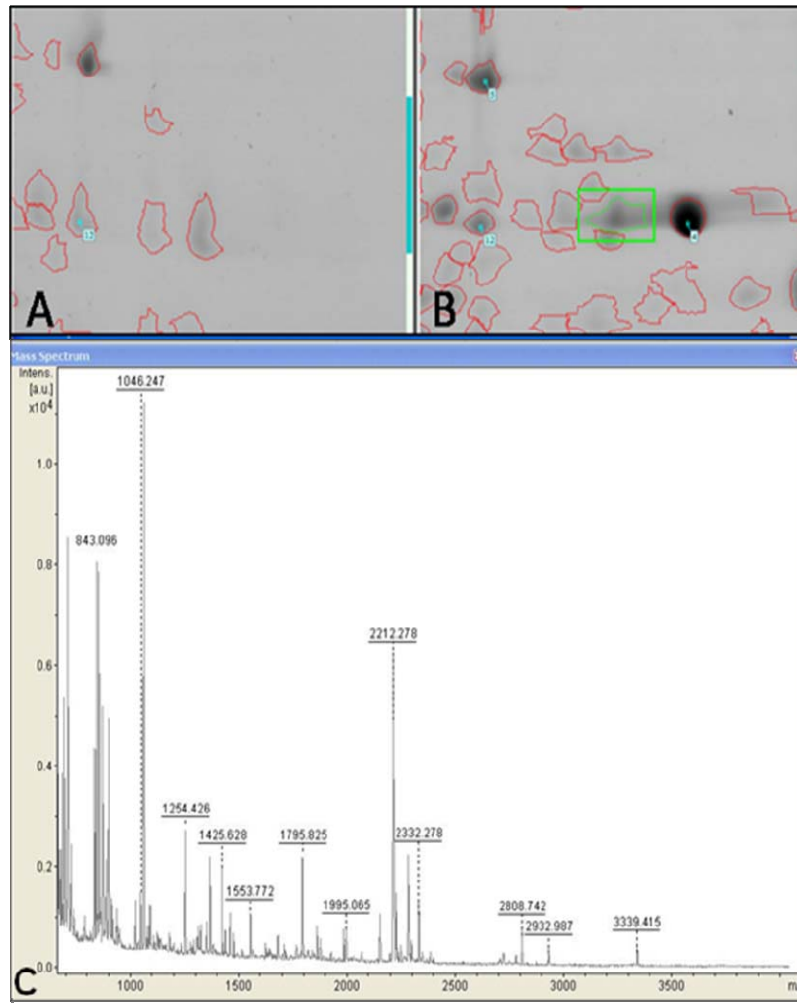


Figura 18 - Expressão diferencial da proteína Fator de Replicação C. A: ausência da proteína em rainhas virgens. B: expressão diferencial da proteína (em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina.

A proteína presente no spot 74, com massa molecular e pI teóricos de 48.433 kDa e 5.93 respectivamente, foi detectada apenas no grupo de rainhas fecundadas (Figura 19 e Tabela 2). Esta proteína apresentou homologia com a proteína actina 5-C de *D. melanogaster* que apresenta massa molecular e pI compatíveis com os valores teóricos estimados (42.196 kDa e pI 5.30). Considerando a metodologia utilizada neste trabalho, a actina 5-C foi à única proteína que apresentou *score* maior (54) que o considerado significativo (≥ 50) (Tabela 3).

Actina 5-C está inserida na categoria funcional “estrutura e organização estutural” que agrupa as proteínas com funções relacionadas ao citoesqueleto ou a membrana celular. É um componente fundamental do citoesqueleto em todos os organismos eucariontes, pois a dinâmica rede de filamentos de actina é essencial para diversas funções celulares como a motilidade celular, determinação da forma da célula e estabelecimento da polaridade celular. Participa também, do processo de divisão celular, secreção e transporte de vesículas polarizadas (endocitose e exocitose) sendo que em células especializadas atua na contração muscular (Mounier & Prudhomme 1991; Wagner, 2002; Bamburg, 1999; Carlier *et al* 1999). Além disso, é altamente conservada entre eucariotos, apresentando 90% de similaridade quando sequências são comparadas, mesmo entre espécies evolutivamente distantes, como é o caso de humanos e metazoários (Herman, 1993; Alberts *et al* 2010).

Embora em *A. sexdens rubropilosa* a proteína Actina 5-C tenha sido expressa, somente em espermatecas de rainhas fecundadas, esta mesma proteína foi identificada por Baer *et al* (2009a), que utilizaram LC-MS/MS (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas) na espermateca de fêmeas virgens e rainhas fecundadas de *A. mellifera*. Ainda em *A. mellifera* e utilizando esta mesma técnica, Actina 5-C foi identificada por Baer *et al* (2009b) no fluido seminal de machos dessa abelha.

Ge *et al* (2011), estudando *Nilaparvata lugens* (Hemiptera), principal praga em plantações de arroz, identificaram a presença da proteína Actina 5-C por análise LC-MS/MS, em glândulas acessórias do trato reprodutivo de machos, de fêmeas virgens e de fêmeas fecundadas dessa espécie. Os autores sugeriram que esta isoforma da actina está associada com músculos do vôo; expansão e desenvolvimento do corpo, e individualização do esperma.

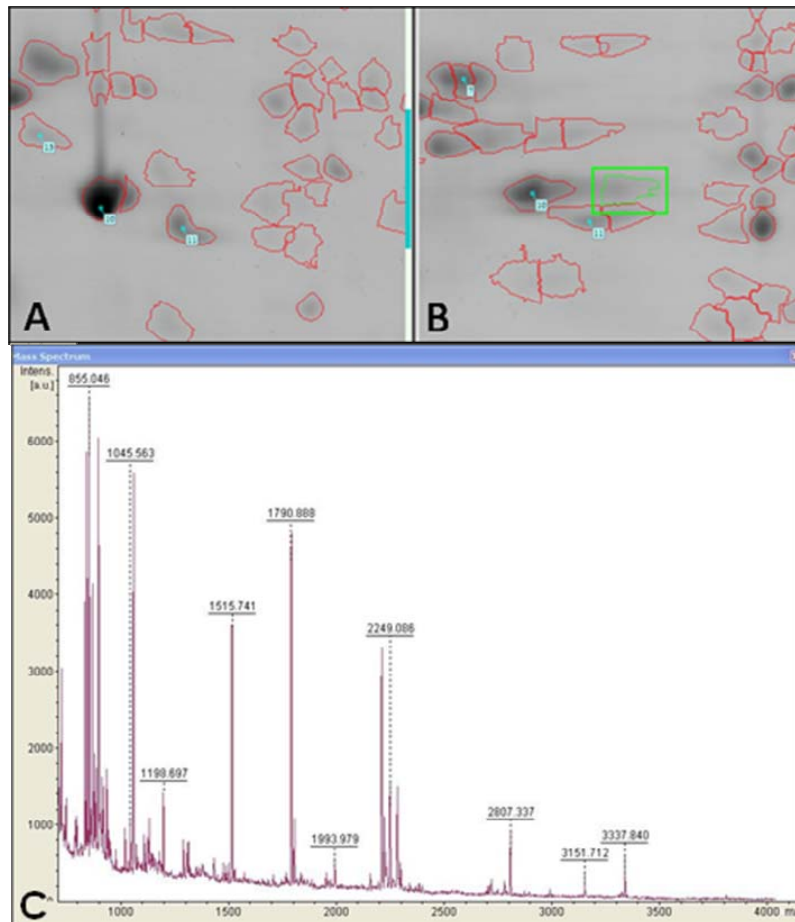


Figura 19 - Expressão diferencial da proteína Actina 5-C. A: ausência de expressão da proteína em rainhas virgens. B: presença da proteína (marcado em verde) no grupo de rainhas fecundadas. C: espectro com as massas dos peptídeos após digestão com tripsina

Considerando o total de proteínas analisadas, apenas uma delas, Actina 5-C, foi realmente identificada com base na metodologia empregada neste estudo. As demais proteínas analisadas não apresentaram *score* significativo, porém, para muitas delas os valores de massa e pI foram próximos aos da proteína com a qual tiveram possível homologia. Além disso, algumas das proteínas avaliadas apresentaram valores de % de cobertura da sequência, *scores* e número de *matches* consideráveis, sugerindo que estudos mais detalhados com essas proteínas poderão ser úteis para ampliar os conhecimentos acerca das mesmas e facilitar a sua real identificação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 . CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos, no presente estudo, representam dados de um estudo inicial de caracterização do proteoma da espermateca de *A. sexdens rubropilosa*. Estes dados associados a outros que poderão ser obtidos em estudos futuros, certamente irão contribuir para o entendimento do papel de proteínas expressas na espermateca de *A. sexdens rubropilosa* bem como de outros insetos, no processo de manutenção dos gametas pelas fêmeas e viabilidade dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTI, D.; MAJER, J.D.; ALONSO, L.E.; SCHULTZ, T.R. **Ants : standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington: Smithsonian Institution Press, 280 p. 2000.

ALBERTS. B.; LEWIS, J.; RAFF, M.C. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

AMDAM, G.V.; SIMÕES, Z.L.P.; HAGEN, A.; NORBERG, K.; SCHRODER, K.; MIKKELSEN, O.; KIRKWOOD, T.B.L.; OMHOLT, S.W. **Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees**. *Experimental Gerontology*, 39: 767–773. 2004.

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. **A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver**. *Electrophoresis*, 18: 533-537. 1997.

AUTUORI, M. **Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta spp. HymenopteraFormicidae*). V- Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais**. *Arquivos do Instituto Biológico*, 19: 325-331. 1950.

BAER, B.; EUBEL, H.; TAYLOR, L.N.; O'TOOLE, N.; MILLAR, H. **Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera***. *Genome Biology*, 10: 6. 2009a.

BAER, B.; HEAZLEWOOD, J.L.; TAYLOR, N.L.; EUBEL, H.; MILLAR, A.H. **The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera***. *Proteomics*, 9: 2085-2097. 2009b.

BAER, B.; MAILE, R.; SCHMID-HEMPEL, P.; MORGAN, E.D. & JONES, G.R. **Chemistry of a mating plug in bumblebees**. *Journal Chemical Ecology*, 26: 1869-1875. 2000.

BAMBURG, J.R. **Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin**

- dynamics**. Annual Review Cell Developmental Biology, 15: 185-230. 1999.
- BELL, S.P.; DUTTA, A. **DNA replication in eukaryotic cells**. Annual Review Biochemistry, 71: 333–74. 2002.
- BOER, S.P.; BOOMSMA, J.J.; BAER, B. **Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage**. Journal Insect Physiology, 55: 538-543. 2009.
- BOOMSMA, J., BAER, B., HEINZE, J., **The evolution of male traits in social insects**. Annual Review Entomology, 50: 395-420. 2005.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, 72: 248-254. 1976.
- BRANDÃO, C.R.F. & MAYHÉ-NUNES, A.J. **A new fungus-growing ant genus, *mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (hymenoptera: Formicidae)**. Sociobiology. 38: 639-665. 2001.
- BRAUN, R.J.; KINKL, N.; BEER, M.; UEFFING, M. **Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389: 1033-1045. 2007.
- BROWN, C.S.; NESTLER, C. **Catecholamines and indolalkylamines**. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry pharmacology. Vol 11 (Kerkut, G.A, Gilbert, L.I, Eds.). p 436 – 497. Oxford: Pergamon. 1985.
- CAETANO, F.H.; JAFF, K.; ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. 42 p. Rio Claro, 2002.
- CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; JUSTI JR.; J.; BERGMAN, E.C.; ZORZENON, F.J.; NETTO, S.M.R. **Formigas urbanas**. Boletim Técnico do Instituto Biológico, São Paulo, nº 08. 20p. 1997.

- CARLIER, M. F.; RESSAD, F.; PANTALONI, D. **Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin.** Journal Biological Chemistry, 274: 33827-33830. 1999.
- CATERINO, M.S.; CHO, S.; SPERLING, F.A. **The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel.** Annual Review Entomology, 45: 1-54. 2000.
- CHAN, Q.W.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. **Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph.** Molecular Cellular Proteomics, 5: 2252-2262. 2006.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function.** 4th edn. Cambridge Univ. Cambridge. 1998.
- CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA M.; COSTA, C. M.; PIRES, D.L.; FERNANDES. E.S.; BUSSACOS, A.C.; SOUSA, MV.; O. RICART, C.A.; SHEVCHENKO, A.; TEIXEIRA, T.R.L. **The saliva proteome of the blood-feeding insect triatoma infestans is rich in platelet-aggregation inhibitors.** International Journal Mass Spectrometry, 68:. 265-276. 2007.
- CHEN, S.X.; HARMON, A.O. **Advances in plant proteomics.** Proteomics, Weinheim, 6: 5504 – 5516. 2006.
- CHUNG, H.; SZTAL, T.; PASRICHA, S.; SRIDHAR, M.; BATTERHAM, P.; DABORN, P.J. **Characterization of Drosophila melanogaster cytochrome P450 genes.** Proceedings National Academy Sciences, 106, 5731-5736. 2009.
- CIVELLI, O.; BUNZOW, J.R.; AND GRANDY, D.K. **Molecular diversity the dopamine receptors.** Annual Review Pharmacology Toxicology, 33: 281-307. 1993.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R.M.; BISWAS, S.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J.G. **A Deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee.** Insect Molecular Biology. 15: 615–636. 2006.

- COLLINS, A.M.; CAPERNA, T. J.; WILLIAMS, V.; GARRETT, W.M.; J. D. EVANS. **Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating.** *Insect Molecular Biology*, 15: 541-549. 2006.
- COLLINS, A.M.; WILLIAMS, V.; EVANS, J.D. **Sperm storage and antioxidant enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*.** *Insect Molecular Biology*, 13(2):141-6. 2004.
- CONDEELIS, J. **Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton.** *Trends Biochemical Sciences*, 20: 169-170. 1995.
- CULLMANN, G.; FIEN, K.; KOBAYASHI, R. & STILLMAN, B. **Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*,** *Molecular Cell Biology*, 15: Sept. 1995, p. 4661–4671. 1995.
- CUNHA, M.A.S.; & CRUZ-LANDIM, C. **Modificações histológicas e Histoquímicas do corpo gorduroso de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Himenoptera, Formicidae) durante o primeiro ciclo reprodutivo.** *Acta Biológica Paranaense Curitiba*, 12: 11-22. 1983.
- DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry.** Hoboken Wiley-interscience. 2007.
- DE SOUZA, B.M.; MARQUES, M.R.; TOMAZELA, D.M.; EBERLIN, M.N.; MENDES, M.A.; Palma, M.S. **Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 18: 1095-1102. 2004.
- DELLA LUCIA, T.M.C. E SOUZA, D.J. Importância e história de vida das formigas-Cortadeiras. In: Terezinha Maria Castro Della Lúcia (Ed.). **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao manejo.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. p. 14-23.
- DELLA LUCIA, T.M.C., BENTO, J.M.S. Voo nupcial ou revoada. In: Della Lucia T.M.C. (Ed.). **As Formigas-Cortadeiras.** Viçosa, MG: Folha de viçosa, 1993. p. 54-59.

- DELLA LUCIA, T.M.C.; MOREIRA, D.D.O. **As formigas cortadeiras**. Viçosa, Folha de Viçosa, 262p. 1993.
- DI CIERO, L.; BELLATO, C.M. **PROTEOMA: Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas**. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*. 29: 158-164. 2003.
- DIAS, L.L.C.; FLOH, E.I.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. **Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas**. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 13: 2002-2008. 2000.
- DUTT, M. J.; LEE, K. H. **Proteomic analysis**. *Current Opinion Biotechnology*, 11: 176-179. 2000.
- DUTTA, A.; & BELL, S.P. **Initiation of DNA replication in eukaryotic cells**. *Annual Reviews Cell and Developmental Biology*, Biol. 13: 293. 1997.
- EJIRI, S. **Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization**. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 66: 1-21. 2002.
- EVANS, P.D. **Biogenic amines in the insect nervous system**. *Advance Insect Physiology*, 15: 317- 473. 1980.
- FEANY, M.B.; BENDER, W.W. **A Drosophila model of Parkinson's disease**. *Nature*, 404: 394-398. 2000.
- FRIGGI-GRELIN, F.; COULOM, H.; MELLER, M.; GOMEZ, D.; HIRSH, J.; BIRMAN, S. **Targeted gene expression in Drosophila dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase**. *Journal Neurobiology*, 54: 618-627. 2003.
- GE, L. Q.; CHENG, Y.; WU, J. C.; JAHN G C. **Proteomic Analysis of Insecticide Triazophos-Induced Mating-Responsive Proteins of Nilaparvata lugens Stal (Hemiptera: Delphacidae)**. *Journal of Proteome Research*, 10: 4597- 4612. 2011.

- GOBIN, B.; ITO, F.; PEETERS, C.; BILLEN, J. **Queen-worker differences in spermatheca reservoir of phylogenetically basal ants.** Cell Tissue Research, 326: 69-178. 2006.
- GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L.R. **Perspectives For Mass Spectrometry And Functional Proteomics.** Mass Spectrometry Reviews. 20: 1-57. 2001.
- GONG, L.; YEH, E.T. **Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway,** Journal Biological Chemistry, Vol., 274, n° 17, pp. 12036 –12042, 1999.
- GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.** Proteomics, 4: 3665-85. 2004.
- GOTOH, A.; BILLEN, J.; HASHIM, R.; ITO, F. **Comparison of spermatheca morphology between reproductive and non-reproductive females in social wasps.** Arthropod Structure Development, 37: 199-209. 2008.
- GRANGER, N.A.; EBERSOHL, R.; SPARKS, T.C.; **Pharmacological characterization of dopamine receptors in the corpus allatum of Manduca sexta larvae.** Insect Biochemistry Molecular Biology, 30: 755-766. 2000.
- GRANGER, N.A.; STURGIS, S.L.; EBERSOHL, R.; GENG, C.; SPARKS, T.C. **Dopaminergic control of corpora allata activity in the larval tobacco hornworm Manduca sexta.** Archives Insect Biochemistry Physiology, 32: 449-466. 1996.
- GREEN, A.M.; ADAMS, R.M.M.; MUELLER, U.G. **Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants.** Molecular Ecology, 11: 191-195, 2002.
- GRODNER, M.L.; STEFFANS, W. **Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the female boll weevil.** Transactions American Microscopical Society, 97: 116-20. 1978.
- GROSS, J.H. **Mass spectrometry.** Springer, 2004 - 518 páginas.

- HARTWELL, L.H. **Three additional genes re-quired for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal Bacteriology* 115: 966–74. 1973.
- HERMAN, I.M. **Actin Isoforms**. *Current Biology*, 5: 48–55. 1993.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: The Belknap Press of Harward University Press, 1990.
- JACKSON, D.M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. **Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry, and behavioral aspects**. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, 64:2 91-369. 1994.
- KALUME, D.E.; OKULATE, M.; ZHONG, J.; REDDY, R.; SURESH, S.; DESHPANDE, N.; KUMAR, N.; PANDEY, A. **A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito**. *Proteomics*, 5: 3765-3777. 2005.
- KELLER, L. **Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites**. *Insectes Sociaux*, 45: 235-246. 1998.
- KLENK, M.; KOENIGER, G.; KOENIGER, N.; FASOLD, H. **Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera***. *Apidologie*, 35: 371-381. 2004.
- KLOSE, J. **Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals**. *Human genetik*, 26: 231-43. 1975.
- KURZ, T.; PINTARD, L.; WILLIS, J.H.; HAMILL, D.R.; PIERRE, G. MATTHIAS, P.; BOWERMAN, B. **Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway**. *Science*, 295: 1294-1298. 2002.
- LEE, S.H.; KWONG, A.D.; PAN, Z.Q.; HURWITZ, J. **Studies on the activator 1 protein complex, anaccessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase** . *Journal Biological Chemistry*, 266: 594-602. 1991.
- LÓPEZ, J.L. **Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis**.

Journal Chromatography B, 849: 190E202, 2007.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. **Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry**. Annual Review Biochemistry, Palo Alto, 70: 437-473, 2001.

MANSUY, D. **The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450**. Comparative Biochemistry Physiology - Part C, 121:5 – 14. 1998.

MARICONI, F.A.M. **As Saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.

MARTINS, G. F.; SERRÃO J. E. **A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera; Apoidea)**. Sociobiology, 40: 711-720. 2002.

MARTINS, G. F.; SERRÃO J.; FURIERI K. S. **Notes on the spermatheca of Vespidae and Sphecidae (Hymenoptera)**. Sociobiology, 45: 119-127. 2005.

MARTINS, G.F.; ZANÚNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. **Spermatheca morphology of the social wasp *Polistes erythrocephalus***. Bulletin Insectology, 2008.

MITCHELL, A.; CHO, S.; REGIER, J.C.; MITTER, C.; POOLE, R.W.; MATHEWS, M. **Phylogenetic utility of elongation factor-1a in Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution**. Molecular Biology Evolution, 14: 381-390. 1997.

MOSSI, R.; E HÜBSCHER, U. **Clamping down on clamps and clamp loaders - The eukaryotic replication factor C**. European Journal Biochemistry, 254: 209-216. 1998.

MOSSI, R.; JO'NSSON, Z.O.; ALLEN, B.L.; HARDIN, S.H.; & HÜBSCHER, U. **Replication factor C interacts with the C-terminal side of proliferating cell nuclear antigen**. Journal Biological Chemistry, 272, 1769- 1776. 1997.

MOUNIER, M.; PRUDHOMME, J.C. **Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *bombyx mori***. Insect Biochemistry, 21: 523-533. 1991.

MOUTINHO, P.R.S.; NESPTAD, D.C.; ARAUJO, K.; CHISTOPHER, U. **Formigas e Florestas: estudo para a recuperação de áreas de pastagem.** Ciencia Hoje, 15: 59-60. 1993.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. **The origin of the attine ant-fungus symbiosis.** Quarterly Review Biology, New York, 76: 169-197. 2001.

MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.M.; MALLOCH, D. **The origin of the Attini ant-fungus mutualism.** Quaterly Review Biology, 76:169-197. 2001.

NECKAMEYER, W.S. **Dopamine modulates female sexual receptivity in Drosophila melanogaster.** Journal Neurogenetics, 12: 101-114. 1998.

NECKAMEYER, W.S. **Multiple roles for dopamine in Drosophila development.** Developmental Biology, 176: 209-219. 1996.

NELSON, D. L. E COX, M.M. **Leninger princípios de bioquímica.** São Paulo, Sarvier. 2002.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** Electrophoresis, 9: 255-262, 1988.

O'FARRELL, P. H. **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** Journal Biological Chemistry, 250: 4007-4021. 1975.

ORSCELK, O.; AKPINAR, M.A.; GORGUN, S. **Partial Purification of Total Body Lipase from Gryllus campestris L. (Orthoptera: Gryllidae).** Fen Bilimleri Dergisi. 27: 1-10. 2007.

PAN, Z.Q.; KENTSIS, A.; DIAS, D.C.; YAMOA, K.; WU, K. **Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction.** Oncogene, 23: 1985-1997. 2004.

- PANDEY, A. & MANN, M. **Proteomics to study genes and genomes.** Nature, 405, 837-846 (15 June 2000)
- PEIREN, N.; GRAAF, D.C.; VANROBAEYS, F.; DANNEELS, E. L.; DEVREESE, B.; BEEUMEN, J.V.; JACOBS, F.J. **Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage.** Toxicon, 52: 72–83. 2008.
- RISON, S.C.G.; HODGMAN, T.C.; THORNTON, J.M. **“Comparison of functional annotation schemes for genomes.”** Functional Integrative Genomics, 1: 5-69. 2000.
- ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas.** Comunicado Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 136: 1-12. 2005.
- SCHOETERS E BILLEN J. **The importance of the spermathecal duct in bumble bees.** Journal Insect Physiology, 46: 1303-12. 2000.
- SEEHUUS, S.C.; NORBERG, K.; GIMSA, U.; KREKLING, T.; AMDAM, G.V. **Reproductive protein protects sterile honeybee workers from oxidative stress.** Proceedings National Academy Sciences, USA, 103: 962-967. 2006.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes.** Nature Protocols, doi:10.1038/nprot.2006.468. 2007.
- SIBLEY, D.R.; AND MONSMA, F.J. JR. **The molecular biology of dopamine receptors.** Trends Pharmacological Sciences, 13: 61-69. 1992.
- SILVA-PINHATI, A.C.O.; BACCI JR. M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. **Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae).** Brazilian Journal Medical Biology Research, 37: 1463-1470. 2004

SIROT, L. K.; POULSONB, R. L.; MCKENNAB, M. C.; GIRNARYB, H.; WOLFNER, M. F.; HARRINGTONB, L. C. **Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: Potential tools for control of female feeding and reproduction.** Insect Biochemistry Molecular Biology 38: 176-189. 2007.

SIROT, L.K.; HARDSTONE, M.C.; HELINSKI, M.E.H.; RIBEIRO, J.M.C.; KIMURA, M ET AL. **Towards a Semen Proteome of the Dengue Vector Mosquito: Protein Identification and Potential Functions** . PLoS Neglected Tropical Diseases, 5(3): e989. doi:10.1371/journal.pntd.0000989 – 2011.

SLOBIN, L.I. **The role of eucaryotic factor Tu in protein synthesis. The measurement of the elongation factor Tu content of rabbit reticulocytes and other mammalian cells by a sensitive radioimmunoassay.** European Journal Biochemistry, 110: 555-563. 1980.

SOUZA, D.J.; SANTOS, J.F.L.; DELLA LUCIA, T.M.C. Organização Social das Formigas-Cortadeiras. In: Terezinha Maria Castro Della Lúcia (Ed.). **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao manejo.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. p. 127-137.

SPIETH, J., NETTLETON, M., ZUCKER-APRISON, E., LEA, K. AND BLUMENTHAL, T. Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates. Journal Molecular Evolution, 32: 429-438. 1991.

STRODE, C.; WONDJI, C.S.; DAVID, J.P.; HAWKES, N.J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D.R.; DRANE, D.R.; KARUNARATNE, S.H.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W.C. **Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *aedes aegypti*.** Insect Biochemistry Molecular Biology, 38: 113-123. 2008.

TADBOWSKI, J.M.; JONES, J.C. **Changes in fat body and oocytes during starvation and vitellogenesis in mosquito, *Aedes aegypti* (L).** Journal Morphology, 179:185-264. 1979.

TEIXEIRA, M.C. 2007 **Dispersão de sementes por *Atta robusta* Borgmeier 1939**

(Hymenoptera: Formicidae) nas restingas da Ilha de Guriri-ES. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. 72p

TSURIMOTO, T.; STILLMAN, B. **Functions of replication factor C and proliferating cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage.** T4. Proceedings National Academi Science, 1990.

VILLAVASO, E.J. **The role of the spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*.** Journal Insect Physiolog, 21:1457-1462. 1975.

VO, T.; MUELLER, U.G.; MIKHEYEV, A.S. **Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae).** Micologia, 101: 206-210. 2009.

WAGNER, C.R; MAHOWALD, A.P.; MILLER, K.G. **One of the two cytoplasmic actin isoforms in *Drosophila* is essential.** Cell Biology, 11: 8037-8042. 2002.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CEROA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I. **Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*.** Electrophoresis, 16: 1090-1094. 1995.

WEBER, N.A. **Gardening ants: the attines.** American Philosophical Society 1972. 146p.

WESTERMEIER, R.; E NAVEN, T. **Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analyses** - Wheinhein, ed. Wiley-VCH. 2002.

WHEELER, D.; KRUTZSCH, P. **Ultrastructure of the spermatheca and its associated gland in the ant *Crematogaster opuntiae* (Hymenoptera: Formicidae).** Zoomorphology, 114: 203-12. 1994.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. **From proteins to**

proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, 14: 61-65. 1996.

YELLMAN, C.; TAO, H.; HE, B.; HIRSH, J. **Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*.** *Proceedings National Academi Science USA*, 94: 4131-4136. 1997.

ZIBAE, A.; BANDANI, A.R.; RAMZI, S. **Lipase and invertase activities in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae), rice striped stem borer.** *Invertebrate survival*, 5: 180-189. 2008.

ZOUARI, N.; MILED, N.; CHERIF, S.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. **Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: the scorpion.** *Biochimica Biophysica Acta-general subjects*; 1726: 67-74. 2005.