



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

UnB

Departamento de Biologia Celular

Neuroproteômica: proteínas relacionadas à aprendizagem em abelhas e ratos

Jaques Miranda Ferreira de Souza

Orientador: Marcelo Valle de Sousa

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Defesa de Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Brasília, fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a colaboração da Prof^a. Dr^a. Deisy das Graças de Souza, do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (Departamento de Psicologia), UFSCar, e dos alunos Tatiana Amorim e Msc Antônio Maurício Moreno, nos experimentos de treinamentos de abelhas. As meninas da PQP, Eva, Mainá, Rejane, Juliana e Patrícia, por terem me acolhido em sua casa durante os períodos em que estive em São Carlos. E também a Prof^a. Dr^a. Elenice Seixas Hanna, Departamento de Processos Psicológicos Básicos, UnB, pelo suporte na parte de análise dos dados de treinamentos de abelhas.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont, do Laboratório de Bioquímica (Departamento de Química), UFRJ, pela colaboração durante os experimentos de análise de proteínas por LC-MS/MS.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Dr^a. Consuelo Medeiros R. Lima, Dr^a. Mariana S. Castro, Prof^a. Dr^a. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, Dr. Carlos André Ornelas Ricart, Dr. Wagner Fontes, Dr. Magno Junqueira, Dr. Sebastien Olivier Charneau, Dr. Pedro Zanotta, pelas suas amizades, colaborações, por sempre se mostrarem solícitos e se empenharem em nos transmitir ensinamentos.

Aos amigos de laboratório, Dr^a. Liudy Garcia Hernández, Dr. Gabriel Costa Nunes da Cruz, Dr. Rafael A. P. Guércio, MSc. Diana Paola Gomes, MSc. Adelson Joel da Silva, MSc. Elaine Nascimento Aquino, MSc. Anne Caroline D. Neves, pelos ensinamentos transmitidos de como desenvolver os experimentos no laboratório. Ao meu grande amigo Humberto Gonckzarowska Jorge por sempre está disposto a ajudar inclusive nos experimentos de fim de semana. Também a Siliana Martins Morais, Juliana Mayumi Hosoume, Marcos Vínicius, Rayner Myr L. Queiroz, César Augusto Prías, Alan R. Mól, Alessandra Santos Pellegrini, Micaella Pereira Fonseca, Ana Caroline T. Pinto, Pedro Alves Martins, Mara Machado, pela disposição em ajudar e pelos vários momentos de descontração.

Aos técnicos Antônio Rufino e Nuno Manuel por todo o suporte em vários momentos.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento da minha bolsa e a FINEP pelo apoio em infraestrutura do laboratório.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, por ter me aceitado como seu orientando, por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos, além da sua paciência e confiança depositadas em minha pessoa.

Principalmente a minha família, meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

RESUMO

Aprendizagem associativa pode ocorrer por condicionamento operante, através do qual o animal consegue antecipar eventos futuros baseado em suas experiências como consequências de seus próprios comportamentos. Trata-se de uma forma de aprendizagem que o homem compartilha com outros animais, incluindo invertebrados. O uso de ratos e abelhas como modelos biológicos em estudos comportamentais tem ajudado na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na aprendizagem por condicionamento operante. O objetivo desse trabalho foi identificar proteínas envolvidas no processo de aprendizagem por meio de análises proteômicas cerebrais de abelha mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e rato (*Rattus norvegicus*). Neste trabalho, foram padronizadas condições para separação de extratos cerebrais de abelhas por meio de eletroforese bidimensional (2DE). Os perfis que apresentaram melhor resolução de *spots* proteicos foram obtidos com as seguintes condições: concentração de anfólitos a 1,5 %, CHAPS a 1 % e reposição de DTT no cátodo durante a isoeletrofocalização. Proteomas cerebrais de abelhas treinadas por condicionamento operante e controles foram comparados através de DIGE, mas nenhuma diferença de expressão proteica foi observada até o momento. Em relação a ratos, o primeiro mapeamento em grande escala por LC-MS/MS de proteomas de córtex pré-frontal de rato foi realizado, até onde sabemos. Foi possível identificar 923 proteínas, valor seis vezes maior quando comparado a outros estudos presentes na literatura. As proteínas identificadas foram categorizadas de acordo com sua localização e função biológica. A localização subcelular assim se dá: 21 % citosol, 18 % membrana plasmática, 13 % mitocôndrias, 10 % núcleo, 8% citoesqueleto, 6 % complexo de Golgi ou retículo endoplasmático, 3 % proteínas extracelulares, 3 % outras organelas e 18 % de proteínas intracelulares. Entre as proteínas identificadas no córtex pré-frontal podemos destacar quatro delas como sendo descritas com envolvimento em processos de aprendizagem : *contactin-2*, *calbindin*, subunidade gamma da proteína quinase c (PKCgamma) e gp78.

Palavras-chave: *Melipona quadrifasciata*, córtex pré-frontal, condicionamento operante, aprendizagem, ratos.

ABSTRACT

Associative learning can occur by operant conditioning, when the animal can anticipate future events based on his experiences as a consequence of their own behaviour. That is a form of learning that humans share with others animals, including invertebrates. The use of rats and bees as biological models in behavioural studies have helped in understanding the molecular mechanisms involved in learning by operant conditioning. The aim of this study was to identify proteins related to the learning process through proteomic analysis of brains from “mandaçãia” bee (*Melipona quadrifasciata*) and rat (*Rattus norvegicus*). In this study, conditions for separation of bee brain extracts by two-dimensional electrophoresis (2DE) were optimized. The profiles showing better protein spots resolution were obtained with the following conditions: 1.5% ampholytes concentration, 1% CHAPS and DTT replacement in the cathode during isoelectric focusing. Brain proteomes of bees trained by operant conditioning and control groups were compared by DIGE, but no difference in protein expression was observed so far. For rats, the first large-scale LC-MS/MS mapping of prefrontal cortex proteomes was achieved to our knowledge. A total of 923 proteins was identified, a value six times higher than other studies in the literature. The identified proteins were categorized according to their location and biological function. The subcellular localizations were 21% cytosol, 18% plasma membrane, 13% mitochondria, 10% nucleus, 8% cytoskeleton, 6% endoplasmic reticulum and Golgi complex, 3% extracellular proteins, 3% other organelles and 18% other intracellular proteins. Among the proteins identified in the prefrontal cortex, four of them can be highlighted as they are described in the literature as involved in learning processes: 2-contactin, calbindin, gamma subunit of protein kinase c (PKC γ) and gp78.

Key words: *Melipona quadrifasciata*, pre-frontal cortex, operant conditioning, learning, rat.

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	2
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Neuroproteômica	12
1.2 Aprendizagem e memória	13
1.3 Condicionamento operante	14
1.4 Abelhas	16
1.4.1 Meliponas	19
1.4.2 Visão de abelhas	20
1.5 Ratos	21
1.5.1 Hipocampo	22
1.5.2 Córtex pré-frontal	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Etapas de realização.....	27
3.2.1 Primeira vertente.....	27
3.2.2 Segunda vertente.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Treinamentos de abelhas.....	28
4.1.1 Modelagem do pouso sobre o aparelho e a resposta de sugar no bebedouro	29
4.2 Extrações de cérebros e quantificação de proteínas.....	31
4.2.1 Extração de cérebros de abelhas	31
4.2.2 Extrações de encéfalos de ratos e quantificação de proteínas	31
4.3 Eletroforese.....	32
4.3.1 Eletroforese bidimensional (2DE).....	32
4.3.2 Fluorescência diferencial em gel bidimensional (2DE DIGE).....	32
4.4 Digestão <i>in situ</i>	34
4.5 Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)	35
4.6 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC MS/MS).....	36
4.6.1 Digestão trípica em solução	36
4.6.2 Focalização isoeletrica de peptídeos.....	36
4.6.3 Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS)	37
4.7 Fluxograma experimentos DIGE	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Primeira vertente.....	41
5.1.1 Dados quantitativos dos treinamentos	41
5.1.2 Padronização de géis 2DE	43
5.1.3 Fluorescência diferencial em gel bidimensional (2DE DIGE).....	44
5.2 Segunda vertente.....	48
5.2.1 Levantamento de proteínas totais de córtex pré-frontal de rato	48

6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	57
8	PESPECTIVAS	58
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Equipamento de treinamento discriminativo com barras.....	29
Figura 2: Equipamento de treinamento discriminativo sem barras.....	29
Figura 3: Padronização de 2DE de extratos proteicos cerebrais de abelhas <i>Melipona quadrifasciata</i>	44
Figura 4: Perfil 2DE DIGE de proteínas cerebrais da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i>	45
Figura 5: Perfil 2DE de proteínas cerebrais da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i>	46
Figura 5: Perfil 2DE DIGE de proteínas cerebrais da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i>	47
Figura 7: Localização de proteínas de córtex pré-frontal de ratos identificadas por LC-MS/MS	49
Figura 8: Categorização de proteínas de córtex pré-frontal de ratos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de respostas certas no treinamento em equipamento sem barra em blocos com 10 tentativas cada	41
Tabela 2. Frequência de respostas certas no treinamento em equipamento de pressão de barra em blocos com 10 tentativas cada	42
Tabela 3: Lista de proteínas de córtex pré-frontal identificadas por LC-MS/MS.....	Anexo 1
Tabela 4: Proteínas identificadas por LC-MS/MS oriundas de córtex pré-frontal de rato envolvidas com aprendizagem e memória.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE – eletroforese bidimensional

AA's – aminoácidos

ACN – Acetonitrilia

BDNF – “Brain-derived neurotrophic fator”

BLAST – “basic local alignment search tool”

CamKII – “calmodulin-dependent protein kinase II”

CBB – “Coomassie Brilliant Blue”

CREB – “cAMP response element-binding”

DNA – Ácido desossiribunucleico

DTT – ditioneitol

EVA – copolímero de etileno e acetato de vinila

CHCA – “ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid”

HEPES – “4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid”

IPG – gradiente de pH imobilizado

iTRAQ – “Isobaric tags for relative and absolute quantification”

MH⁺ – molécula protonada

m/z – razão massa/carga

MALDI – “matrix-assisted laser desorption/ionization”

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MS – espectrometria de massa

MS/MS – espectrometria de massa em tandem

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

pI – ponto isoelétrico

PMF – “peptide mass fingerprinting”

ppm – partes por milhão

PTM – modificação pós-traducional (“posttranslational modification”)

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato)

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TCA – ácido tricloroacético

TFA – ácido trifluoroacético

TOF – “time of flight”

Tris – Tris (hidroximetil) aminoetano

v/v – relação volume/volume

w/v – relação peso/volume

1 Introdução

1.1 Neuroproteômica

O cérebro é muito mais do que uma estrutura anatômica e fisiológica. É um vasto universo desconhecido e complexo. Estudar e entender os mecanismos envolvidos na regulação e funcionamento do cérebro tem sido uma das principais questões que inquietam a humanidade há séculos, constituindo um dos maiores desafios nas pesquisas biológicas. Em decorrência da complexidade de suas intrincadas redes neurais, torna-se necessário esclarecer as bases moleculares de sua fisiologia e atividade elétrica, que podem ser determinadas a partir do entendimento de sua composição celular e bioquímica (Maurya, Sundaram et al., 2010). A caracterização de todos os componentes expressos em cada região cerebral é essencial para o entendimento dos mecanismos de maior complexidade e suas propriedades funcionais (Katagiri, Hatano et al., 2010).

A proteômica, uma área da ciência que estuda o proteoma, conjunto de todas as proteínas expressas e as modificações pós-traducionais presentes em uma amostra biológica (tecido, célula, organelas, vírus) em um determinado tempo (Wilkins, Sanchez et al., 1996). A abordagem proteômica apresenta ferramentas poderosas para a análise da composição de proteínas de uma amostra biológica, incluindo o tecido nervoso cerebral (Bayes e Grant, 2009), além de ser complementar ao enfoque da genômica, que se baseia no estudo do DNA e RNA (Choudhary e Grant, 2004). Suas técnicas robustas têm propiciado o esclarecimento de complexos mecanismos biológicos (Pollak, John et al., 2006).

Uma abordagem proteômica clássica consiste na separação das proteínas e obtenção do perfil eletroforético de uma determinada amostra biológica, por meio de eletroforese bidimensional (2DE), seguida pela determinação da relação carga/massas dos peptídeos resultantes de clivagens enzimáticas das proteínas, e, por fim, o uso de ferramentas de bioinformática para a identificação de proteínas utilizando bancos de dados (Chen, Ji et al., 2003). Uma alternativa a essa estratégia, que pode ser empregada nas análises proteômicas, é o fracionamento de proteínas e peptídeos por meio de cromatografia líquida (LC) (Shevchenko, Valcu *et al.*, 2009). Esta técnica pode possuir uma interface direta com um

espectrômetro de massas (LC-MS ou LC-MS/MS), diante disso tem possibilitado a análise de massas com equipamentos de alta sensibilidade (Choudhary e Grant, 2004).

A neuroproteômica desenvolveu-se como uma subárea importante da ciência, possibilitando a identificação e a caracterização de proteínas relacionadas a tais mecanismos no sistema nervoso central. Ela vem sendo aplicada em análises globais do cérebro como também de regiões específicas, resultando na determinação do padrão de expressão geral de proteínas de várias regiões cerebrais em diferentes situações (Pienaar, Daniels *et al.*, 2008; Bayes e Grant, 2009; Garcia, Saraiva Garcia *et al.*, 2009; Zhang, Liu *et al.*, 2009; Maurya, Sundaram *et al.*, 2010). Contudo, a obtenção do proteoma completo de cada região do cérebro ainda requer muito trabalho.

No contexto da neuroproteômica, também vem sendo investigada a constituição proteica de sinapses e vesículas sinápticas, que são dinamicamente reguladas e fundamentais para a neuroplasticidade, importantes na aprendizagem, assim como na formação de memórias (Li, Klemmer *et al.*, 2010). A ação coordenada de proteínas sinalizadoras constitui uma rede de eventos complexos de grande diversidade molecular que exerce um controle sobre o desenvolvimento e funcionamento cerebral (Kandel, Schwartz *et al.*, 2000; Hernandez e Abel, 2008).

1.2 Aprendizagem e memória

Segundo Parvez e colaboradores (2006), a aprendizagem é o processo de aquisição de novas informações, enquanto a memória alude à persistência da aprendizagem em um estado que ela pode ser acessada após determinado tempo. A memória é descrita por muitos pesquisadores como adaptação comportamental e armazenamento de informações, os quais resultam de experiências vividas pelo indivíduo. Uma das principais funções do cérebro é a formação de memórias, processo de extrema importância, visto que elas ajudam um organismo a se adaptar e responder de forma mais eficiente a eventos similares que possam ocorrer no futuro (Reul, Hesketh *et al.*, 2009). Existem diferentes estágios para memória: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição da memória refere-se à aprendizagem, a codificação de uma informação após uma experiência. A evocação de uma memória, também definida como recuperação, pode ser resumida a uma lembrança de uma experiência que pode ser mensurada por intermédio de uma adaptação comportamental. Entre a aquisição e a evocação de memórias está a consolidação da memória. A consolidação da memória é a fase de estabelecimento da memória de longa duração, podendo ocorrer em dias, semanas ou anos

após sua aquisição (Estevez e Abel, 2011). Existem vários relatos na literatura sugerindo que a consolidação da memória está ligada a síntese de novo de proteínas e alguma modificações pós-traducionais em algumas estruturas cerebrais (Kang e Schuman, 1996; Lu e Gottschalk, 2000; Mcgaugh, 2000; Kandel, 2001; Wiersma-Meems, Van Minnen et al., 2005; Hernandez e Abel, 2008; Klann e Sweatt, 2008; Paul E, 2008; Qi e Gold, 2009). Contudo, muito pouco se sabe sobre as proteínas neossintetizadas e as modificações pós-traducionais envolvidas em tais processos.

De acordo com Rudy (2008), existem duas abordagens para o estudo de eventos relacionados à aprendizagem e memória: a abordagem psicológica e a neurobiológica. A primeira baseia-se em um conjunto de princípios empíricos que buscam descrever como uma variação na experiência influencia um comportamento. A abordagem neurobiológica procura elucidar quais são as modificações fisiológicas, bioquímicas e moleculares por trás desses eventos. Para tanto, utiliza vários métodos para determinar quais regiões do cérebro compõem o sistema de suporte de memórias, como as sinapses são alteradas pela experiência e modificam moléculas em neurônios que, em última análise, suportam a memória (Rudy, 2008).

1.3 Condicionamento operante

O condicionamento operante ou condicionamento instrumental, termo cunhado por Skinner (1938), é uma forma de aprendizagem associativa na qual o animal aprende a associar um comportamento às suas consequências. O condicionamento operante se distingue do condicionamento clássico ou Pavloviano já que nesse último o indivíduo associa um estímulo neutro a um estímulo subsequente e mais saliente (Lorenzetti, Baxter et al., 2008), como por exemplo, quando um cão associa um som (estímulo neutro) a um subsequente recebimento de alimento sem precisar realizar nenhuma tarefa para receber a recompensa. O condicionamento operante é baseado na probabilidade de ocorrência futura de um comportamento, denominado resposta, quando ela é seguida de um reforço, normalmente alimento ou bebida. Essa probabilidade de ocorrência pode ser aumentada, por meio de reforçadores, ou pode ser diminuída quando empregadas punições.

Os elementos reforçadores podem ser agrupados em duas classes: reforçadores positivos (S^+) e reforçadores negativos (S^-). Os reforçadores positivos normalmente causam um estado de satisfação do sujeito, com recompensas que podem ser desde alimentos a bebida. Os reforçadores negativos são associados a uma interrupção ou retardo do estímulo

em virtude de uma resposta. A punição é um estímulo aversivo fornecido após uma resposta, que tem como resultado no enfraquecimento ou a extinção da mesma (Brandão, 2004).

O processo evolutivo atua sobre as populações moldando suas formas corporais e respostas comportamentais dos indivíduos no decorrer de várias gerações (Brembs, 2009). No entanto, muitos mecanismos adaptativos básicos que obtiveram sucesso são privilegiados e mantidos ao longo da filogênese e da crescente complexidade de comportamentos das espécies, permitindo assim, a formação de uma base comum para alguns eventos. Dentre os mecanismos adaptativos básicos pode se citar o condicionamento operante que, segundo Skinner (1938), é um esquema de reforço universal. Outrossim, independentemente dos organismos, o efeito de determinada programação de reforço é quase o mesmo. De acordo com Brembs (Brembs, 2003), as formas de aprendizagem associativa são uma simples forma de aprendizagem que os seres humanos compartilham com a maioria dos outros animais, incluindo invertebrados.

O condicionamento operante tem sido amplamente investigado em vários modelos animais, tanto em invertebrados (aplísia, moscas, abelhas) quanto em vertebrados (ratos) (Botzer, Markovich et al., 1998; Chen, Chen et al., 2011). Ainda assim pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessa forma de aprendizagem (Lorenzetti, Baxter et al., 2008).

Todavia alguns progressos vêm sendo galgados em estudos de condicionamento operante apetitivo em roedores (Smith-Roe e Kelley, 2000; Baldwin, Sadeghian et al., 2002; Takahashi, Yokota et al., 2011). Porém não há uma completa elucidação das vias de sinalização, nem como essas cascatas de sinalização medeiam à convergência entre o comportamento e a recompensa (Lorenzetti, Baxter et al., 2008).

Devido à alta complexidade dos cérebros dos vertebrados, nos quais os estímulos são processados e interligados em várias etapas hierárquicas, torna-se difícil o discernimento dos circuitos responsáveis pela produção de um comportamento e os mecanismos moleculares envolvidos. Em contrapartida insetos são bons modelos para experimentos neuroetológicos. Seu sistema nervoso central é relativamente pequeno e contém muitas células individualmente identificáveis e grandes o suficiente para serem monitoradas no meio intracelular durante o curso de certos comportamentos, incluindo a aprendizagem (Menzel, Hammer, Muller et al., 1996).

Inúmeros experimentos vêm sendo realizados usando várias espécies de insetos, incluído abelhas, como modelo de estudo da relação entre mudanças ambientais e plasticidade cerebral em um contexto etológico natural (Maleszka, Barron et al., 2009). Mesmo com um cérebro muito pequeno, com volume de aproximadamente 1 mm³ e pouco mais de 960000 neurônios (Menzel, Hammer, Müller et al., 1996), abelhas são bons modelos de estudo, visto que possuem vastos repertórios comportamentais como, por exemplo, formação de estruturas sociais, orientação no espaço e no tempo, elaborado sistema de comunicação visual, química, mecânica e uma complexa rotina motora para voar, construir ninhos, defesa e ataque, habilidade para aprender cores, formas, fragrâncias e rotas de navegações rápidas e precisas (Zhang, Bock *et al.*, 2005; Menzel e Giurfa, 2006; Srinivasan, 2010).

Experiências provocam mudanças nas estruturas cerebrais e acredita-se que esse processo é uma parte importante no armazenamento de memórias (Kolb, Forgie et al., 1998; Kim e Diamond, 2002). Atualmente é sugerido que a síntese de proteínas é necessária para a consolidação e armazenamento de memórias (Kandel, 2001; Wang, Hu et al., 2006). Mesmo assim os mecanismos moleculares a nível proteico permanecem incompletos (Patil, Boddul et al., 2011).

1.4 Abelhas

Os insetos eussociais, que formam sociedades complexas, possuem três características básicas: sobreposição de gerações em um mesmo ninho, cuidado cooperativo com a prole, e uma sociedade dividida em castas, na qual há divisão de tarefas. Características estas que algumas abelhas dividem com algumas espécies de formigas, cupins e vespas (Michener, 1969; Wilson e Holldobler, 2005).

Uma característica bem presente em várias espécies de abelhas é a vida em colônia, que apresentam uma hierarquia na divisão de trabalho. As colônias são divididas em três castas: rainha, operárias e zangões. A rainha é, geralmente, uma única fêmea, fator dependente da espécie em estudo, encarregada da reprodução. Operárias podem atingir o número de centenas a milhares de fêmeas responsáveis por inúmeras tarefas dentro e fora da colônia, tais como: forragear, cuidar da prole e proteger a colônia de eventuais predadores. Os zangões podem chegar a algumas centenas de machos, disponíveis para reprodução (Robinson, 2002; Michener, 2007).

As abelhas, bem como outros himenópteros, apresentam um sistema de determinação sexual do tipo haplodiploide, ou seja, o sexo é determinado por um ou poucos alelos sendo a heterozigose para o *locus* gênico determinante para a geração de fêmeas. Os machos geralmente são oriundos do desenvolvimento de ovos não fertilizados, hemizigotos, ou de ovos que apresentam homozigose para o *locus*, neste caso, os machos diploides são geralmente mortos ainda no estágio larval para evitar um prejuízo para a população com o surgimento de uma prole inviável (Beye, Hasselmann et al., 2003; Michener, 2007; Hasselmann, Gempe et al., 2008).

A divisão de trabalho entre as operárias está relacionada à idade dos indivíduos e ao seu estado fisiológico, sendo uma das principais características presentes nas sociedades de insetos (Robinson, 1992). Quando jovens as operárias desenvolvem tarefas dentro do ninho como cuidado com as mais jovens e manutenção da colmeia, sendo assim denominadas nutridoras ou enfermeiras. Conforme elas vão envelhecendo algumas passam a sair da colmeia com o intuito de coletar alimentos e outros substratos para a colônia, sendo, então denominadas forrageiras. As forrageiras podem também desempenhar a função de proteção da colônia contra predadores. Os indivíduos da espécie *Apis mellifera* passam de duas a três semanas de suas vidas adultas atuando dentro da colmeia e o restante, uma a três semanas, como forrageiras (Robinson, 2002).

A divisão de trabalho em uma colônia não é extremamente rígida, uma vez que as abelhas são sensíveis a variações ambientais e, principalmente, ao seu ambiente social. A tarefa de forrageamento, desempenhada pelas operárias, requer um conjunto de habilidades a fim de que ela consiga navegar pelo ambiente e coletar alimento nas fontes florais. Algumas operárias podem fazer a transição precoce de nutridoras para forrageiras em virtude das necessidades da colônia. Também é possível o processo inverso, quando uma forrageira pode voltar a desempenhar o papel de uma abelha nutridora. Esses processos visam a adequação dos indivíduos às necessidades da colônia, de forma que essa obtenha maior sucesso reprodutivo (Robinson, 2002).

As abelhas apresentam várias mudanças fisiológicas e neurais associadas ao envelhecimento, como por exemplo, na atividade de glândulas exócrinas como as glândulas hipofaríngeas, mandibulares e tarsais; nos níveis hormonais, como por exemplo o aumento dos níveis de hormônio juvenil; no peso corporal, nas funções neuroquímicas, na estrutura cerebral, no ritmo circadiano e na expressão diferencial de genes e proteínas associadas a sua maturação comportamental, como por exemplo algumas proteínas pertencentes a família da

MRJPs. (Kucharski, Maleszka et al., 1998; Bloch, Toma et al., 2001; Robinson, 2002; Ben-Shahar, 2005; Robinson, 2009).

Aumentos no volume cerebral de abelhas mostram forte correlação com mudanças comportamentais dependentes da idade (Farris, Robinson et al., 2001; Brembs, 2003; Fahrbach, Farris et al., 2003). Estudos mostram que os corpos cogumelares, estruturas cerebrais, estão associadas à formação de memória olfativa em abelhas e é uma das estruturas que têm seu volume aumentado com a idade (Fahrbach, Farris *et al.*, 2003); (Menzel, Hammer, Müller *et al.*, 1996). Os corpos cogumelares recebem esse nome devido a sua forma anatômica similar a um cogumelo, constituídos pelas células de Kenyon (Fahrbach, 2006). Os corpos cogumelares constituem uma região de integração multissensorial e é importante no processo de aprendizagem, memória e processamento cognitivo (Menzel, 2001; Heisenberg, 2003; Fahrbach, 2006; Maleszka, Barron et al., 2009).

As abelhas desempenham uma função crucial na natureza: a da polinização das flores e conseqüentemente produção de frutos e sementes. Portanto, são vitais para a conservação da flora e fauna desses ecossistemas. As abelhas e o vento são os principais agentes polinizadores do mundo (Michener, 2007). As abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis, conforme o ecossistema, por 40% a 90% da polinização das árvores nativas. As 60% a 10% restantes são polinizadas pelas abelhas solitárias, borboletas, besouros, morcegos, aves, alguns mamíferos, água, vento, e, recentemente, pelas abelhas africanizadas (Kerr et al., 1996).

Um amplo número de meliponíneos tem tido suas populações substancialmente reduzidas. O principal motivo para essa redução é a destruição dos ambientes naturais onde essas populações se localizam. Esses insetos formam um grupo isolado e bem especializado, nos quais os indivíduos dependem das características climáticas e florísticas de suas regiões de origem e também de substratos específicos para sua nidificação (Kerr et al., 1999).

As abelhas sem ferrão são um grupo monofilético encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América, África, Austrália e partes da Ásia (Roubik, 1989). Estas compõem centenas de espécies distribuídas em mais de 36 gêneros pertencentes à tribo Meliponini, subfamília Apinae, família Apidea (Michener, 2007). Abelhas da tribo Apini, que compreende o gênero *Apis*, e as da tribo Meliponini, que compreendem os gêneros *Melipona* e *Trigona*, são os únicos grupos de abelhas altamente eussociais. Embora estas últimas apresentem uma maior diversidade de estilos de vida e formas de recrutamento

podendo utilizar como recursos para suas colmeias lama, resinas, água, pólen, néctar e até mesmo animais mortos (Roubik, 1989; Nieh, Ramírez *et al.*, 2003).

Com a finalidade de sinalizar ou recrutar indivíduos para um local com uma potencial fonte de alimento, as abelhas sem ferrão podem adotar diversas formas de comunicação de recrutamento (Roubik, 1989). Elas podem liberar odores de vários modos, por secreções mandibulares, por meio de glândulas tarsais ao andar por um substrato (Jarau, Hrcir *et al.*, 2004). Em contra partida, todos os estudos com abelhas do gênero Apini apresentaram a dança do abano (*waggle*) para indicar a direção e a distância da fonte de recurso.

1.4.1 Meliponas

O gênero *Melipona* pertencente à Tribo Meliponini, apresenta uma distribuição geográfica exclusivamente neotropical, abrangendo da América do Sul até a América Central e México (Michener, 1990). Neste gênero, encontram-se mais de 40 espécies (Moure e Camargo, 1994). De acordo com Moure e colaboradores (2007) a tribo Meliponini compreende 33 gêneros neotropicais e centenas de espécies. Elas são conhecidas popularmente como abelhas indígenas sem ferrão por possuírem o ferrão atrofiado, o que as torna incapazes de ferocar (Kerr e Lelo, 1962).

Dentre as abelhas eussociais, os Meliponini estão entre os mais diversos em termos de morfologia e comportamento biológico. Possuem colônias divididas em castas bem definidas, as quais incluem a rainha, as operárias e os zangões (Michener, 2007).

Os Meliponini se caracterizam por não construírem células reais, células diferenciadas onde a larva proveniente dará origem a uma abelha rainha. Todas as rainhas, operárias e zangões, nascem e se desenvolvem, até o estágio adulto, dentro de células de cria de igual tamanho (Nogueira-Neto, 1997). Segundo Kerr e colaboradores (1966), a rainha é determinada por uma dupla heterozigose associada a fatores tróficos. Nesse trabalho verificou-se que em condições ótimas, cerca de 25% dos indivíduos diploides que nascem numa colônia normal são rainhas, e os outros 75% são em sua grande maioria operárias ou machos, sendo estes em menor incidência.

O aparecimento de machos diploides, evento não muito frequente, representa uma enorme sobrecarga para a colônia uma vez que pouco contribuem em tarefas de manutenção do ninho. Seu surgimento está associado à endogamia, acasalamento entre indivíduos

aparentados. Em *Melipona quadrifasciata*, os machos diploides são mortos pelas operárias, ainda na fase larval (Camargo, 1979).

Kerr e Esch (1965) em estudos com mandaçaias (*Melipona quadrifasciata*) verificaram que estas apresentam um intrigante mecanismo de recrutamento de outras operárias para uma fonte de alimento. O recrutamento consiste na emissão de pulsos sonoros, dentro da colmeia, juntamente com corridas em zig-zag. A duração dos pulsos emitidos está correlacionada com a distância da fonte de alimento. Foi observado depois, pelo mesmo grupo, que as mandaçaias seguem suas companheiras até uma fonte de alimento visualmente ou pelo odor.

As mandaçaias têm sido utilizadas em pesquisas sobre diferentes formas de aprendizado, sobretudo condicionamento operante, devido à sua fácil manipulação em decorrência da ausência de ferrão (Garcia, 2009). Estudos envolvendo aprendizagem e condicionamentos operantes visual em abelhas desse gênero vêm sendo realizados (Pessoti, 1967, 1981), no qual foi demonstrada a capacidade de Meliponas associarem a cor com os alimentos. Mandaçaias vêm sendo utilizadas recentemente em estudos de discriminações condicionais entre estímulos visuais, sendo demonstrado que elas discriminam muito bem entre as cores azul e amarela (Moreno, 2005).

1.4.2 Visão de abelhas

Segundo Menzel e colaboradores (1979), pode-se dividir o processamento de estímulos espectrais em dois tipos: comportamentos de comprimento de onda seletivo e visão de cores. Comportamentos de comprimento de onda seletivo ocorrem quando uma específica resposta comportamental é disparada de uma específica configuração de sinal de um fotorreceptor. Esse tipo de resposta comportamental não possui plasticidade, como exemplo, a fototaxia em abelhas e outros insetos. Quando abelhas são expostas a duas escolhas de rotas elas irão invariavelmente tomar a mais clara independente do conteúdo espectral (Prete, 2004).

Abelhas de vários gêneros usam a visão de cores para identificar flores, encontrar a entrada das colmeias e localizar rotas entre colmeia e a fonte de alimento (Chittka e Thomson, 2001; Zhang, Bock et al., 2005).

Em condições naturais, as variações ambientais mudam a cada instante, por conseguinte promovem uma mudança no padrão de floração de um determinado local em

poucos dias. Esse cenário é propício a uma forte pressão seletiva, o que fez com que as abelhas fossem selecionadas naturalmente a aprenderem, e, muitas vezes, a reaprenderem, cores, odores, formas e rotas. Nesse processo, abelhas podem aprender novas cores em 30 minutos, após terem feito cinco visitas até um local que possua recompensa, e novas combinações de cores em metade de um dia e novas rotas até fontes alimentares em cerca de quatro visitas. Elas podem, também, aprender a visitar diferentes espécies de flores em diferentes locais em diferentes horas do dia (Srinivasan, 2010).

Abelhas que nunca viram flores tem a tendência a preferir certas cores a outras. Essa preferência inata ajuda insetos ingênuos a encontrarem comida, permitindo a escolha de flores com recursos entre as que estão disponíveis. (Prete, 2004). Essas preferências podem ser substituídas por meio de aprendizado de exploração entre flores com cores e qualidades alimentares diferentes (Gumbert, 2000).

No estudo de Giurfa e colaboradores (1995), foi observado que abelhas preferem as cores violetas e azuis, estando ambas mais associadas a maiores quantidades de néctar disponíveis nas flores. Segundo Chittka e Wells (2004), todas as espécies de abelhas estudadas possuem uma preferência por cores correspondentes a comprimentos de ondas entre o azul e o violeta, portanto essa é presumivelmente uma preferência filogenética antiga.

Uma única visita a um alvo colorido é suficiente para induzir mudanças no comportamento de abelhas (Schulze Schencking, 1969), e três visitas são suficientes para produzirem memórias longas. Segundo Menzel (2001), o aprendizado de cores é primeiramente armazenado de forma transitória como memória de curto prazo, onde é sensível a interferências, e, quando expostas repetidamente a essa cor, elas passam então a ser armazenadas como memórias de longo prazo (Prete, 2004).

1.5 Ratos

Ratos de laboratórios (*Rattus norvegicus*), mamíferos da ordem Rodentia, mostram-se bons modelos biológicos para pesquisas em neurociências tanto para condições fisiológicas normais como para estudos de neuropatias. Segundo Kolb e Cioe (2004), os ratos são provavelmente a espécie mais estudada do ponto de vista da neurociência comportamental e também em pesquisas de plasticidade cerebral. Ratos vêm sendo empregados em estudos comportamentais, com protocolos já bem estabelecidos, além de proverem uma boa quantidade de material em relação a outros roedores, como camundongos, por exemplo,

serem facilmente manipulados em testes comportamentais (2011) e farmacológicos e possuírem uma proximidade evolutiva ao ser humano.

Ratos são utilizados em paradigmas de condicionamento operante com o intuito de estudar comportamentos direcionados. Em ratos duas áreas cerebrais estão envolvidas nesse tipo de aprendizagem, são elas: o hipocampo e o córtex pré-frontal (Rapanelli, Frick et al., 2009; 2011).

1.5.1 Hipocampo

O hipocampo, uma citoarquitetura subcortical, é uma das áreas chaves nas funções cognitivas no cérebro, e é de fácil dissecação em ratos (Hasselmo e Eichenbaum, 2005; Weitzdorfer, Hoyer et al., 2006). O hipocampo desempenha um papel crucial em processos neurofisiológicos como na plasticidade sináptica, na resposta ao estresse, na integração de informações oriundas de diferentes órgãos sensoriais e pode estar relacionado em várias doenças psiquiátricas, neurodegenerativas e neurológicas (Fountoulakis, Tsangaris et al., 2005; Leuner e Gould, 2010). No hipocampo pode ser observado um fenômeno de neurogênese em cérebros de mamíferos adultos (Altman e Das, 1965; Gould e Gross, 2002), fenômeno que acreditava ser exclusivo do período de desenvolvimento, e que está putativamente associado à aprendizagem e memória. Estudos mostram que há expressão diferencial dos níveis de mRNAs de BDNF, CamKII, CREB, Sinapsina I Arc, c-fos e c-jun no hipocampo de animais submetidos a aprendizagem operante (Gomez-Pinilla, Huie et al., 2007; Rapanelli, Frick et al., 2009). A proteína BDNF está relacionada a ajuda a sobrevivência de células nervosas bem como no crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses (Acheson, Conover *et al.*, 1995). A CamKII está envolvida na sinalização de sinais e é um importante mediador da aprendizagem (Yamauchi, 2005). A Sinapsina I está envolvida com a modulação da liberação de neurotransmissores, podendo regular a axonogênese e sinaptogênese (Hosaka e Sudhof, 1999). CREB, c-fos e c-jun são fatores de transcrição que atuam regulando a expressão gênica. Segundo Rapanelli (Rapanelli, Frick et al.) essa expressão diferencial de genes pode estar associada a alterações na plasticidade e atividade celular.

Com o advento das tecnologias proteômicas possibilitou-se a identificação e quantificação de proteínas, permitindo o estudo proteico em estruturas-chave na função cognitiva como, por exemplo, o hipocampo (Weitzdorfer, Hoyer et al., 2008). Diversos grupos de pesquisas têm estudado o proteoma de hipocampo de roedores em várias condições

por meio de diversas técnicas proteômicas como, por exemplo, eletroforese bidimensional (Fountoulakis, Tsangaris et al., 2005; Zhang, Liu et al., 2009) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Wisniewski, Zougman et al., 2009; Yang, Levin et al., 2011).

1.5.2 Córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal, uma região neocortical, recebe e envia projeções de praticamente todo sistema cortical, sistema motor e várias estruturas subcorticais, dentre elas o hipocampo (Miller e Cohen, 2001). Projeções do hipocampo ocorrem na região medial do córtex pré-frontal (mPFC). O mPFC participa de várias funções de ordem superior, como por exemplo a seletividade na atenção, controle motor das vísceras, tomada de decisões e a memória de trabalho (Vertes, 2006). Podemos destacar a memória de trabalho, que é a habilidade de manter e usar representações mentais para comportamentos direcionados a um objetivo (Thierry, Gioanni et al., 2000).

Estudos de ratos que sofreram lesões no córtex pré-frontal demonstram que isso resulta em déficit de aquisição, manutenção de ações operantes e aprendizagem reversa (Baldwin, Sadeghian et al., 2002; Corbit e Balleine, 2003). Segundo Balleine e Dickinson (1998) o córtex pré-frontal é de importância crítica na associação comportamento-resposta durante o paradigma operante.

Rapanelli e colaboradores (2010), descreveram que durante o curso de uma aprendizagem operante há uma superexpressão de mRNAs de genes relacionados a plasticidade neural no mPFC de ratos. De acordo com o mesmo grupo, a plasticidade sináptica nessa região é maior durante o processo de aprendizagem operante do que após a sua aprendizagem (Rapanelli, Lew et al., 2010). Esses dados dão suporte à existência de expressão diferencial de genes no hipocampo de ratos durante aprendizagem operante (Rapanelli, Frick et al., 2009), o que demonstra mais uma vez o envolvimento dessas duas regiões nessa forma de aprendizagem.

Segundo Rapanelli e colaboradores (2011) durante a aprendizagem de uma tarefa por condicionamento operante ocorre astrogliogênese, neurogênese e maturação neuronal no circuito mPFC-hipocampo. No mesmo estudo é descrito que o estímulo necessário para a manutenção da proliferação acaba quando o treinamento do animal termina. Pode-se observar que a aprendizagem também promove a sobrevivência das células, astrócitos, geradas durante

o treinamento operante dos ratos no mPFC e que esses eventos podem estar envolvidos com a formação de novos circuitos relacionados a aprendizagem (Rapanelli, Frick et al., 2011).

2 Justificativa

O condicionamento operante tem sido amplamente investigado em vários modelos animais, tanto em invertebrados quanto em vertebrados (Menzel, 1996; Chen, Chen *et al.*, 2011; Michel, Green *et al.*, 2011; Rapanelli, Frick *et al.*, 2011; Silverman-Gavrila, Senzel *et al.*, 2011; Takahashi, Yokota *et al.*, 2011; Trujillo-Pisanty, Hernandez *et al.*, 2011). Ainda assim, os mecanismos moleculares que estão envolvidos nessa forma de aprendizagem ainda não foram elucidados.

Estudos recentes a nível transcricional descrevem a superexpressão de mRNAs de genes relacionados a plasticidade neural em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos (Gomez-Pinilla, Huie *et al.*, 2007; Rapanelli, Frick *et al.*, 2009). Apesar da relevância de dados genômicos e transcriptômicos, é principalmente em nível proteômico que se torna possível vislumbrar a diversidade e funcionalidade bioquímica dos reais produtos de expressão gênica, as proteínas. Um grande número de modificações pós-traducionais e interações moleculares ocorre em proteínas e seus complexos, eventos que são responsáveis pela regulação de diversos processos celulares (Mann, Ong *et al.*, 2002; Ballif, Villen *et al.*, 2004). A identificação, caracterização e categorização de proteínas envolvidas em tais processos são atualmente possíveis por meio de uma abordagem neuroproteômica (Becker, Schindler *et al.*, 2006).

Abelhas mostram-se como bons modelos biológicos com protocolos de estudos comportamentais já bem estabelecidos. Estudos de processos comportamentais operantes com abelhas *M. quadrifasciata* são atualmente realizados devido a sua fácil manipulação pela ausência de ferrão, bem como seu amplo repertório comportamental. Uma vantagem no uso de abelhas como modelo é o seu sistema nervoso relativamente simples e de fácil acesso. Em nosso grupo, teses e trabalhos relacionados à linha de pesquisa “bioquímica do comportamento e da aprendizagem” utilizaram inicialmente a abelha *Apis mellífera* (Garcia, 2009; Cruz, Garcia *et al.*, 2011; Hernández, Lu *et al.*, 2011).

Ratos também revelam-se como bons modelos biológicos com protocolos de estudos comportamentais já bem estabelecidos, além de proverem uma quantidade de amostra biológica superior a obtidas em abelhas, facilidade de manipulação farmacológica e possuírem uma proximidade evolutiva maior em relação ao ser humano. Em nosso laboratório, estudos neuroproteômicos com ratos vêm sendo desenvolvidos. Extratos

proteômicos de hipocampo de ratos submetidos à aprendizagem por condicionamento operante foram submetidos à separação eletroforética bidimensional (2DE). Os mapas proteicos de ratos treinados, ratos controle e ratos *naive* foram analisados, demonstrando expressão diferencial de 60 proteínas. Algumas dessas proteínas já foram identificadas e 50 *spots* estão em processo de identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI TOF/TOF. Dentre as proteínas diferencialmente expressas já identificadas estão. Além disso, a disponibilidade da sequência genômica de rato atrelada ao uso de técnicas proteômicas tem promovido o avanço na compreensão mecanismo envolvidos nos complexos processamentos de informações presentes nas redes neurais.

Portanto, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de aprendizagem por condicionamento operante em abelhas e ratos pode auxiliar na compreensão de processos similares em mamíferos inclusive o homem.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas relacionadas ao comportamento e aprendizagem por meio de análises proteômicas cerebrais de abelha (*Melípona quadrifasciata*), e rato (*Rattus norvegicus*).

3.2 Etapas de realização

3.2.1 Primeira vertente

- Treinar abelhas *M. quadrifasciata* no paradigma operante;
- Obter tecido cerebral de abelhas, por meio de dissecação;
- Padronizar condições para a obtenção de mapas proteômicos de amostras de cérebros de *M. quadrifasciata*;
- Padronizar condições para a obtenção de mapas proteômicos de amostras de cérebros de *M. quadrifasciata* compatíveis com DIGE;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas entre indivíduos treinados e não treinados putativamente envolvidas no processo de aprendizagem;

3.2.2 Segunda vertente

- Obter tecido cerebral de ratos, por meio de dissecação;
- Padronizar metodologia de extração proteínas e fracionamento de peptídeos compatíveis com a marcação com reagente iTRAQ;
- Analisar qualitativamente o padrão de proteínas expressas no córtex pré-frontal de ratos *Rattus norvegicus* através de espectrometria de massas do tipo nanoLC-MS/MS.

4 Materiais e métodos

4.1 Treinamentos de abelhas

Os treinamentos foram realizados de acordo com os estudos de Moreno e colaboradores (2005). Foram empregadas como sujeitos abelhas mandaçaias (*Melipona quadrifasciata anthioides*), operárias, em idade adulta, forrageiras, experimentalmente ingênuas, provenientes de uma mesma colônia alojada no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem do Departamento de Psicologia da Universidade Federal de São Carlos. A colmeia estava instalada em um aparador adjacente a janela permitindo que as abelhas pudessem voar tanto para o interior da sala como para o ambiente natural.

Foram utilizados dois grupos de abelhas, treinadas (passaram por treinamento discriminativo condicional entre estímulos visuais cores), controle (abelhas que tiveram acesso *ad libitum* a xarope, mas não foram submetidos a treinamento discriminativo).

Dois equipamentos de treinamento foram utilizados, um equipamento de treino com barras (Figura 1) e um equipamento de treino sem barras (Figura 2). Os treinamentos em ambos os equipamentos de treino consistiam em 10 blocos de tentativas cada bloco foi formado pelo conjunto de dez tentativas. Cada equipamento era constituído por duas caixas experimentais onde os estímulos eram apresentados. O equipamento de pressão de barra possuía um semicírculo em material semitransparente, onde estava localizada a barra. Embaixo de cada um desses semicírculos existiam duas lâmpadas (uma azul e outra amarela).

O início de uma sessão acontecia com o posicionamento de dois pedaços de EVA na cor preta contendo pequenas quantidades de xarope [açúcar 50% (w/v)], próximo à entrada da colmeia. Alguns minutos depois podia ser observado que algumas abelhas encontravam se pousadas sobre os pedaços de EVA cada uma das abelhas permanecia aproximadamente um minuto sugando o xarope e então voltavam para a colmeia. Em um desses momentos em que elas estavam sobre o EVA sugando o xarope, duas das abelhas escolhidas aleatoriamente foram marcadas na parte dorsal de seu tórax com a utilização de um pincel de ponta fina com tinta guache de acordo com a metodologia empregada por Pessoti (1964) e von Frisch (1967).

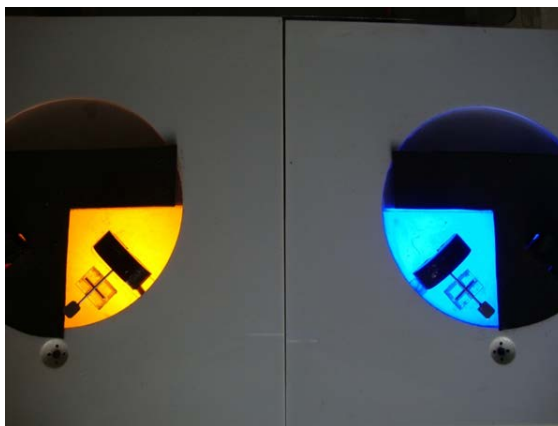


Figura 1. Equipamento de treinamento discriminativo com barras.



Figura 2. Equipamento de treinamento discriminativo sem barras. Abelha *M. quadrifasciata* sugando o xarope no bebedouro.

4.1.1 Modelagem do pouso sobre o aparelho e a resposta de sugar no bebedouro

Em seguida um dos EVA contendo xarope foi afastado gradualmente a uma distância de 1,5 m da colmeia. O outro foi afastado de forma gradual em direção ao equipamento de treino experimental localizado a mesma distância da colmeia.

Então teve-se o início da modelagem de abelha marcada para voar e pousar na caixa teste. Uma vez que a abelha estivesse voando para a caixa de modo estável, foi removido o EVA com xarope, sendo o xarope aplicado diretamente na tampa da caixa experimental a princípio de forma dispersa para facilitar que a abelha pudesse encontra-lo. Conforme o número de visitas ao aparelho foi aumentando o xarope era aplicado cada vez mais perto do orifício por onde a abelha podia ter acesso ao reservatório de xarope que fica abaixo do tampo da caixa. Posteriormente todo o xarope presente na tampa da caixa era limpo sendo apenas possível para a abelha ter acesso ao xarope no reservatório pelo bebedouro. Os

eventos compreendidos entre a saída da colmeia, a resposta (pressão da barra) em uma das caixas experimentais e o retorno à colmeia será referido pelo termo “visita”. O período de uma visita era bem regular, com duração de 1 a 3 minutos e intervalos de 1 minuto entre as visitas.

4.1.1.1 Equipamento de pressão de barra

Após o reforçamento de cerca de dez visitas nas caixas, era iniciada a modelagem de pressão da barra treino, sem nenhuma apresentação de estímulo para a abelha. A abelha foi então condicionada a pressionar a barra para que enfim pudesse ter acesso à recompensa (xarope). Uma vez que essa resposta de pressão estivesse bem estabelecida dava-se início ao treinamento.

Durante cada treino foi adotado uma das cores como sendo o estímulo positivo (S^+) e a outra como sendo um estímulo negativo (S^-). Para diminuir ou eliminar uma preferência inata por uma determinada cor, metade das abelhas foram treinadas com o azul sendo o S^+ e a outra metade o S^- adotado foi o da cor amarelo. A disposição dos estímulos durante uma tentativa era definida de acordo com uma tabela de aleatoriedade, medida tomada para eliminar uma possível tendência de escolha da abelha para uma posição e não para a cor. Em uma tentativa de treino, quando o sujeito emitia uma resposta na caixa experimental sinalizada com o estímulo definido como o correto, o xarope ficava então acessível no bebedouro pelo período de um minuto. Após sugar o xarope por um período de 45 segundos a abelha retornava à colmeia. Nesse momento tinha-se início a uma nova tentativa, com as posições dos estímulos previstas para aquela tentativa. Ao sair da colmeia a abelha poderia retornar ao equipamento e emitir uma nova resposta. Caso a abelha emitisse uma resposta em uma caixa que estivesse sinalizada com o estímulo definido como S^- , o xarope não era apresentado – a concha que eleva o xarope permanecia abaixada e as luzes do equipamento eram desligadas por um período de quinze segundos. Depois desse intervalo os estímulos eram apresentados novamente dando-se início a uma nova tentativa.

Foram feitos treinamentos no equipamento de pressão da barra, um treinamento que consistia em dez blocos de dez tentativas. O critério adotado para o aprendizado foi o de pelo menos 95 % de respostas corretas em blocos consecutivos.

4.1.1.2 Equipamento sem barra

Foram adotadas as mesmas medidas do treinamento anterior com a diferença que nesse treinamento a resposta foi definida como o pouso da abelha em uma das caixas seguido pela inserção de sua proboscide no bebedouro. Nesse equipamento a natureza do estímulo visual também difere do anterior. Foram utilizados pedaços de EVA (azul e amarelo) com um furo no centro onde ficava o bebedouro. O critério que foi adotado para se considerar que a abelha aprendeu foi o de pelo menos 95 % de respostas corretas em dez blocos de tentativas cada. Um vídeo dos dois tipos de treinamento encontra-se em anexo no CD-ROM.

4.2 Extrações de cérebros e quantificação de proteínas

4.2.1 Extração de cérebros de abelhas

Abelhas foram anestesiadas em gelo, e os cérebros foram dissecados e imersos em tampão de lise gelado (ureia 7 M, tiourea 2 M, tris 20 mM, CHAPS 4 % (w/v)) pH 8,5 contendo um coquetel de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e inibidores de fosfatases (PhosSTOP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Em seguida, essa solução contendo cérebros foi imersa em nitrogênio líquido e armazenados a temperatura de -20 °C. Foram extraídos dez cérebros para cada grupo (treinadas, controle e ingênuas) para cada um dos tipos de treinamentos, em um total de 90 cérebros. Os dez cérebros, pertencentes a cada grupo, foram lisados e homogeneizados em 200 µL de tampão de lise em gelo. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi submetido à quantificação protéica por análise de aminoácidos utilizando L-8500 Amino Acid Analyzer (Hitachi, Tóquio, Japão) e por espectrofotometria em leitor de placas ELISA modelo 3550 UV (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) utilizando 2D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.2 Extrações de encéfalos de ratos e quantificação de proteínas

Ratos foram decapitados, tiveram seus encéfalos removidos e dissecados, separando-se o hipocampo e o córtex pré-frontal em tubos de microcentrifuga. Seguiu-se então com a imersão desses tubos em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até a utilização. Os hipocampus e o córtex pré-frontal foram macerados por inteiro, em nitrogênio líquido, com um pistilo. Em seguida foram transferidos para tubos estéreis contendo tampão de lise

composto por ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (w/v), contendo coquetel de inibidores de fosfatases PhosSTOP. Após centrifugação (14000 g, 45 min, 4 °C) as proteínas do sobrenadante foram quantificadas utilizando-se o Plus One 2D Quant Kit (GE Healthcare). Esses procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal da Universidade de Brasília.

4.3 Eletroforese

4.3.1 Eletroforese bidimensional (2DE)

Eletroforeses bidimensionais foram realizadas usando sistemas IPGphor III (GE Healthcare) e Protean II xi Cell (Biorad). Aproximadamente 50 µg de extrato de cérebro de abelhas foram solubilizados a 20 °C em 350 µl de tampão 2D [ureia 7M, tiourea 2M, Triton X-100 2,5%, DTT 85 mM, 1 % tampão IPG pH 4-7, isopropanol 10% (v/v)] e submetidos a focalização isoeétrica em tiras de gradiente de pH imobilizado de 18 cm, em suporte manifold sob as seguintes condições: 500 V (gradiente) durante 1 h, 1000V por 1 h e 8000 V por 4 h e 30 minutos, totalizando 35300 Vh, com corrente constante de 75µA/strip. A redução das pontes dissulfeto das proteínas foi realizada por incubação em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,8 contendo ureia 6M, glicerol 30% (v/v) e SDS 2%) contendo DTT 125 mM seguida pela propionamidação dos radicais sulfidrilas em tampão de equilíbrio contendo acrilamida 300 mM. As tiras foram transferidas para géis de poliacrilamida 10 % ou gradiente de 8 % a 15 % contendo SDS, então as proteínas separadas a 30 mA, em tampão de corrida [Tris 25 mM pH 8,5, glicina 0,192 M, SDS 0,1 % (w/v)]. Como marcadores de massa molecular, foram usados: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A temperatura foi mantida com circulação de água a 20 °C, por banho termostático. Os géis analíticos de perfil proteico foram corados com nitrato de prata segundo Blum e colaboradores (1970).

4.3.2 Fluorescência diferencial em gel bidimensional (2DE DIGE)

Aproximadamente 50 µg de extrato de cérebro de abelhas, em pH 8.5, foram incubadas para marcação com 400 pmol de fluoróforo por 30 minutos em gelo, conforme as instruções dos fabricantes. A reação foi parada com a adição de 10 nmol de lisina seguida por uma nova incubação em gelo por 15 minutos. Em todos os géis foi usado o fluoróforo Cy2

como padrão interno que era composto por uma combinação de todas as amostras analisadas no respectivo experimento. Para a eletroforese bidimensional as amostras, de abelhas treinadas e as pertencentes ao grupo controle, foram marcadas com Cy3 e Cy5 nas mesmas condições do padrão interno foram misturadas e incubadas em duas vezes o volume das três amostras combinadas uma solução de reidratação (ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 1 % (w/v), 2 % tampão IPG pH 4-7, DTT 2 %). O volume final foi ajustado até 350 µl de tampão 2D'' (ureia 7 M, tiourea 2M, DTT 85 mM, 1 % tampão IPG pH 4-7, uma vez que por meio de estudos anteriores e nessa faixa de *pI* se encontram a maioria das proteínas, isopropanol 10 % (v/v)) em seguida foram submetidas a focalização isoeletrica em tiras de gradiente de pH imobilizado 4-7 de 18 cm (GE Healthcare) em suporte manifold sob as seguintes condições: 500 V (gradiente) durante 1 h, 1000V por 1 h e 8000 V por 4 h e 30 minutos, totalizando 35300 Vh, com corrente constante de 75 µA/strip.

Subsequentemente à focalização isoeletrica foi realizado a redução das pontes dissulfeto das proteínas por incubação em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,8 contendo ureia 6 M, glicerol 30 % (v/v) e SDS 2 % (w/v) contendo DTT 125 mM seguida pela propionamidação dos radicais sulfidrilas em tampão de equilíbrio contendo acrilamida 300 mM. As tiras foram transferidas para géis de poliacrilamida 10 % contendo SDS e as proteínas separadas a 30 mA, em tampão de corrida (Tris 25 mM pH 8,5, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (w/v)). A temperatura foi mantida com circulação de água a 20 °C, por banho termostático.

A aquisição das imagens de géis foi realizada no system Etan DIGE Image (GE Healthcare) com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 488/520 nm (Cy2), 532/670 nm (Cy3) e 633/670 nm (Cy5). Após a aquisição das imagens os géis foram corados com nitrato de prata com algumas modificações para o protocolo de Blum e colaboradores (1970).

Imagens digitalizadas foram importadas via software DeCyder 2D (GE Healthcare) para análise. Foi aplicada a cada gel detecção automática de spots com a mínima interferência do usuário seguida pela edição manual quando necessário. Os valores de intensidade foram normalizados em um processo de dois passos. No primeiro passo, os valores do ruído foram corrigidos pela mediana de todos os spots dos três canais (Cy2, Cy3, Cy5). Depois a intensidade da fluorescência de cada spot foi calibrada como padrão interno pela divisão do

volume do spot normalizado dos canais de Cy3 e Cy5 pelo seu valor correspondente no canal para Cy2.

Para minimizar o número de falsos positivos, foi adotado o seguinte critério de seleção: a mudança na razão entre a intensidade de duas amostras deve exceder um fator de 2; o valor p do teste ANOVA deve ser menor que 0,05; o valor de volume mínimo para um spot deve exceder 0,3 para que sejam evitados cálculos de pontos muito próximos à intensidade do ruído de fundo.

Foram usados como marcadores de massa molecular: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A aquisição da imagem dos géis corados com prata foi realizada em um *scanner* Sharp JX-330 (Tóquio, Japão) em 300 dpi de resolução.

4.4 Digestão *in situ*

Os spots de eletroforese bidimensional de interesses foram excisados do gel e descorados. Cada spot foi incubado em 50 μ L de uma solução recém-preparada de ferricianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM por 15 minutos (Gharahdaghi, Weinberg et al., 1999). Depois desse período o sobrenadante foi removido e descartado, o pedaço de gel passou por passos repetidos de enxagues com água.

Para a remoção do excesso de sal residual dos processos anteriores foram realizadas três lavagens alternadas de 10 min com água e ACN 100% (v/v). Na última lavagem com ACN 100 % o spot foi macerado. Depois a amostra foi seca em um Speed Vac (Savant).

Os géis foram hidratados novamente em NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM contendo 12,5 ng/ μ L de tripsina de grau de sequenciamento (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 37°C por intervalo de 14-16 h. Os peptídeos trópicos foram extraídos duas vezes com 40 μ L de solução ACN/água/TFA (66:33:0,1) em sonicador por 10 min. Em seguida adicionou-se 1 μ L de TFA 1 % (v/v) à solução para interrupção da reação e extração dos peptídeos. Os digestos foram dessalinizados e concentrados usando ZipTips[®] C₁₈ (Millipore, Billerica, MA, EUA).

4.5 Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)

Proteínas foram analisadas por espectrometria de massa (“Mass Spectrometry” – MS) utilizando espectrômetro de massa Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics). As massas dos peptídeos (MH⁺) foram registradas na faixa de 800 a 3000 Da. O programa FLEXControl v. 1.1.0.0 (Bruker Daltonics) foi utilizado para a aquisição de espectros. O programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics) foi usado para o processamento e análise dos espectros através da obtenção da listas de picos referentes as massas monoisotópicas dos peptídeos. Para a calibração externa do espectrômetro foi realizada usando um “kit” de peptídeos padrão fornecido por Bruker Daltonics (Peptide calibration standard (1000–3200 Da): angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatina 28). Os picos conhecidos como sendo produto da digestão da queratina e da autólise da tripsina foram utilizados para a calibração interna dos espectros.

Para cada amostra 1 µL foi aplicado em um halo de uma AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e deixado até secar completamente (Zhang, Shi et al., 2007). Em seguida foi aplicado no mesmo halo 0,5 µL de uma matriz recém-preparada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA 0,5 µg/µL em ACN 90% (v/v) e TFA 0,1% (v/v)) e deixado até secar completamente.

Após a obtenção dos espectros de massas e de suas análises foi adotado a metodologia de “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) para a identificação das proteínas. As listas de relação carga massa correspondentes aos peptídeos monoisotópicos foram confrontadas com um banco de dados de proteínas NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) por intermédio do programa BioTools v. 2.0 (Bruker Daltonics) conugado ao programa Mascot v. 2.1 (<http://www.matrixscience.com/>) (Perkins, Pappin et al., 1999).

Para a busca no banco de dados foram utilizados os seguintes critérios: tolerância de massas dos peptídeos inferior a 100 ppm, nenhuma restrição de massa molecular de proteína ou para linhagem filogenética, oxidação de resíduos de metionina como modificação variável e propionamidação de resíduos de cisteína (alquilação com acrilamida) como modificação fixa, o número de sítios trípticos de clivagens perdidas pela tripsina foram menores ou iguais a dois (na maioria dos casos foi zero). Identidades foram consideradas significativas se o score de identificação de proteína ultrapassasse o limiar calculado pelo programa Mascot, assumindo valor de $p < 0,05$.

4.6 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC MS/MS)

4.6.1 Digestão trípica em solução

Uma alíquota de 100 µg de proteínas provenientes do córtex pré-frontal de ratos controles tiveram seus grupos tióis reduzidos em tampão HEPES 200 mM, pH 8,3, contendo DTT 5 mM a 56 °C por 1 h. Subsequentemente ao processo de redução dos grupos tióis dos resíduos de cisteínas houve o bloqueio destes pela adição e incubação de uma solução de IAA 20 mM, no escuro por 1 h a temperatura ambiente. Depois da alquilação da amostra foi adicionado 4 µg tripsina (Promega) e ACN 100 % (concentração final de 10 % v/v) e uma posterior incubação a 40 °C durante 14 h.

4.6.2 Focalização isoeletrica de peptídeos.

Após a digestão a amostra foi dessalinizada por meio da utilização de ultra-micro spincolumn C18 (Harvard Apparatus, Holliston, Estados Unidos da América) conforme as instruções do fabricante. Em seguida os peptídeos trípticos foram eluídos da coluna e secos em Speed Vac (Savant).

O digesto foi então resuspendido em 350 µL de solução 2D[™] (ureia 7 M, tiourea 2M) seguida pela reidratação passiva por 14 h de uma tira de gradiente de pH imobilizado 3-10 de 18 cm (GE Healthcare) a temperatura ambiente. Em seguida essa tira foi submetida a uma focalização isoeletrica usando se um suporte *manifold* em sistema IPGphor III (GE Healthcare) sob as seguinte programa de focalização: 300 V por 1 h, seguido por um gradiente até 1000 V por 1 h, um gradiente até 4000 V por 3 h, um novo gradiente até 8000 V e a manutenção da voltagem em 8000 V até que o número de volts hora atingissem 10 kWh. Todo esse processo de focalização ocorreu a temperatura 20 °C.

Posteriormente a focalização a tira de gradiente de pH imobilizado foi cortada em 14 pedaços de iguais tamanhos. Cada fração foi posta em um microtubo. O início da extração dos peptídeos trípticos de cada fração se deu pela adição de 150 µl de TFA 0,1 % seguida por uma sonicação de 10 min. Os tubos foram então centrifugados por 1min e o sobrenadante foi coletado. Em seguida 200 µL de solução ACN 80% e TFA aquoso 0,1 foram adicionados a microtubo, que foi posto em sonicador por 20 min. Passado esse tempo o sobrenadante foi

recolhido e esse último passo repetido (Cargile, Talley et al., 2004; Hubner, Ren et al., 2008). Os sobrenadantes das três extrações foram combinados em um micro tubo e concentrados em um Speed Vac (Savant).

Os extratos terem seus volumes reduzidos a aproximadamente 30 uL. Esse volume foi então aplicado em uma ultra-micro spincolumn C18 (Harvard Apparatus, Holliston, Estados Unidos da América) segundo as instruções do fabricante, com a finalidade de remover o sal. Os peptídeos eluídos no final desse processo foram então secos.

4.6.3 Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS)

Ao final as frações de peptídeos foram re-dissolvidas em 10µL de TCA 0,1%, dos quais 4µL foram aplicados no sistema nano-LC-Ultra system (Eksigent), equipado com uma coluna do tipo *trap* (150 µm x 200 mm, sendo o empacotamento sido realizado no laboratório com partículas C18 Reprosil de 3 µm (Dr. Maich)) trabalhando a um fluxo de 4µL/min. Em seguida, os peptídeos foram eluídos em uma nano-coluna (15cm x 50µm empacotada com partículas C18 Reprosil de 3µm, Dr. Maich). As soluções tampão utilizadas foram: tampão A (ACN 5% contendo ácido fórmico 0,1%) e o tampão B (ACN 80% contendo ácido fórmico 0,1 %) O gradiente para análise direta em solução foi: 5-20% de solvente B em 73 min, 20-50% de solvente B em 71 min, 50-100% de solvente B em 5 min, 100% de solvente B por 10 min e de volta a 5% de solvente B em 10 min. A interface entre nanoLC e o espectrômetro de massa híbrido LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) foi feita através do controle automático do equipamento. Os espectros de MS/MS foram adquiridos em modo *Data Dependent Acquisition* (DDA) sobre o controle do *software* Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). O ciclo de DDA consistiu em um *survey scan* compreendendo a faixa de m/z 300-1600 realizada sob resolução de 60.000 FWHM (*Full Width at Half-Maximum*) e com valor alvo de 1E06 íons. O *survey scan* foi seguido por fragmentação MS/MS dos dez íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes de cada tempo. Os espectros foram adquiridos sob energia de colisão de 35% e valor alvo de íons igual a 1E04 no íon *trap* linear (limiar de seleção de íons de 400 contagens). Foram aplicados parâmetro de ativação $q = 0,25$ e tempo de ativação de 30ms. Íons precursores anteriormente fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90s.

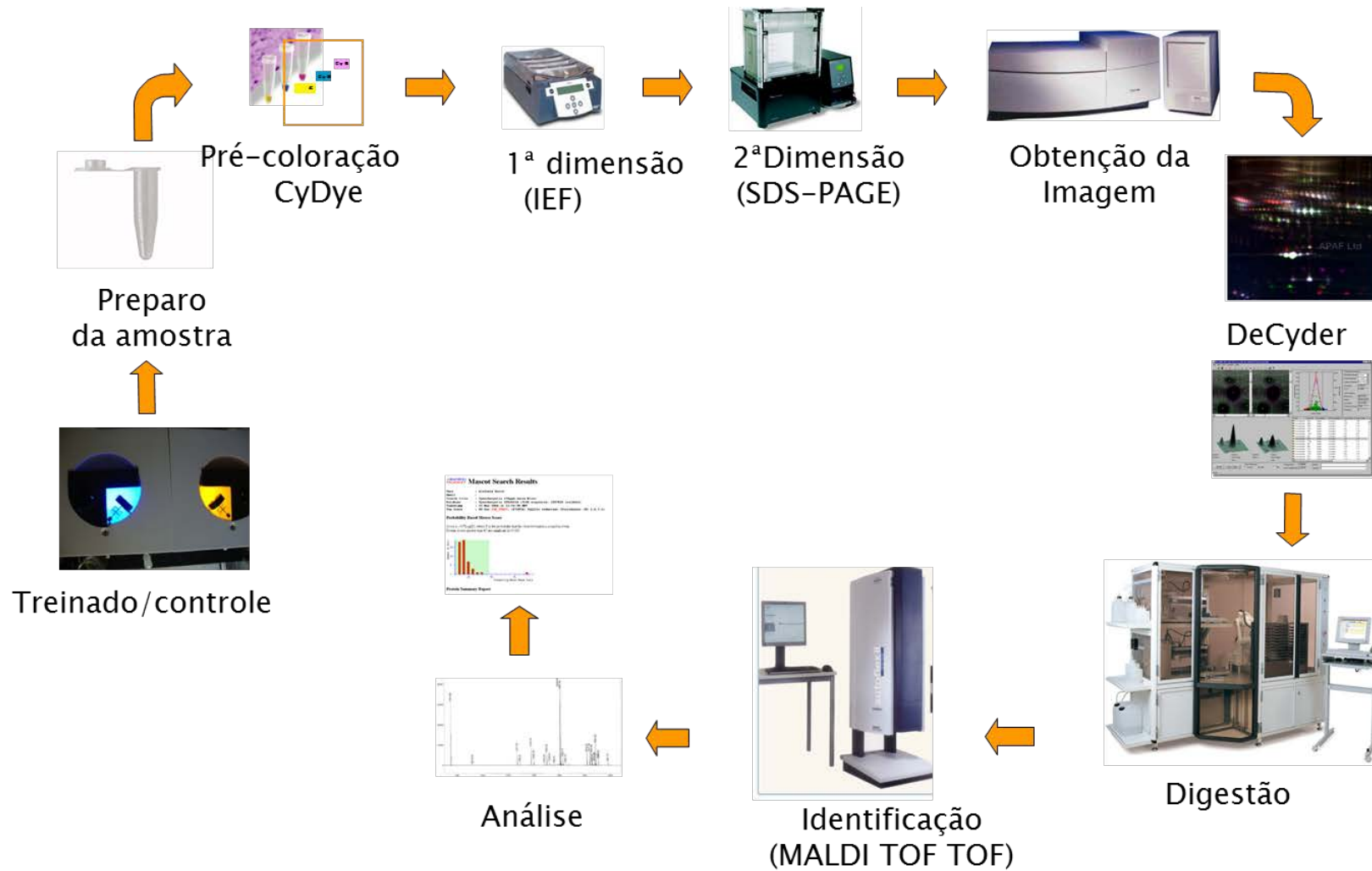
Os arquivos .raw foram convertidos a formato .mgf, os quais foram submetidos à busca contra o banco de dados de Rodentia (163767 seqüências; UniProt). Como parâmetros

de busca foram utilizados carbamidometilação da cisteína (alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa; oxidação da metionina, acetilação da porção N-terminal do peptídeo e fosforilação de serina, treonina como modificações variáveis; máximo de um sítio de clivagem perdido pela tripsina; equipamento do tipo ESI-TRAP; e tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos fragmentos como 10 ppm e 0,6 Da, respectivamente. As identificações foram consideradas positivas se o score total foi acima de 60 considerando peptídeos com scores individuais acima de 20.

Cada proteína identificada foi categorizada manualmente, de acordo com função biológica e localização celular anotada nos bancos de dados públicos UniProtKB/Swiss-Prot (www.uniprot.org) ou Gene Ontology (www.geneontology.org). Não foram categorizadas as proteínas sem informações ou com função/localização desconhecidas. As proteínas preditas como participando do processo de aprendizagem foram submetidos a uma busca mais refinada para se predizer qual a localização e função biológica mais provável para elas no usando se o servidor de similaridade de grupo estendida (Extended Similarity Group/ ESG) acessado no sítio do laboratório Kihara (www.kiharalab.org). Os parâmetros usados nas buscas no ESG foram: 35 hits por estágio, e dois números de estágios.

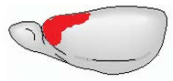
As proteínas de córtex pré-frontal preditas como envolvidas no processo de aprendizagem tiveram suas sequências de aminoácidos FASTA submetidos a uma busca de regiões de similaridade no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando se o algoritmo Blastp.

4.7 Fluxograma experimental para análise neuroproteômica de abelhas por DIGE e MALDI-MS/MS

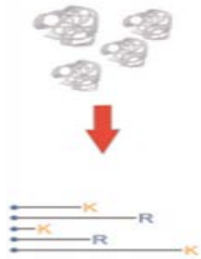


4.8 Fluxograma experimental para análise neuroproteômica de ratos por IEF e LC-MS/MS

Dissecção do
córtex pré-
frontal



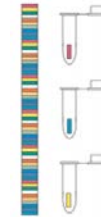
Digestão
enzimática



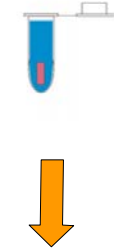
Focalização
isoeétrica



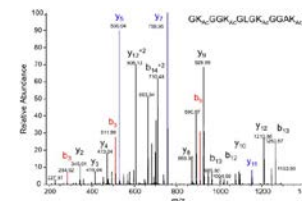
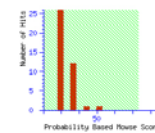
Fracionamento
das IPG strips



Extração dos
peptídeos



Análise por LC-
MS/MS



5.1.1.2 Treinamento em equipamento de pressão de barra

Abelhas *M. quadrifasciata* foram submetidas a treinamento por condicionamento operante a pressionarem um barra, associada a um estímulo S^+ , presente em um equipamento de discriminação visual. Os dados referentes ao número de blocos e a frequência de cada acerto se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Frequência de respostas certas no treinamento em equipamento de pressão de barra em blocos com 10 tentativas cada .

Abelha	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Bloco 5	Bloco 6	Bloco 7	Bloco 8	Bloco 9	Bloco 10	Total de acertos
X	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	99
XI	1	1	1	1	1	0,9	1	1	1	1	99
XII	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	99
XIII	1	1	0,9	1	1	0,9	0,9	1	1	1	97
XIV	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	99
XV	1	1	1	0,9	1	1	0,9	1	0,9	1	97
XVI	0,9	0,9	0,9	1	1	1	1	0,9	1	1	96
XVII	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
XVIII	1	0,9	1	1	0,8	1	1	1	1	1	97

A quantidade de nove abelhas foram treinadas, dentre as quais cinco foram treinadas com a cor amarela como S^+ (X, XII, XIV, XVI e XVIII), e as demais quatro foram treinadas com a cor azul como S^+ . Após o treinamento, as abelhas tiveram seus encéfalos dissecados e os proteoma extraídos em tampão 2D. Em seguida foi realizada a quantificação de proteínas utilizando o plus one 2D quant kit. A quantidade total de proteínas para abelhas treinadas no equipamento de pressão de barras foi de 231,2 μg .

5.1.2 Padronização de géis 2DE

A figura 3 mostra as etapas de otimização dos géis de extrato proteico cerebral de *M. quadrisfasciata*. A primeira etapa (Figura 3A) não apresentou uma resolução satisfatória, indica da pelas estrias na região onde as proteínas têm $MM > 66$ kDa e $pI > 5,5$. Naturalmente que esse artefato observado na 2DE tem sua fonte causal na isoeletrofocalização.

Algumas modificações (a maioria a nível da primeira dimensão) foram propostas visando melhorar a separação das proteínas na 2DE. A cada modificação bem sucedida, a nova condição estabelecida foi conservada para as etapas posteriores. Assim, a segunda etapa consistiu em alterar a concentração de anfólitos de 0,5 % (v/v) para 1,5 %. Esta modificação promoveu uma pequena melhora da focalização, porém as estrias já mencionadas ainda permaneceram (Figura 3B).

Na terceira etapa Triton X-100 2,5 % (v/v) foi substituído por CHAPS 1% (w/v). A presença do CHAPS reduziu o número das estrias (Figura 3C).

A 4ª etapa foi caracterizada por uma redução ainda maior das estrias. Esta resolução é devida à reposição do DTT 3,5 % (w/v), em urea 7 M e Tiourea 2 M, que migra para o ânodo durante a primeira dimensão. Alguns *spots* não observados anteriormente foram visualizados nesta etapa.

A 5ª etapa consistiu na produção de um gel gradiente (8 a 15 %) (Figura 3E). Esta alteração produziu um 2DE com *spots* bem definidos e diminuição substancial das estrias relativamente aos géis anteriores. Esta condição foi considerada satisfatória para a separação de proteínas por meio de 2DE e uma posterior análise.

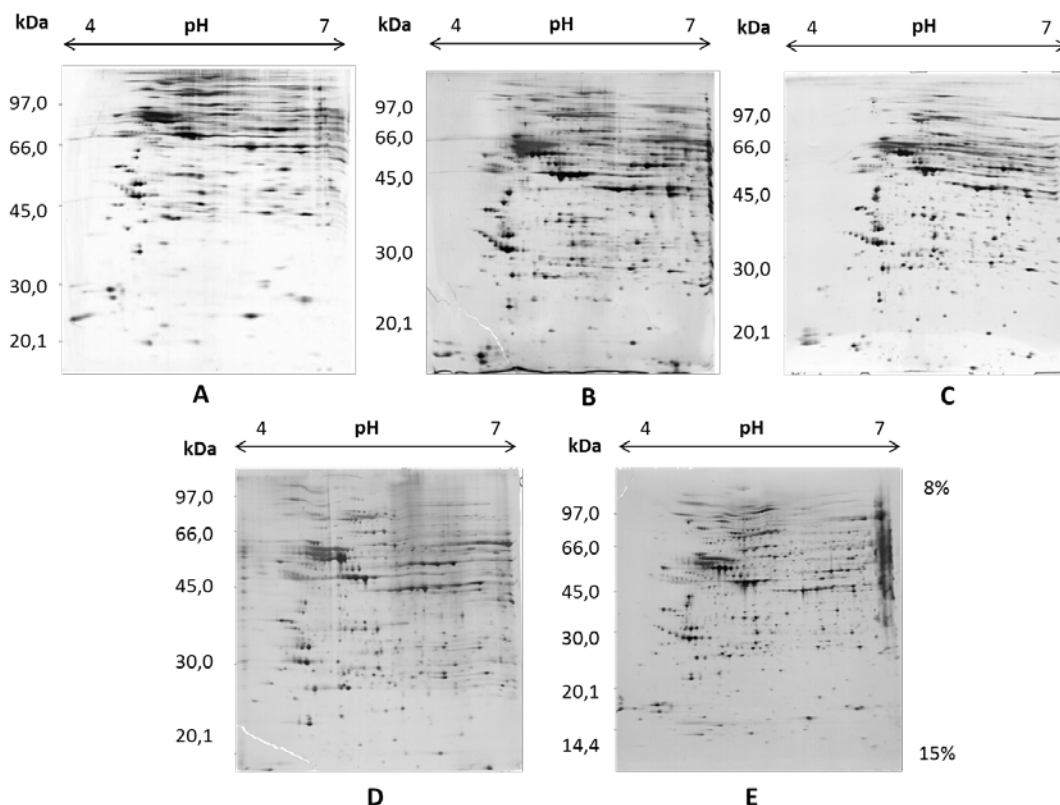


Figura 3. Padronização de 2DE de extratos proteicos cerebrais de abelhas *Melipona quadrifasciata*. Proteínas separadas em faixa de pH 4–7, uma quantidade de 50 μ g de proteínas de extrato cerebral de abelhas foram utilizadas. **A.** Isoeletrofocalização usando (7 M ureia; 2 M tiourea; DTT 85 mM; anfólitos 0,5%; Triton X-100 2,5%; isopropanol 10%) e gel de acrilamida 10% (T). **B.** Substituição de anfólitos. **C.** Alteração da concentração de anfólitos 0,5% para 1,5% e substituição de Triton X-100 2,5% por CHAPS 1%; 8%-15% (T) de acrilamida. **D.** Isoeletrofocalização usando (7 M ureia; 2 M tiourea; 85 mM DTT; 1,5% anfólitos; 1% CHAPS; 10% isopropanol) com reposição de DTT 1% no cátodo e gel 10% (T) de acrilamida. **E.** Isoeletrofocalização usando (7 M ureia; 2 M tiourea; 85 mM DTT; 1,5% anfólitos; 1% CHAPS; 10% isopropanol) com reposição de DTT (3,5%) no cátodo e gel gradiente 8%-15% (T) de acrilamida. Géis corados com nitrato de prata.

5.1.3 Fluorescência diferencial em gel bidimensional (2DE DIGE)

5.1.3.1 Análise por eletroforese diferencial entre abelhas treinadas em equipamento sem barra

As proteínas cerebrais de abelhas (treinadas e controle) extraídas, foram marcadas com os corantes Cy3, Cy5 e Cy2 (padrão interno), de acordo com as especificações do fabricante, e solubilizadas em de tampão 2D[™] (ureia 7 M, tiourea 2 M, DTT 85 mM, anfólitos 1 %, isopropanol 10 % (v/v)) foram separadas em faixas de pH, 4–7 para fins de comparação e identificação de diferenças no perfil de expressão das proteínas cerebrais, por meio de 2DE (Figura 4). Na figura 4A as proteínas oriundas de abelhas treinadas foram

marcadas com Cy3, amostras do grupo controle marcadas com Cy5 e uma combinação das amostras dos dois grupos foram utilizada como padrão interno, marcados com Cy2. Após a aquisição das imagens no Ettan DIGE Image os géis foram submetidos a coloração por nitrato de prata (Figura 5).

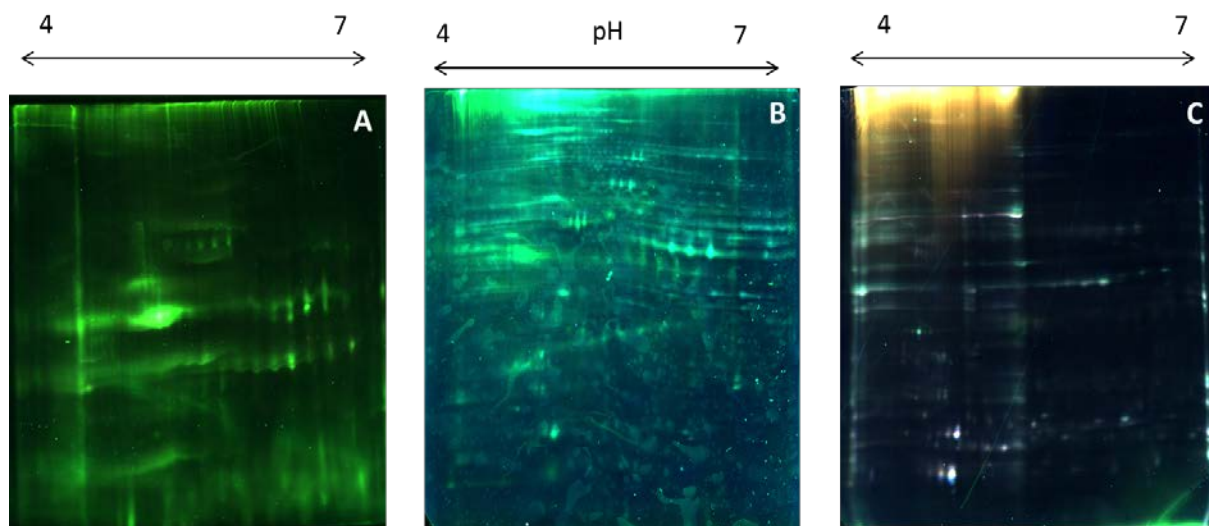


Figura 4. Perfil 2DE DIGE de proteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata*. Fluorescência dos 3 canais (Cy3, Cy5, Cy2). **A** e **C**: extratos de cérebros de abelhas treinadas por condicionamento operante marcadas com Cy3 e grupo controle marcado com Cy5. **B** extratos de cérebros de abelhas treinadas por condicionamento operante marcadas com Cy5 e grupo controle marcado com Cy3. Um gradiente de pH imobilizado de 4-7 foi utilizado na primeira dimensão e SDS-PAGE de 10% na segunda dimensão.

Como pode ser visto na figura 4, embora os géis tenham sido submetidos as mesmas condições eletroforéticas o perfil eletroforético apresentados por eles não foi reprodutível, o que impossibilitou o pareamento dos *sptots*, uma análise comparativa entre os géis e a execução de uma análise estatística válida. Sendo assim não foi possível a identificação de possíveis modificações nos níveis de proteínas entre abelhas treinadas por condicionamento operante de abelhas não treinadas em uma análise comparativa entre géis.

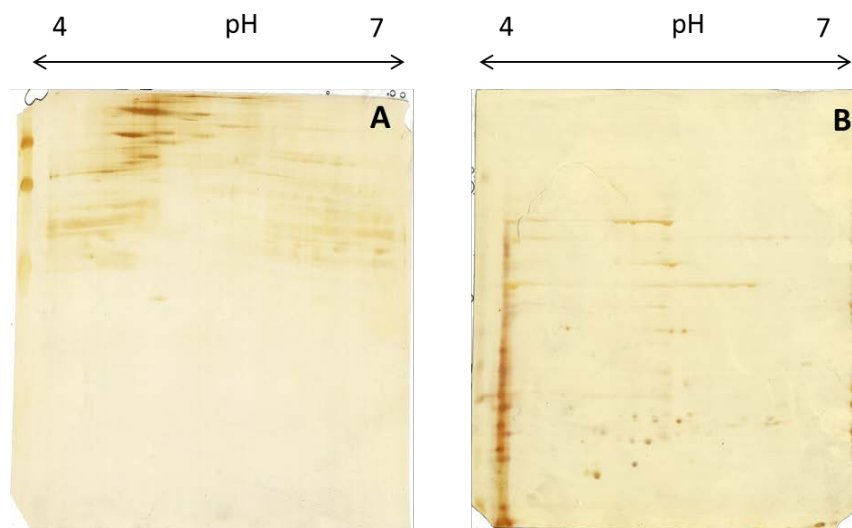


Figura 5. Perfil 2DE de proteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata*. Perfil eletroforético de 150 μg de extratos cerebrais de abelhas treinadas (75 μg) por condicionamento operante em equipamento sem barras e seu respectivo controle (75 μg). Um gradiente de pH imobilizado de 4-7 foi usado na primeira dimensão e SDS-PAGE de 10% na segunda dimensão.

Embora tenham sido submetidos a mesmas condições de separação, como pode ser observado (Figura 5) os perfis de proteínas dos géis corridos com o mesmo grupo amostral não apresentaram reprodutibilidade, impossibilitando o pareamento de spots em uma análise entre géis. Isso indica que, de alguma forma, na condição testada, os corantes derivados de cianina alteram o padrão de separação das proteínas. Como pode ser constatado quando se compara o perfil eletroforético de um gel de extrato cerebral (Figura 3) e o mesmo extrato marcado com o fluoróforo (Figura 4). Observa-se também na Figura 5 um artefato em forma de linha vertical na faixa de pI próximo a quatro, o que pode ser a precipitação de proteínas nessa faixa e sua não separação durante a isoeletrofocalização.

5.1.3.2 Análise por eletroforese diferencial entre abelhas treinadas em equipamento de pressão de barra

As proteínas presentes nos extratos cerebrais extraídos de abelhas submetidas ao treinamento em equipamento com barra e de abelhas pertencentes ao grupo controle, foram marcadas com Cy3, Cy5 e Cy2 (padrão interno), de acordo com as especificações do fabricante, e solubilizadas em tampão 2D[®] (ureia 7 M, tiourea 2 M, DTT 85 mM, anfólitos 1 % (v/v), CHAPS 1 % (w/v), isopropanol 10 % (v/v)) foram separadas em faixas de pH, 4–7 para fins de comparação e identificação de diferenças no perfil de expressão das proteínas cerebrais.

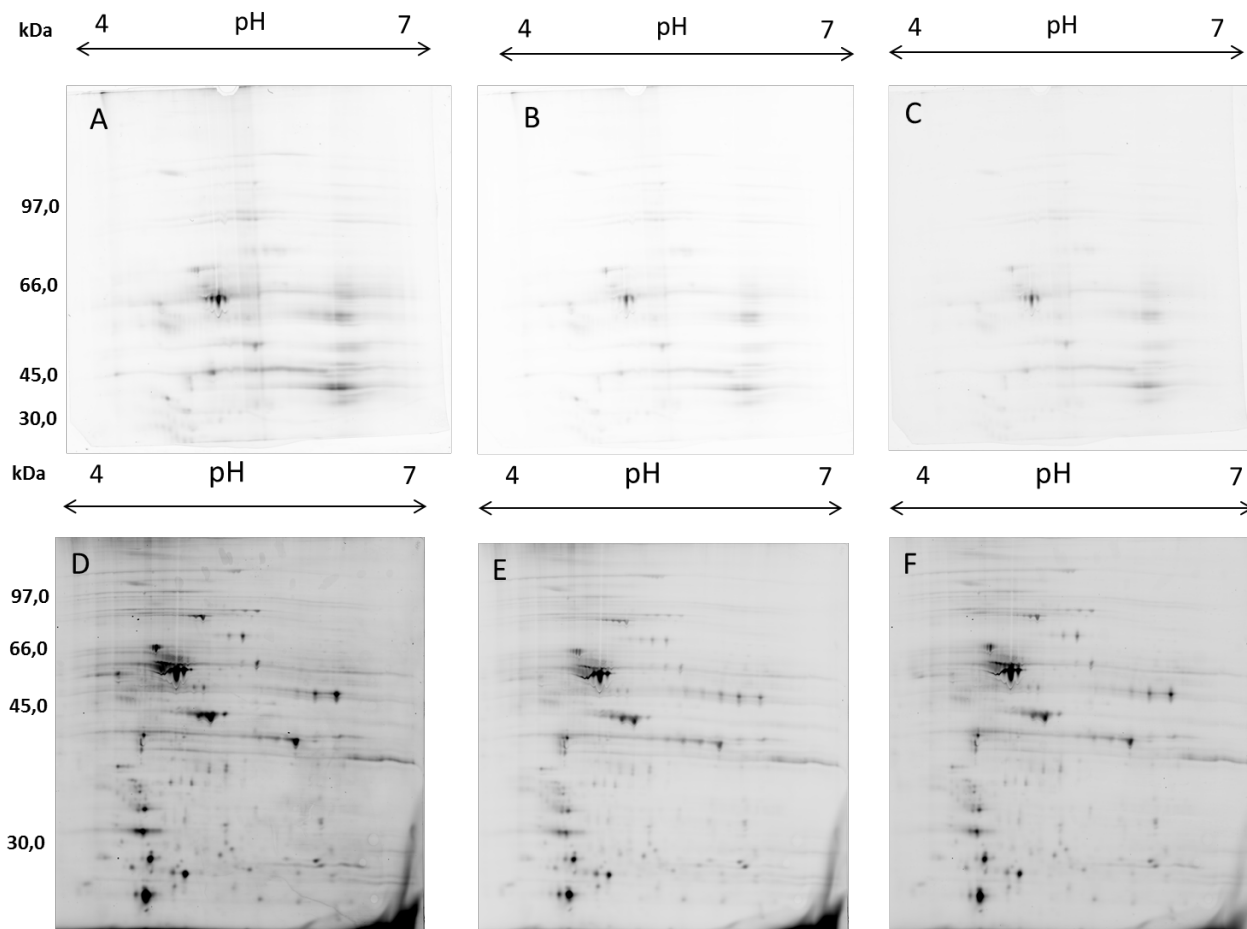


Figura 6. Perfil 2DE DIGE de proteínas cerebrais da abelha *Melipona quadrifasciata*. A-C e D-E amostras em um mesmo gel, mas com leituras para diferentes canais de fluorescência Cy3, Cy2 e Cy5 respectivamente. A. Extrato cerebral de abelhas treinadas por condicionamento operante em equipamento de pressão de barra marcadas com Cy3. C. Extrato cerebral de abelhas pertencentes ao grupo controle marcados com Cy5. B e E. Combinação das duas amostras constituindo o padrão marcado com Cy2. D. Extrato cerebral de abelhas pertencentes ao grupo controle marcados com Cy5. F. Extrato cerebral de abelhas treinadas por condicionamento operante em equipamento de pressão de barra marcadas com Cy5. Um gradiente de pH imobilizado de 4-7 foi utilizado na primeira dimensão e SDS-PAGE de 10% na segunda dimensão.

Por falta de reprodutibilidade entre os géis (Figura 6), o que impossibilita o pareamento de *spots* e uma análise estatística válida, não foi possível identificar ainda proteínas diferencialmente expressas entre abelhas treinadas e controles.

5.2 Segunda vertente

5.2.1 Levantamento de proteínas totais de córtex pré-frontal de rato

Com o intuito de identificar as proteínas expressas no córtex pré-frontal de ratos, o cérebro foi dissecado e as regiões correspondentes ao hipocampo e o córtex pré-frontal separados. Para a extração de proteínas foi utilizado um tampão contendo ureia, tiourea, CHAPS, e inibidores de fosfatase. Os extratos proteicos foram então aferidos por meio do 2D Quant-kit (GE-Healthcare), o qual possui a capacidade de determinar a concentração de proteínas mesmo na presença de detergentes.

O extrato proteico de córtex pré-frontal foi submetido à redução e alquilação seguida por uma digestão em solução com tripsina. Em seguida a solução foi submetida a uma dessalinização para a remoção do excesso de sais em uma microcoluna C18. Após a dessalinização os peptídeos foram separados por meio de isoeletrofocalização em tiras de pH imobilizados de faixa de 3 a 10. Após a isoeletrofocalização a tira foi dividida em 14 frações de iguais tamanhos. Essa etapa foi realizada para diminuir a complexidade da amostra e possibilitar um maior número de identificação de proteínas.

Os peptídeos foram então extraídos das frações das tiras e submetidos a uma separação em um nano LC com interface com espectrômetro de massa híbrido LTQ Orbitrap XL. Os espectros de massas obtidos foram confrontados com um banco de dados de proteínas não redundantes. No total identificou-se 15209 peptídeos redundantes e foram identificadas, 923 proteínas sem redundância, validadas estatisticamente com mais de 95 % de certeza (Tabela 3) em Anexo 1. Nessa tabela pode se encontrar listados os dados referentes à análise por espectrometria de massas, tais como os números de acessos de cada proteína no banco de dados do UniProt bem como, os nome das proteínas, seu pontos isoelétricos (pI), valores de massas moleculares, número de peptídeos pareados, cobertura da sequência. As proteínas identificadas foram categorizadas manualmente de acordo com a possível localização intracelular ou extracelular (Figura 7) e de acordo com sua função ou processo biológico que está envolvida (Figura 8), tendo como base informações depositadas nos bancos de dados tanto de funções já caracterizadas quanto das supostas por homologia.

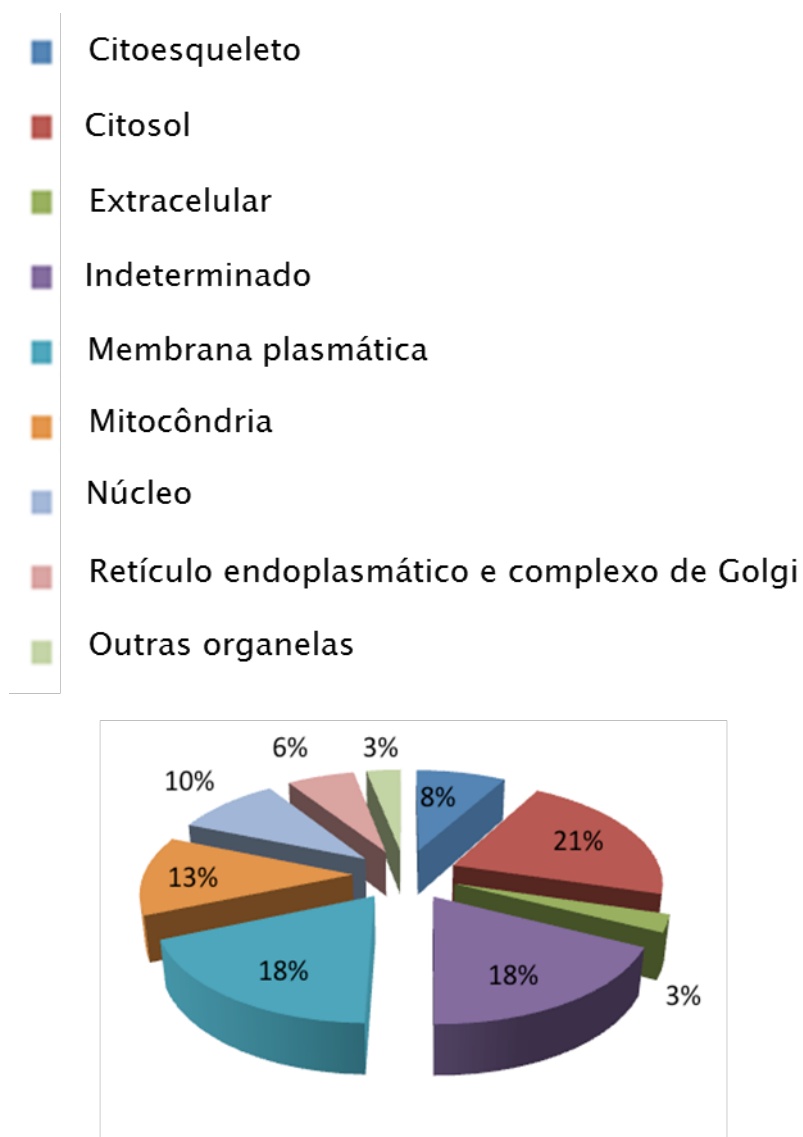


Figura 7. Localização de proteínas de córtex pré-frontal de ratos identificadas por LC-MS/MS. Proteínas identificadas por LC-M/SMS, usando espectrômetro de massas híbrido LTQ Orbitrap XL, foram classificadas, segundo banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot ou Gene Ontology, pela sua localização sub-celular.

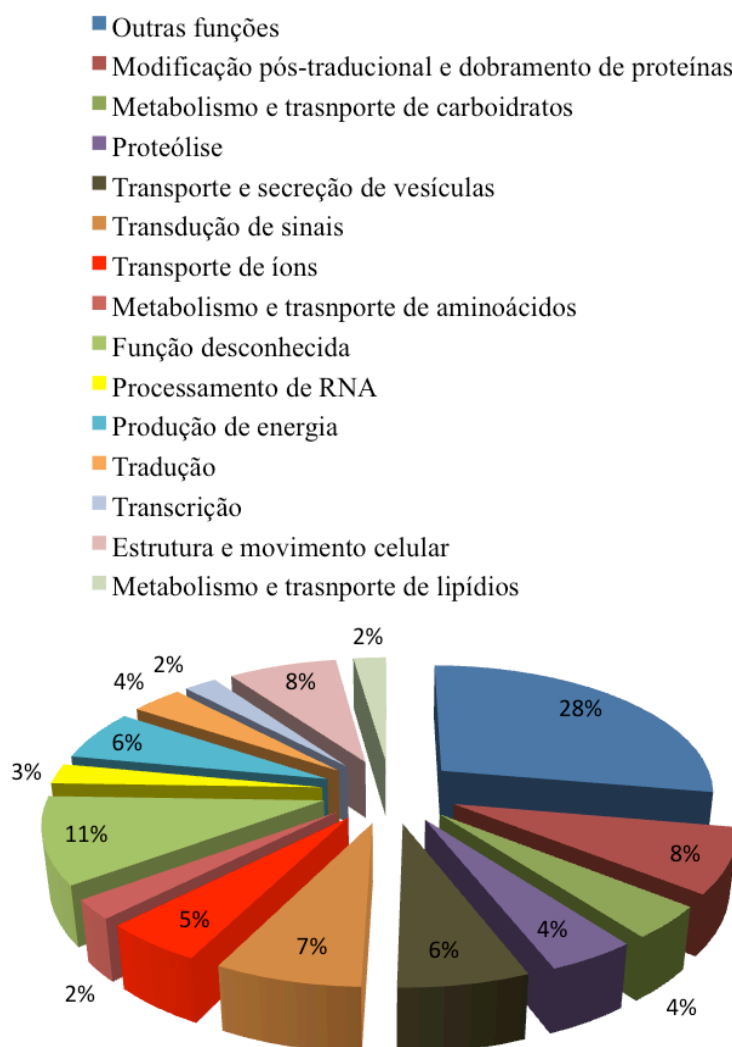


Figura 8. Categorização de proteínas de córtex pré-frontal de ratos. Proteínas identificadas por LC-MS/MS, usando espectrômetro de massas híbridos LTQ Orbitrap XL, foram categorizadas, segundo banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot ou Gene Ontology, por suas funções biológicas.

Dentre as 923 proteínas identificadas, vale ressaltar quatro proteínas que se encontram descritas na literatura como relacionadas a processos de aprendizagem e memória, conforme foi encontrado no banco de dados do sítio www.geneontology.org. As quatro proteínas são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Proteínas identificadas por LC-MS/MS oriundas de córtex pré-frontal de rato envolvidas com aprendizagem e memória. Função biológica sugerida pelo banco de dados do Gene Gene Ontology por meio de ESG.

Número de acesso Uniprot	Nome	Localização ^a	Processo biológico ^b	Identidade ^c	Homologia ^d	Homologa em <i>H. sapiens</i>
P22063	Contactin-2	Membrana Plasmática	Adesão celular; crescimento e orientação de axônios	91 % (919/1016 resíduos de AAs)	95% (964/1016 resíduos de AAs)	contactin-2 precursor
P63319	Protein kinase C gamma (PKC)	Citosol (sinaptossoma)	Sinalização intracelular	99% (690/697 resíduos de AAs)	99% (694/697 resíduos de AAs)	Protein kinase C type gamma
P07171	Calbidin	Citosol	Ligação a íons cálcio, plasticidade sináptica	257/261 (98% resíduos de AAs)	259/261 (99% resíduos de AAs)	Calbindin
D4ADJ6	gp78	Membrana plasmática (dendrito)	Regula ubiquitinação de proteínas	88% (567/643 resíduos de AAs)	92% (589/643 resíduos de AAs)	E3 ubiquitin-protein ligase AMFR

^a Localização mais provável predita por ESG.

^b Processo biológico envolvido com base no banco de dados Gene Ontology.

^c Identidade da sequência com proteína de homóloga de *H. sapiens* realizada por BLAST.

^d Homologia da sequência com proteína de *H. sapiens* realizada por BLAST.

6 Discussão

As intrincadas redes neurais envolvidas nos processamentos de informações tornam a compreensão do funcionamento do cérebro uma tarefa extremamente desafiadora. A abordagem neuroproteômica, por meio de estudos dos perfis proteicos de regiões cerebrais, pode ser útil na elucidação dos mecanismos e das funções biológicas desempenhados por cada uma dessas regiões.

Com o intuito de conduzir uma análise compreensiva de proteínas expressas no córtex pré-frontal de rato, uma abordagem do tipo *shotgun proteomics offline* foi utilizada. IEF em tiras de faixa de pH imobilizado foi usada como primeira dimensão de separação de peptídeos. Nanocromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo *Orbitrap* constituiu a segunda dimensão. Como resultados, foram identificadas 923 proteínas. Da totalidade de proteínas identificadas, 197 (21,34 %) são proteínas citossólicas envolvidas em processos biológicos como anabolismo e catabolismo de carboidratos, lipídios e resíduos de aminoácidos; transdução de sinais; tradução de mRNAs, dobramento de outras proteínas; degradação proteica, entre outras. Foi possível a identificação de 170 proteínas de membrana plasmática (18,42 %), das quais a maioria está envolvida com a transdução de sinais e transporte de íons.

Esse número de proteínas identificadas demonstra que o pré-fracionamento na isoeletrofocalização dos peptídeos e o uso de espectrômetro de massas híbrido com analisador de massas do tipo *Orbitrap* aumenta a eficiência de identificação de proteínas quando comparamos com os resultados obtidos por Katagiri e colaboradores (2010), onde apenas 149 proteínas foram identificadas a partir de extratos de córtex de ratos, por meio de uma abordagem de separação de proteínas via SDS-PAGE seguida de digestão em gel e análise de massas usando um nano-LC-Q-TOF MS/MS.

A abordagem proteômica aqui empregada identificou 2062 peptídeos únicos de córtex pré-frontal, bem próximo da soma de 2099 peptídeos identificados por Katagiri e colaboradores (2010) em todas as regiões cerebrais por eles estudadas (córtex frontal, córtex parietal, córtex occipital, hipocampo, tálamo e amígdala).

Embora exista uma diferença bem acentuada entre os números de proteínas aqui identificadas com relação ao trabalho de Katagiri e colaboradores (2010), é importante destacar que proporcionalmente as razões dos números de proteínas de determinadas localizações sobre o número de proteínas totais se assemelham. Os percentuais obtidos por foram: membrana plasmática (18 %), citosol (18 %), citoesqueleto (6 %), mitocôndria (21 %), núcleo (5 %), extracelular (4 %), intracelular (18 %), enquanto os que encontramos foram: 18 % para a membrana plasmática, 21 % para citosol, 8 % para citoesqueleto, 13 % para mitocôndrias, 10 % para o núcleo e 3 % para as proteínas extracelulares.

Dentre as proteínas de membrana identificadas podemos destacar a contactin-2 e a gp78 por serem descritas na literatura como estando envolvidas em processos de aprendizagem e memória.

Contactin-2 é homóloga a *transient axonal glycoprotein 1* (TAG-1) de *H. sapiens*, que é uma proteína de membrana, expressa em neurônios e células da glia, e desempenha um papel importante no crescimento (Wolman, Sittaramane et al., 2008), migração e ramificação do axônio durante o desenvolvimento. Estudos comportamentais com camundongos deficientes para TAG-1 demonstram um déficit cognitivo quando postos em um labirinto aquático de Morris, testes de reconhecimentos de objetos, aumento da latência a estímulos nocivos (Savvaki, Panagiotaropoulos et al., 2008). Segundo Tachi e colaboradores (Tachi, Hashimoto et al., 2010) a TAG-1 pode competir com a proteína *TGFbeta2-induced neuronal death* pela ligação ao domínio extracelular da *amyloid beta precursor protein* (APP), evitando assim o disparo de uma via de sinalização intracelular de morte celular. Segundo esse estudo a redução na expressão da TAG-1 é idade relacionada e predispõem a morte celular de neurônios podendo estar relacionada com o início e progresso da doença de Alzheimer's.

O receptor do fator de motilidade autócrina (AMFR) é uma glicoproteína que tem sete motivos transmembrana em sua estrutura, além de possuir massa molecular de 78 kDa (gp 78). Segundo os estudos de Luo e colaboradores (2002), a gp78 apresenta-se superexpressa em ratos durante tarefas de aprendizagem em labirintos em T de Stone e no labirinto aquático de Morris. No mesmo estudo foi demonstrado, em ratos de idade avançada, que apresentam déficit de aprendizagem, que os níveis de gp78 encontram-se reduzidos quando comparado com ratos jovens (Luo, Long et al., 2002).

Além das duas proteínas acima descritas, podemos ainda destacar *protein Kinase C gamma* (PKCgamma).

O gene que a codifica é conservado em humanos, ratos, cachorros, vacas e camundongos. Em pesquisa realizada por Van der Zee e colaboradores (1997) mostraram que a um aumento nos níveis de PKCgamma em células piramidais do hipocampo de ratos, camundongos e coelhos após 24 horas da aprendizagem associativa ou espacial de uma tarefa. Experimentos realizados por Alvarez-Jaimes e colaboradores (2004) realizaram micro infusões no núcleo accumbens de oligonucleotídeos anti-senso para PKCgamma provocaram déficit em treinos de aprendizagem espacial de ratos. Estudos recentes demonstram que a PKCgamma está em maiores quantidades na região CA1 do hipocampo de camundongos treinados a escapar do labirintos de Barnes em experimentos de aprendizagem espacial (Nithianantharajah e Murphy, 2009).

Finalmente, ressaltamos a *calbindin*, que é uma proteína constituída por 596 resíduos de aminoácidos que encontra-se localizada no citosol e possui a função molecular de ligar-se a íons cálcio. Essa proteína desempenha papel na *long-term potentiation* (LTP) e na maturação funcional do hipocampo (Molinari, Battini et al., 1996; Real, Simón et al., 2011). Molinari e colaboradores (1996) descreveram que em ratos que apresentam uma expressão reduzida de *calbindin* apresentam déficits de memória. No entanto estudos realizados por Dumas e colaboradores (2004) descrevem que um aumento na expressão de *calbindin* no giro dentado está correlacionado com detrimento na aprendizagem espacial. Esses estudos mostram que a regulação dos níveis de *calbindin* são importantes pra o funcionamento adequado do hipocampo e estruturas relacionadas a aprendizagem e memória.

Visando identificar diferenças nos níveis de expressão de proteínas ou modificações pós-traducionais entre abelhas que foram submetidas a condicionamento operante, foram testados diferentes condições de 2DE. Inicialmente, foi usado um protocolo já estabelecido no laboratório com tampão 2D constituído por: urea 7 M, tiourea 2 M, triton X-100 2,5 %, anfólitos 0,5 %, DTT 85 mM e isopropanol 10 % (Garcia, Saraiva Garcia *et al.*, 2009). Após algumas alterações chegou-se a concentrações de separação eletroforéticas satisfatórias que foram obtidas com a mudança do detergente triton X-100 por CHAPS 1%, aumentar a concentração de anfólitos de 0,5 % para 1,5 % e também a de reposição de DTT 3,5 %. A substituição do triton X-100 por CHAPS melhorou um pouco a focalização de proteínas de massa molecular superior a 66 kDa e ainda tornou a condição do tampão 2D compatível com

o DIGE, uma vez que o Triton X-10 atenua a fluorescência dos fluoróforo. O aumento do anfólitos possibilitou uma melhor focalização quando comparada com as condição inicial, isso se deu devido as propriedades que os anfólitos possuem de intensificar a solubilidade das proteínas e da produção de uma condutividade mais uniforme ao longo do gradiente de pH sem altera-lo. A reposição de DTT apresentou um resultado bem satisfatório, isso porque durante o processo de focalização das proteínas parte do DTT que estava na solução do tampão 2D acaba sendo depletado, pois ao longo da focalização parte dele vai em direção ao ânodo o que pode levar a reformulação de pontes de enxofre intra e extra moleculares. Isso tem como consequência o aumento da insolubilidade de algumas proteínas como pode ser constado pela presença de estrias horizontais nos géis levando a uma baixa focalização (Pennington, Mcgregor *et al.*, 2004).

Algumas das otimizações obtidas na etapa de padronização, que possuíam compatibilidade com a metodologia DIGE foram usadas com a finalidade de se identificar diferenças nos níveis de proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e treinado para os dois tipos de treinamento. Embora a metodologia DIGE permita uma redução na quantidade de géis a serem realizados, por separarem diferentes amostras em um mesmo gel, permitindo assim uma comparação mais fidedigna, isso devido a diminuição da variabilidade das condições micro ambientais onde a separação ocorre. Os experimentos aqui realizados por essa metodologia não apresentaram um padrão de reprodutibilidade experimental entre géis corridos nas mesmas condições e com o mesmo grupo amostral. Isso impossibilitou que o pareamento de *spots*. De alguma foram os corantes derivados cianina parecem ter atrapalhado a focalização de proteínas quando se compara o perfil eletroforético de um gel do experimento DIGE e algum dos géis do processo de padronização (Figura 3), sendo que apenas um gel dentre os seis realizados com o experimento DIGE demonstraram uma similaridade com o perfil obtido nos géis de padronização (figura 6D-E). Durante o processo de padronização dos géis a melhora substancial ocorreu com a utilização de reposição de DTT na proximidade do eletrodo do cátodo, isso poderia ser realizado em um experimento da metodologia DIGE caso o DTT não reagisse com o corante, competindo assim com a amostra marcada e provocando uma atenuação na fluorescência e podendo levar a análises erradas.

Devido à reduzida quantidade de amostra que era disponível de abelhas treinadas não foi possível, realizar análises de eletroforese bidimensional tradicionais. Porém um gel de cérebro de abelhas que foram submetidas a treinamento de condicionamento operante em

equipamento sem barra foi feito e comparado com os dados encontrados por Garcia (2009). Garcia (2009) observou em seus experimentos que abelhas que foram treinadas apresentavam uma expressão aumentada de uma isoforma de arginina quinase que não fora observado em abelhas pertencentes ao grupo controle. Esperava-se que por meio de experimentos DIGE, que possuem uma sensibilidade maior do que a da metodologia que fora usada por Garcia, esses dados pudessem ser confirmados, mas a falta de reprodutibilidade dessa técnica em nossos experimentos impossibilitou essas análises.

7 Conclusões

Até o presente momento, não foi possível a identificação de proteínas diferencialmente expressas entre abelhas treinadas e não treinadas. Os dados aqui encontrados, não reproduziram os experimentos de Garcia (2009), onde uma isoforma da arginina quinase foi encontrada como diferencialmente expressa em abelhas treinadas. Sugere-se que o experimento deva ser repetido mais uma vez com o intuito de averiguar se realmente há diferença no padrão de proteínas entre abelhas treinadas e não treinadas no paradigma operante. Pode se supor que o tempo necessário dos treinamentos aqui realizados não seja suficiente para a síntese de novas proteínas, ou o número de cópias dessas proteínas é muito baixo a ponto de não ser possível a identificação de proteínas por abordagens em gel de eletroforese. Sendo assim é recomendável que mais análises, utilizando metodologias mais sensíveis que a eletroforese bidimensional, sendo uma boa abordagem uma análise proteômica com o uso de reagentes de quantificação relativa e absoluta iTRAQ. No entanto a metodologia DIGE que está em fase de implementação no laboratório ainda pode ser utilizada em análises futuras após a padronização da técnica.

A análise proteômica de córtex pré-frontal de rato identificou 923 proteínas, valor seis vezes maior quando comparado a outros estudos presentes na literatura. A utilização da separação isoeletrica no fracionamento de peptídeos proporcionou diretamente uma diminuição na complexidade da amostra o que permitiu a detecção de alguns peptídeos presentes em baixos níveis. Essa estratégia consequentemente leva a um maior número de identificações. Espera-se obter um número ainda maior de identificações ampliando-se o tempo de separação cromatográfica e análise espectrométrica no equipamento. As proteínas identificadas foram categorizadas de acordo com sua localização e função biológica. Ressalta-se quatro delas como sendo relacionadas a processos de aprendizagem: contactin-2, calbindin, subunidade gamma da proteína quinase c (PKCgamma) e gp78. Os dados encontrados nesse trabalho ampliam a listas de proteínas presentes na região de córtex frontal de ratos e serviram de base para análises proteômicas comparativas de níveis de expressão proteica entre animais condicionados e controles em um futuro próximo

8 Perspectivas

Pretende-se dar continuidade com os estudos de bioquímica do comportamento e aprendizagem com ratos em um projeto de doutorado já aprovado, através da combinação de técnicas comportamentais, bioquímicas, genéticas e histológicas. Almeja-se encontrar diferenças nos níveis de expressão de proteínas entre os ratos submetidos ao paradigma operante. Serão usadas espectrometria de massas de alto desempenho e co-validação funcional. As proteínas que deverão ser identificadas neste projeto serão objeto de investigação culminando com a validação de pelo menos uma proteína como fator essencial no processo de aprendizagem.

Para se alcançar tal objetivo propõem-se:

- Obter amostra por meio de treinamento de ratos e dissecação de encéfalos;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos por meio de análise proteômica quantitativa;
- Realizar análise de proteínas de membrana plasmática através do enriquecimento dessas frações por centrifugação;
- Identificar complexos proteicos que possuam proteínas diferencialmente expressa por meio de eletroforese (BN-SDS-PAGE), imunoprecipitação e *western blotting*;
- Realizar testes de interação de proteínas diferencialmente expressas com outras proteínas de hipocampo com o intuito de elencar possíveis parceiros celulares;
- Determinar a localização tissular de proteínas diferencialmente expressas marcadas com anticorpo por meio de imuno-histoquímica;
- Correlacionar os níveis de RNA mensageiro referente às proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de ratos por qRT-PCR;
- Como estratégia de validação, propõe-se aplicar o mesmo protocolo de condicionamento operante em animais submetidos ao silenciamento gênico;

No que diz respeito aos estudos com *M. quadrisfasciata* os resultados são promissores e terão continuidade em nosso laboratório.

9 Referências Bibliográficas

ACHESON, A. et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature**, v. 374, n. 6521, p. 450-3, Mar 30 1995.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**, v. 124, n. 3, p. 319-335, 1965.

ALVAREZ-JAIMES, L. et al. Spatial learning in rats is impaired by microinfusions of protein kinase C-gamma antisense oligodeoxynucleotide within the nucleus accumbens. **Neurobiol Learn Mem**, v. 81, n. 2, p. 120-36, Mar 2004.

BALDWIN, A. E.; SADEGHIAN, K.; KELLEY, A. E. Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 1063-71, Feb 1 2002.

BALLEINE, B. W.; DICKINSON, A. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 4-5, p. 407-19, Apr-May 1998.

BALLIF, B. A. et al. Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. **Mol Cell Proteomics**, v. 3, n. 11, p. 1093-101, Nov 2004.

BAYES, A.; GRANT, S. G. Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 9, p. 635-46, Sep 2009.

BECKER, M.; SCHINDLER, J.; NOTHWANG, H. G. Neuroproteomics - the tasks lying ahead. **ELECTROPHORESIS**, v. 27, n. 13, p. 2819-29, Jul 2006.

BEN-SHAHAR, Y. The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 191, n. 11, p. 987-94, Nov 2005.

BENJAMIN, P. R.; STARAS, K.; KEMENES, G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. **Learn Mem**, v. 7, n. 3, p. 124-31, May-Jun 2000.

BEYE, M. et al. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**, v. 114, n. 4, p. 419-29, Aug 22 2003.

BJÖRN, B. Spontaneous decisions and operant conditioning in fruit flies. **Behavioural Processes**, v. 87, n. 1, p. 157-164, 2011.

BLOCH, G.; TOMA, D. P.; ROBINSON, G. E. Behavioral rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain. **J Biol Rhythms**, v. 16, n. 5, p. 444-56, Oct 2001.

BOTZER, D.; MARKOVICH, S.; SUSSWEIN, A. J. Multiple memory processes following training that a food is inedible in *Aplysia*. **Learn Mem**, v. 5, n. 3, p. 204-19, Jul-Aug 1998.

BRANDÃO, M. L. As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. **São Paulo: EPU**, v. 224, p. 1, 2004.

BREMBS, B. Operant conditioning in invertebrates. **Curr Opin Neurobiol**, v. 13, n. 6, p. 710-7, Dec 2003.

_____. Operant learning of *Drosophila* at the torque meter. **J Vis Exp**, n. 16, 2008.

_____. The importance of being active. **J Neurogenet**, v. 23, n. 1-2, p. 120-6, 2009.

CAMARGO, C. A.; Sex determination in bees. XI. Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. **J. Apic. Res.** 18: p. 77-84, 1979.

CARGILE, B. J.; TALLEY, D. L.; STEPHENSON, J. L., JR. Immobilized pH gradients as a first dimension in shotgun proteomics and analysis of the accuracy of pI predictability of peptides. **ELECTROPHORESIS**, v. 25, n. 6, p. 936-45, Mar 2004.

CHEN, W. et al. Proteomic comparison between human young and old brains by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 209-216, 2003.

CHEN, Y. et al. Operant conditioning of rat soleus H-reflex oppositely affects another H-reflex and changes locomotor kinematics. **J Neurosci**, v. 31, n. 31, p. 11370-5, Aug 3 2011.

CHITTKA, L.; THOMSON, J. D. **Cognitive ecology of pollination : animal behavior and floral evolution**. Cambridge ; New York, NY: Cambridge University Press, 2001. xiii, 344 p.

CHOUDHARY, J.; GRANT, S. G. N. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 440-445, 2004.

CORBIT, L. H.; BALLEINE, B. W. The role of prelimbic cortex in instrumental conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 146, n. 1-2, p. 145-157, 2003.

CRUZ, G. et al. Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the <i>Apis mellifera</i> major royal jelly protein 1. **Apidologie**, v. 42, n. 3, p. 252-269, 2011.

DUMAS, T. C. et al. Overexpression of calbindin D(28k) in dentate gyrus granule cells alters mossy fiber presynaptic function and impairs hippocampal-dependent memory. **Hippocampus**, v. 14, n. 6, p. 701-9, 2004.

ESTEVEZ, M. A.; ABEL, T. Epigenetic Mechanisms of Memory Consolidation

Brain, Behavior and Epigenetics. In: PETRONIS, A. e MILL, J. (Ed.): Springer Berlin Heidelberg, 2011. p.267-285. (Epigenetics and Human Health).

FAHRBACH, S. E. STRUCTURE OF THE MUSHROOM BODIES OF THE INSECT BRAIN. **Annu Rev Entomol**, v. 51, n. 1, p. 209-232, 2006.

FAHRBACH, S. E. et al. Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. **J Neurobiol**, v. 57, n. 2, p. 141-51, Nov 2003.

FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **J Neurosci**, v. 21, n. 16, p. 6395-404, Aug 15 2001.

FOUNTOULAKIS, M. et al. The rat brain hippocampus proteome. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 819, n. 1, p. 115-29, May 5 2005.

GARCIA, L. et al. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. **J Proteome Res**, v. 8, n. 3, p. 1464-73, Mar 2009.

GHARAHDAGHI, F. et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. **ELECTROPHORESIS**, v. 20, n. 3, p. 601-605, 1999.

GIL, M.; MENZEL, R.; DE MARCO, R. J. Side-specific reward memories in honeybees. **Learn Mem**, v. 16, n. 7, p. 426-32, Jul 2009.

GIURFA, M. et al. Colour preferences of flower-naive honeybees. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 177, n. 3, p. 247-259, 1995.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression. **Neuroscience**, v. 148, n. 4, p. 893-906, Sep 21 2007.

GOULD, E.; GROSS, C. G. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 619-23, Feb 1 2002.

GUMBERT, A. Color Choices by Bumble Bees (*Bombus terrestris*): Innate Preferences and Generalization after Learning. **Behav Ecol Sociobiol**, v. 48, n. 1, p. 36-43, 2000.

HASSELMANN, M. et al. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 519-522, 2008.

HASSELMO, M. E.; EICHENBAUM, H. Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. **Neural Netw**, v. 18, n. 9, p. 1172-90, Nov 2005.

HEISENBERG, M. Mushroom body memoir: from maps to models. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 266-75, Apr 2003.

HERNÁNDEZ, L. G. et al. Worker Honeybee Brain Proteome. **J Proteome Res**, v. 11, n. 3, p. 1485-1493, 2012/03/02 2011.

HERNANDEZ, P. J.; ABEL, T. The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 293-311, 2008.

HOSAKA, M.; SUDHOF, T. C. Homo- and heterodimerization of synapsins. **J Biol Chem**, v. 274, n. 24, p. 16747-53, Jun 11 1999

HUBNER, N. C.; REN, S.; MANN, M. Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. **PROTEOMICS**, v. 8, n. 23-24, p. 4862-4872, 2008.

JARAU, S. et al. A stingless bee uses labial gland secretions for scent trail communication (*Trigona recursa* Smith 1863). **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 190, n. 3, p. 233-9, Mar 2004.

JONKMAN, S. et al. The rat prelimbic cortex mediates inhibitory response control but not the consolidation of instrumental learning. **Behav Neurosci**, v. 123, n. 4, p. 875-85, Aug 2009.

KANDEL, E. R. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, November 2, 2001 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of neural science**. 4th. New York, NY ; London: McGraw-Hill, 2000. xli, 1414 p. ISBN 0838577016 0071120009 (International edition).

KANG, H.; SCHUMAN, E. M. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. **Science**, v. 273, n. 5280, p. 1402-6, Sep 6 1996.

KATAGIRI, T. et al. Proteomic analysis of proteins expressing in regions of rat brain by a combination of SDS-PAGE with nano-liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. **Proteome Sci**, v. 8, p. 41, 2010.

KERR, W. E., LELO, E. Sting glands in stingless bees - a vestigial character (Hymenoptera, Apidae). *J. New York Entomol. Society*, 70: 190-214p. 1962.

KERR, W. E., ESCH, H. Comunicação entre as abelhas sociais brasileiras e sua contribuição para o entendimento da sua evolução. *Ciência e Cultura (SP)* **17 (4)**: 529-538p. 1965.

KERR, W. E., NIELSEN, R. A. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics* 54: 859-866p. 1966.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 6, p. 453-62, Jun 2002.

KISCH, J.; ERBER, J. Operant conditioning of antennal movements in the honey bee. **Behavioural Brain Research**, v. 99, n. 1, p. 93-102, 1999.

KLANN, E.; SWEATT, J. D. Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 247-259, 2008.

KOLB, B.; CIOE, J. Organization and Plasticity of the Prefrontal Cortex of the Rat Prefrontal Cortex: From Synaptic Plasticity to Cognition. In: OTANI, S. (Ed.): Springer US, 2004. p.1-32. ISBN 978-1-4020-7949-8.

KOLB, B. et al. Age, experience and the changing brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 2, p. 143-59, Mar 1998.

KUCHARSKI, R. et al. A Royal Jelly Protein Is Expressed in a Subset of Kenyon Cells in the Mushroom Bodies of the Honey Bee Brain. **Naturwissenschaften**, v. 85, n. 7, p. 343-346, 1998.

LEUNER, B.; GOULD, E. Structural plasticity and hippocampal function. **Annu Rev Psychol**, v. 61, p. 111-40, C1-3, 2010.

LEX, B.; HAUBER, W. The role of dopamine in the prelimbic cortex and the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. **Cereb Cortex**, v. 20, n. 4, p. 873-83, Apr 2010.

LI, K.; KLEMMER, P.; SMIT, A. Interaction proteomics of synapse protein complexes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3195-3202, 2010.

LORENZETTI, F. D.; BAXTER, D. A.; BYRNE, J. H. Molecular Mechanisms Underlying a Cellular Analog of Operant Reward Learning. **Neuron**, v. 59, n. 5, p. 815-828, 2008.

LU, B.; GOTTSCHALK, W. Modulation of hippocampal synaptic transmission and plasticity by neurotrophins. In: SEIL, F. J. (Ed.). **Progress in Brain Research**: Elsevier, v. Volume 128, 2000. p.231-241. ISBN 0079-6123.

LUKOWIAK, K. et al. Operant conditioning in Lymnaea: evidence for intermediate- and long-term memory. **Learn Mem**, v. 7, n. 3, p. 140-50, May-Jun 2000.

LUO, Y. et al. A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. **J Neurochem**, v. 80, n. 2, p. 354-61, Jan 2002.

MALESZKA, J. et al. Effect of age, behaviour and social environment on honey bee brain plasticity. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 195, n. 8, p. 733-40, Aug 2009.

MANN, M. et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. **Trends Biotechnol**, v. 20, n. 6, p. 261-8, Jun 2002.

MAURYA, D. K.; SUNDARAM, C. S.; BHARGAVA, P. Proteome profile of whole cerebellum of the mature rat. **PROTEOMICS**, p. n/a-n/a, 2010.

MCGAUGH, J. L. **Memory--a Century of Consolidation**. 2000. 248-251 (287). Science,

MENZEL, R. Spectral sensitivity and color vision in invertebrates. In *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VII/6A (ed. H. Autrum),. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. p.503–580. 1979.

MENZEL, R. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. **Learn Mem**, v. 8, n. 2, p. 53-62, Mar-Apr 2001.

MENZEL, R.; GIURFA, M. Dimensions of cognition in an insect, the honeybee. **Behav Cogn Neurosci Rev**, v. 5, n. 1, p. 24-40, Mar 2006.

MENZEL, R. et al. Behavioral, neural and cellular components underlying olfactory learning in the honeybee. **J Physiol Paris**, v. 90, n. 5-6, p. 395-8, 1996.

MENZEL, R. et al. Behavioral, neural and cellular components underlying olfactory learning in the honeybee. **Journal of Physiology-Paris**, v. 90, n. 5-6, p. 395-398, 1996.

MENZEL, R.; MULLER, U. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. **Annu Rev Neurosci**, v. 19, p. 379-404, 1996.

MICHEL, M.; GREEN, C. L.; LYONS, L. C. PKA and PKC are required for long-term but not short-term in vivo operant memory in *Aplysia*. **Learn Mem**, v. 18, n. 1, p. 19-23, Jan 2011.

MICHENER, C. D. Comparative Social Behavior of Bees. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 14, p. 299-342, 1969.

MICHENER, C. D. Classification of the Apidea. University of Kansas Science Bulletin, 54, 75-164p.1990.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2nd. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. xvi, 953 p., 20 p. of plates ISBN 9780801885730

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167-202, 2001.

MOLINARI, S. et al. Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 15, p. 8028-33, Jul 23 1996.

MOURE J. S., URBAN D., Melo G. A. R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, 1058p. 2007.

MOURE J.S., CAMARGO J.M.F. *Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil. *Revta Bras. Zool.* 11: 289-296p. 1994.

MOZZACHIODI, R. et al. Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. **Nat Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 1146-1148, 2008. ISSN 1097-6256.

NIEH, J. C.; RAMÍREZ, S.; NOGUEIRA-NETO, P. Multi-source odor-marking of food by a stingless bee, *Melipona mandacaia*. **Behav Ecol Sociobiol**, v. 54, n. 6, p. 578-586, 2003.

NITHIANANTHARAJAH, J.; MURPHY, M. Experience on the Barnes spatial maze influences PKC γ levels in the hippocampus. **Int J Neurosci**, v. 119, n. 7, p. 1014-30, 2009.

Nogueira-Neto, P. Vida e criação de abelhas sem ferrão. São Paulo, SP. Edição Nogueirapis, 446p. 1997.

PARVEZ, K. et al. Canadian Association of Neurosciences Review: learning at a snail's pace. **Can J Neurol Sci**, v. 33, n. 4, p. 347-56, Nov 2006.

PATIL, S. S. et al. Differences in hippocampal protein levels between C57Bl/6J, PWD/PhJ, and Apodemus sylvaticus are paralleled by differences in spatial memory. **Hippocampus**, v. 21, n. 7, p. 714-23, Jul 2011.

PAUL E, G. Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs amnesia. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 201-211, 2008.

PENNINGTON, K. et al. Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. **PROTEOMICS**, v. 4, n. 1, p. 27-30, Jan 2004.

PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **ELECTROPHORESIS**, v. 20, n. 18, p. 3551-67, Dec 1999.

PESSOTTI, I. Aprendizagem de discriminação como um critério de classificação de abelhas. *Revista Interamericana de Psicologia*. 3-4, p.171-182. 1967.

PESSOTTI, I. Aprendizagem em abelhas. VI - Discriminação condicional em *Melipona rufiventris*. *Revista Brasileira de Psicologia*. 41 (4), p. 681-693. 1981.

PIENAAR, I. S.; DANIELS, W. M.; GOTZ, J. Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research. **J Neural Transm**, v. 115, n. 10, p. 1413-30, Oct 2008.

POLLAK, D. D. et al. An integrated map of the murine hippocampal proteome based upon five mouse strains. **ELECTROPHORESIS**, v. 27, n. 13, p. 2787-2798, 2006.

PRETE, F. R. **Complex worlds from simpler nervous systems**. Cambridge, Mass.: MIT Press, 2004. xx, 436 p. ISBN 02621622370262661748 (pbk.).

QI, Z.; GOLD, P. E. Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. **Learn Mem**, v. 16, n. 5, p. 308-14, May 2009.

RAPANELLI, M.; FRICK, L. R.; ZANUTTO, B. S. Differential gene expression in the rat hippocampus during learning of an operant conditioning task. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p. 1031-1038, 2009.

_____. Learning an operant conditioning task differentially induces gliogenesis in the medial prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e14713, 2011.

RAPANELLI, M. et al. Plasticity in the rat prefrontal cortex: linking gene expression and an operant learning with a computational theory. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8656, 2010.

REAL, M. A. et al. Phenotypic changes in calbindin D28K immunoreactivity in the hippocampus of Fmr1 knockout mice. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 13, p. 2622-2636, 2011.

REUL, J. M. et al. Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. **Epigenetics**, v. 4, n. 7, p. 434-9, Oct 1 2009.

ROBINSON, E. Physiology as a caste-defining feature. **Insectes Sociaux**, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2009.

ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annu Rev Entomol**, v. 37, p. 637-65, 1992.

_____. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. **Am Nat**, v. 160 Suppl 6, p. S160-72, Dec 2002.

ROSENEGGER, D.; LUKOWIAK, K. The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. **Mol Brain**, v. 3, p. 24, 2010.

ROUBIK, D. W. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge University Press, New York, 514p. 1989.

RUDY, J. W. **The neurobiology of learning and memory**. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2008. xvii, 380 p. ISBN 9780878936694

SAITO, N.; SHIRAI, Y. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. **J Biochem**, v. 132, n. 5, p. 683-7, Nov 2002.

SAVVAKI, M. et al. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. **Mol Cell Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 478-90, Nov 2008.

SCHULZE SCHENCKING, M.; Untersuchungen zur visuellen Lerngeschwindigkeit und Lernkapazität bei Bienen, Hummeln und Ameisen. *Z. Tierpsychol.* 27: 513–552p. 1969

SHEVCHENKO, A.; VALCU, C.-M.; JUNQUEIRA, M. Tools for exploring the proteomes. **J Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 137-144, 2009.

SILVERMAN-GAVRILA, L. B. et al. Expression, phosphorylation, and glycosylation of CNS proteins in aversive operant conditioning associated memory in *Lymnaea stagnalis*. **Neuroscience**, v. 186, n. 0, p. 94-109, 2011.

SKINNER, B.F. The behavior of organisms. New York: D.Appleton-Century.457p. 1938.

SKÖLD, K. et al. A neuroproteomic approach to targeting neuropeptides in the brain. **PROTEOMICS**, v. 2, n. 4, p. 447-454, 2002.

SMITH-ROE, S. L.; KELLEY, A. E. Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning. **J Neurosci**, v. 20, n. 20, p. 7737-42, Oct 15 2000.

SRINIVASAN, M. V. Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. **Annu Rev Entomol**, v. 55, p. 267-84, 2010.

TACHI, N. et al. TAG-1 is an inhibitor of TGFbeta2-induced neuronal death via amyloid beta precursor protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 1, p. 119-25, Mar 26 2010.

TAKAHASHI, H. et al. Learning-stage-dependent, field-specific, map plasticity in the rat auditory cortex during appetitive operant conditioning. **Neuroscience**, v. 199, n. 0, p. 243-258, 2011.

THIERRY, A. M. et al. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. **Hippocampus**, v. 10, n. 4, p. 411-9, 2000.

TRUJILLO-PISANTY, I. et al. Cannabinoid receptor blockade reduces the opportunity cost at which rats maintain operant performance for rewarding brain stimulation. **J Neurosci**, v. 31, n. 14, p. 5426-35, Apr 6 2011.

VAN DEN OEVER, M. C. et al. A Proteomics Approach to Identify Long-Term Molecular Changes in Rat Medial Prefrontal Cortex Resulting from Sucrose Self-Administration. **J Proteome Res**, v. 5, n. 1, p. 147-154, 2006/01/01 2005.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G.; DISTERHOFT, J. F. Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 531-72, Apr 1997.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1-20, Sep 29 2006.

WANG, H.; HU, Y.; TSIEN, J. Z. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. **Prog Neurobiol**, v. 79, n. 3, p. 123-35, Jun 2006.

WEITZDORFER, R. et al. Changes of hippocampal protein levels during postnatal brain development in the rat. **J Proteome Res**, v. 5, n. 11, p. 3205-12, Nov 2006.

WEITZDORFER, R. et al. Changes of hippocampal signaling protein levels during postnatal brain development in the rat. **Hippocampus**, v. 18, n. 8, p. 807-13, 2008.

WIERSMA-MEEMS, R.; VAN MINNEN, J.; SYED, N. I. Synapse formation and plasticity: the roles of local protein synthesis. **Neuroscientist**, v. 11, n. 3, p. 228-37, Jun 2005.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 13, p. 19-50, 1996.

WILSON, E. O.; HOLLOBLER, B. Eusociality: origin and consequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 38, p. 13367-71, Sep 20 2005.

WISNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; MANN, M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. **J Proteome Res**, v. 8, n. 12, p. 5674-8, Dec 2009.

WOLMAN, M. A. et al. Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. **Neural Dev**, v. 3, p. 6, 2008.

YAMAUCHI, T. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 8, p. 1342-54, Aug 2005.

YANG, L.; SUN, Z. S.; ZHU, Y.-P. Proteomic Analysis of Rat Prefrontal Cortex in Three Phases of Morphine-Induced Conditioned Place Preference. **J Proteome Res**, v. 6, n. 6, p. 2239-2247, 2007/06/01 2007.

YANG, X. et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography mass spectrometric profiling of the rat hippocampal proteome. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 3, p. 501-5, Feb 2011.

ZHANG, S. et al. Visual working memory in decision making by honey bees. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 14, p. 5250-5, Apr 5 2005.

ZHANG, X. et al. Proteomic profiling of the insoluble fractions in the rat hippocampus post-propofol anesthesia. **Neurosci Lett**, v. 465, n. 2, p. 165-70, Nov 13 2009.

ZHANG, X. et al. An improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome project. **PROTEOMICS**, v. 7, n. 14, p. 2340-9, Jul 2007.