



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA**

Adailson Henrique Domingues

**ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E SUA
CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA NO VENENO DA
ABELHA *Apis mellifera*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu, SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

**ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E SUA CARACTERIZAÇÃO
PROTEOMICA NO VENENO DA ABELHA *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais (Bioquímica).

Adailson Henrique Domingues

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu, SP
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Domingues, Adailson Henrique.

Isolamento de microvesículas e sua caracterização proteômica no veneno da abelha *Apis mellifera* / Adailson Henrique Domingues. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

Capes: 20800002

1. Proteômica. 2. Venenos de Abelha. 3. Espectrometria de massa. 4. Vesículas Extracelulares.

Palavras-chave: Análise proteômica; Envenenamento por abelhas; Espectrometria de massas; Microvesículas extracelulares; *Nanoparticle Tracking Analysis*.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ADAILSON HENRIQUE DOMINGUES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 01 dias do mês de março do ano de 2024, às 09:30 horas, no(a) Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - Campus Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ADAILSON HENRIQUE DOMINGUES, intitulada **ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E SUA CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA NO VENENO DA ABELHA *Apis mellifera***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - Campus Botucatu - Unesp, Prof. Dr. BRUNO CESAR ROSSINI (Participação Presencial) do(a) Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - Campus Botucatu - Unesp, Profa. Dra. KEITY SOUZA SANTOS (Participação Virtual) do(a) FM/São Paulo - USP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS

RESUMO

Conforme foram ocorrendo a multiplicação e propagação das abelhas africanizadas aumentaram acentuadamente os acidentes apílicos no Brasil, fazendo com que as autoridades de saúde pública incluíssem este acidente como objeto de vigilância sanitária. Cerca de 8,24% do número total de acidentes causados por animais peçonhentos no Brasil são provocados por múltiplas ferroadas de abelhas. Diante do crescente número de casos clínicos por acidentes por abelhas africanizadas e, conseqüentemente de óbitos, despertou-se a necessidade de se dispor de um tratamento eficaz. Assim, a equipe de pesquisadores do Centro de Veneno de Animais Peçonhentos – CEVAP/SP em parceria com o Instituto Vital Brazil (RJ), desenvolveram um soro antiapílico, o qual foi testado em um estudo clínico fase I/II em pacientes que sofreram múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas. Neste contexto, os estudos de venômica realizados por nosso grupo de pesquisa, evidenciaram que mesmo após a soroterapia específica desses pacientes, ainda existem toxinas do veneno da abelha no sangue dos pacientes tratados após a alta médica. Diante dessa observação clínica e tendo em vista estudos já publicados na literatura sobre a presença de microvesículas no veneno de serpentes, postularam-se hipóteses sobre a presença do veneno da abelha *Apis mellifera* presente na corrente sanguínea dos pacientes deste estudo clínico: “O veneno da abelha foi liberado na corrente sanguínea dos pacientes tardiamente pois estavam encapsulados em microvesículas oriundas do próprio veneno?” ou “O veneno da abelha foi liberado na corrente sanguínea dos pacientes tardiamente pois estavam encapsulados em microvesículas formadas pelo próprio organismo dos pacientes por meio do brotamento de microvilos na fagocitose celular dos antígenos circulantes após o acidente?”. Assim, o objetivo desse trabalho foi isolar as microvesículas extracelulares do veneno de *Apis mellifera*, quantificar e mensurar seus diâmetros, além de descrever o perfil proteico total dessas microvesículas por meio da estratégia de análise proteômica. Os resultados que foram obtidos neste trabalho evidenciaram múltiplas proteínas, onde dentre as 4 frações analisadas em laboratório, somente a fração 1 e 2 resultaram e expressaram conteúdo proteico, enzimático e fragmentos peptídicos. Muitas proteínas foram encontradas, e analisadas sua relação com o envenenamento provenientes das abelhas africanizadas *Apis mellifera*, em que o processo de atuação de tais proteínas ainda deixa dúvidas sobre os conceitos de seus impactos no corpo humano. Desta forma, supoe-se que, as microvesículas presentes no veneno da abelha *Apis mellifera* são frutos do desprendimento de brotos membranares de orgaos/tecidos durante sua vida, os quais podem ser conduzidos para a glandula de veneno pela proximidade que a mesma tem com o intestino deste inseto. Dentre várias proteínas encontradas a proteína acid phosphatase type 7 (Fosfatase ácida tipo 7) juntamente com a proteína Fosfatase 1H, têm relação ao envenenamento das abelhas africanizadas *Apis mellifera*, induz reações de toxicidade que são inoculadas durante a ferroadada no momento de defesa das abelhas melíferas, conduzido o acometido a reações alérgicas após envenenamento da apitoxina. Por fim os resultados obtidos neste trabalho serão de grande contribuição para próximos estudos envolvendo as proteínas caracterizadas nas microvesículas.

Palavras-chaves: Envenenamento por abelhas, análise proteômica, microveísulas extracelulares, espectrometria de massas, *Nanoparticle Tracking Analysis*.

ABSTRACT

As the multiplication and spread of Africanized bees occurred, beekeeping accidents in Brazil increased sharply, causing public health authorities to include this accident as an object of health surveillance. Around 8.24% of the total number of accidents caused by venomous animals in Brazil are caused by multiple bee stings. Faced with the growing number of clinical cases due to accidents involving Africanized bees and, consequently, deaths, the need for effective treatment has emerged. Thus, the team of researchers from the Venomous Animal Poison Center – CEVAP/SP, in partnership with the Vital Brazil Institute (RJ), developed an anti-epile serum, which was tested in a phase I/II clinical study on patients who suffered multiple Africanized bee stings. In this context, venomics studies carried out by our research group showed that even after specific serum therapy for these patients, bee venom toxins still exist in the blood of patients treated after medical discharge. In view of this clinical observation and taking into account studies already published in the literature on the presence of microvesicles in snake venom, hypotheses were postulated about the presence of *Apis mellifera* bee venom present in the bloodstream of patients in this clinical study: “The venom of the bee was released into the patients’ bloodstream late because they were encapsulated in microvesicles originating from the venom itself?” or “Was the bee venom released into the patients’ bloodstream late because they were encapsulated in microvesicles formed by the patients’ own bodies through the sprouting of microvilli in the cellular phagocytosis of circulating antigens after the accident?” Thus, the objective of this work was to isolate the extracellular microvesicles from *Apis mellifera* venom, quantify and measure their diameters, in addition to describing the total protein profile of these microvesicles through the proteomic analysis strategy. The results obtained in this work showed multiple proteins, where among the 4 fractions analyzed in the laboratory, only fractions 1 and 2 resulted and expressed protein, enzymatic content and peptide fragments. Many proteins were found, and their relationship with poisoning from Africanized bees *Apis mellifera* was analyzed, in which the process of action of such proteins still leaves doubts about the concepts of their impacts on the human body. In this way, it is assumed that the microvesicles present in the venom of the *Apis mellifera* bee are the result of the detachment of membrane buds from organs/tissues during their life, which can be led to the venom gland due to the proximity it has to the intestine of this insect. Among several proteins found, the protein acid phosphatase type 7 (acid phosphatase type 7) together with the protein Phosphatase 1H, are related to the poisoning of Africanized bees *Apis mellifera*, it induces toxicity reactions that are inoculated during the sting during the defense of honey bees, leading the affected person to allergic reactions after apitoxin poisoning. Finally, the results obtained in this work will be of great contribution to future studies involving the proteins characterized in microvesicles.

Keywords: Bee poisoning, proteomic analysis, extracellular microvehicles, mass spectrometry, Nanoparticle Tracking Analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Notificações por tipo de acidente segundo ano do acidente.....	11
Tabela 2 - Estatísticas referentes às microvesículas extracelulares do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> com o método <i>Merger Data</i> (+/- Desvio Padrão).....	30
Tabela 3: Identificação das proteínas presentes nas microvesículas extracelulares do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i>	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abelha <i>Apis mellifera</i> realizando uma ferroadada	13
Figura 2 - Sistema glandular da Abelha <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 3 - Divisão Morfológica das abelhas <i>Apis mellifera</i>	12
Figura 4 - Placa de vidro associada à fios elétricos de baixa voltagem.....	24
Figura 5 - A. Placa de coleta de veneno aderida à caixa da colmeia. B. funcionamento da voltagem dos fios de baixa voltagem e atividade das abelhas ...	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. As abelhas <i>Apis mellifera</i> e as notificações dos acidentes apílicos no Brasil	10
1.2. Abdômen e ferrão das abelhas <i>Apis mellifera</i>	12
1.3. Apitoxina, extração, composição e sintomas.....	14
1.4. Importância do estudo da apitoxina.....	18
1.4. Microvesículas.....	20
1.5. Análise Proteômica como uma estratégia investigativa prognóstica e/ou diagnóstica	23
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Obtenção do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i>	25
3.2. Isolamento de microvesículas presentes no veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> ...	26
3.3. Análise de rastreamento de nanopartículas ou <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	27
3.4. Quantificação de proteínas.....	27
3.5. Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE).....	27
3.6. Digestão Enzimática das proteínas em gel.....	28
5. DISCUSSÃO.....	34
5.1. Proteínas encontradas nas frações estudadas das Vesículas Extracelulares	37
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

Segundo Pegoraro (2017), a apicultura foi revolucionada em 1851, quando o Padre e Matemático, Lorenzo Lorraine Langstroth, estudando as colmeias de abelhas nos Estados Unidos, descobriu o “espaço abelha” e arquitetou a primeira colmeia racional, nomeando-a de Langstroth. Foi aí que a apicultura passou a ser racional e o modelo de colmeia Langstroth difundida no mundo inteiro.

Para que o homem pudesse consumir o mel, era promovida uma genuína caçada ao mel, a qual, muitas vezes, era dificultada pelo fato de os enxames se localizarem em locais de difícil acesso que proporcionavam risco à vida dos coletores. Como naquela época não se sabia separar o mel dos favos, o homem ingeria uma mistura composta por mel, pólen, cera e as crias das abelhas, muitas das vezes, os enxames morriam ou tinham que fugir, fazendo com que o homem tivesse que caçar mais ninhos para consumir o alimento (SOUZA et al., 2019).

Conforme Queiroga et al. (2015), o mel sempre chamou a atenção do homem, sendo um dos alimentos mais antigos. O uso do mel vai além da alimentação do ser humano, na antiguidade, o produto era utilizado como conservante de frutas, grãos, medicamento e, inclusive, como oferenda aos deuses egípcios. De acordo com Rodrigues (2017), nesse período, a exploração das abelhas era feita de forma rústica, quando o mel e a cera eram obtidos com a destruição parcial da colmeia. Os produtos eram adquiridos em pequenas quantidades e as abelhas tinham que refazer a colmeia após cada colheita.

A história da apicultura no Brasil teve início no ano de 1839, quando o Padre Antônio Carneiro introduziu as abelhas europeias (*Apis mellifera*), trazidas da cidade de Porto, em Portugal, e as instalou no estado do Rio de Janeiro para a produção comercial de mel e para extração de cera no intuito da confecção de velas (QUEIROGA et al., 2015; PEGORARO et al., 2017).

A apicultura brasileira desenvolveu sua cultura de forma rudimentar na região sudeste, trazendo impactos tecnológicos, sociais e biológicos, sendo exploradas para produção de cera e mel, sem muitos critérios de segurança e de uma forma pouco profissional. Em 1950, segundo um levantamento de produção em toneladas de mel de abelha, constatou que a produção brasileira era baixa forçando produtores buscarem alternativas em outros países de novas espécies de abelhas (QUEIROGA et al., 2015; PEGORARO et al., 2017).

De acordo com Pegoraro et al. (2017), as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) no ano de 1956 no município de Rio Claro (SP), o professor Warwick E. Kerr, com a crescente narrativa da necessidade de aumento de produção de cera e mel, foi em busca de novas opções de espécies voltadas ao aumento da produtividade de mel no Brasil. Após sua viagem pela África, trouxe algumas abelhas rainhas da espécie *Apis mellifera scutellata*. Porém, após diversas colmeias enxamearem pela cidade de Rio Claro e região, houve novas abelhas, proveniente de diversos cruzamento originando abelhas hibridizadas, denominadas como abelhas africanizadas, as quais, formam todo o plantel existente atualmente no Brasil.

Neste novo cenário as abelhas hibridizadas, são insetos que se situam no Filo Artrópodes, o qual possui a maior diversificação de organismos do Reino Animalia, pertencem à classe Insecta, ordem dos Himenópteros, gênero *Apis*, família Apidae, espécie mellifera. É constituída por mais de 20 mil espécies diferentes de abelhas, sendo a espécie *Apis mellifera* a mais importante em relação à polinização, auxiliando na produção de alimentos, a exemplo de mel, cera, pólen, própolis e geleia real. O gênero *Apis* abrange as abelhas sociais, as quais são mais empregadas comercialmente, e são classificadas em sete espécies distintas, sendo elas: *Apis dorsata*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. koschevnikov*, *A. andreniformes*, *A. laboriosa* e *A. mellifera*. Apesar das riquezas de espécies e do conhecimento da fauna da família Apidae e dos ecossistemas, ainda se carece muito de estudos sobre as abelhas brasileiras, deixando-as num status de pouco conhecida (DOMINGOS, 2016; SANTOS, 2017).

1.1. As abelhas *Apis mellifera* e as notificações dos acidentes apícolas no Brasil

As abelhas africanizadas surgiram de cruzamentos e são consideradas poli híbridas. Tal cruzamento ocorreu entre as espécies africanas *Apis mellifera scutellata* e *Apis mellifera adansonni*, com as espécies europeias *Apis mellifera mellifera* e *Apis mellifera carnica*, *lingustica* e *caucasica*. Desse cruzamento, surgiram abelhas altamente produtoras de mel, com alta capacidade de enxameação, adaptabilidade às diversas condições climáticas e tolerantes a pragas e doenças (SILVA et al., 2020).

Porém, o resultado da africanização das abelhas trouxe situações problemáticas para o Brasil, quanto ao despreparo no manejo e formas de extração dos derivados naturais. A nova espécie de abelha possuía característica de defesa superior a outras espécies anteriormente introduzidas no país, característica essa herdada das abelhas africanas. Nesse período, por ser uma espécie defensiva e responsável pelos altos índices de acidentes, agricultores desistiram de seu manejo, havendo abandono da apicultura devido à agressividade apresentada pelas abelhas, fato ocorrido concomitantemente pela falta de informação da população daquela época e pelo fato de elas estarem próximas a animais domésticos (ALVES, 2016 e PEGORARO et al., 2017).

Iniciou-se, então, um processo de repulsa a essas abelhas e boatos de que denominavam o polihíbrido de abelha assassina, não o bastante, as abelhas africanizadas demonstraram rápida adaptabilidade ao clima tropical e a vegetação presente no país, favorecendo, deste modo, à acelerada reprodução da espécie e à elevada enxameação, sendo que somente mais tarde com auxílio de novas técnicas na agricultura, voltaram a manejar para fins comerciais de seus derivados (ALVES, 2016 e PEGORARO et al., 2017).

A defensividade das abelhas é causadora dos acidentes acometidos pelo seu envenenamento, sendo classificado pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde do Brasil (SINAN), como um animal peçonhento de alto índice de periculosidade, quanto aos seus ataques. É sabido que muitos acidentes apílicos ocorreram conforme a expansão das abelhas africanizadas no Brasil, fazendo com que as autoridades de saúde pública incluíssem este acidente como objeto de vigilância sanitária (SINAN, 2023).

Além dos processos alérgicos, que variam desde leves a graves, as múltiplas ferroadas por abelhas estão associadas em geral a quadros de envenenamentos graves. Recentemente, os acidentes causados por abelhas têm merecido maior atenção devido à sua gravidade e sua letalidade. Segundo o SINAN, (Tabela 1), os acidentes por abelhas representam cerca de 8,42% do número total de acidentes causados por animais peçonhentos (SINAM, 2023).

Entre os 5 principais tipos de acidentes por animais peçonhentos (ofidismo, araneísmo, escorpionismo e erucismo), o acidente por abelhas é o único que não tem um soro específico para o tratamento no Brasil, porém há estudos acerca de sua produção (MINISTÉRIO, 2024).

Tabela 1 - Notificações por Tipo de Acidente segundo Ano do acidente

Ano acidente	Branco	Serpente	Aranha	Escorpião	Lagarta	Abelha	Outros	Total
Em Branco	17	-	-	-	-	-	-	17
2017	-	-	-	1	-	-	-	1
2020	2	10	8	81	5	8	5	119
2021	35	150	226	693	28	96	54	1282
2022	4468	28701	31826	177486	5054	23849	11968	283352
Total	4522	28861	32060	178261	5087	23953	12027	284771

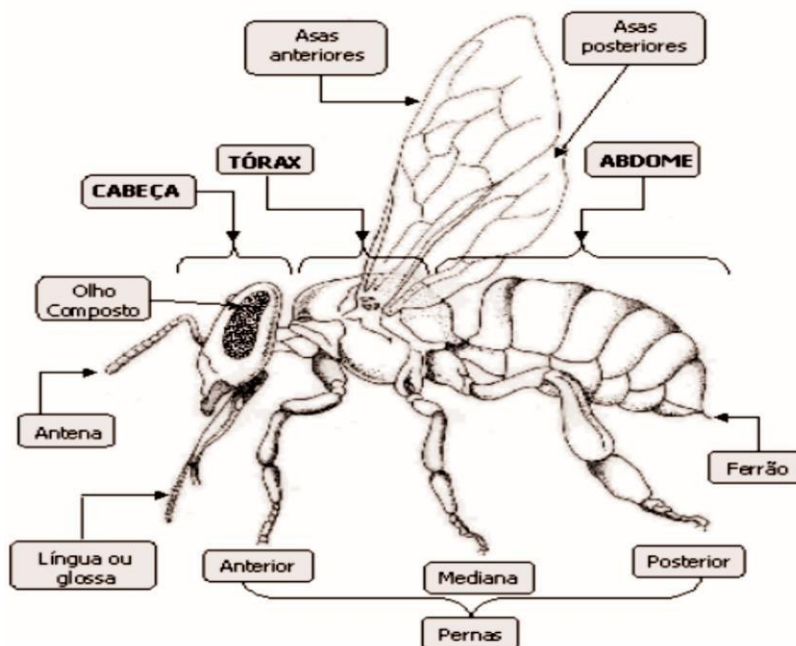
Fonte: Ministério da Saúde/SVSA - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.

A partir do histórico de acidentes provenientes do manejo das abelhas e na extração de seus derivados sempre houve uma grande preocupação por órgãos e ministérios da saúde quando ao alto risco do seu manejo, uma vez que as abelhas, por ação de defesa, ferroam quando se sentem ameaças (SINAM, 2023).

1.2. Abdômen e ferrão das abelhas *Apis mellifera*

O corpo da *Apis mellifera* é dividido em três partes: cabeça, tórax e abdômen (Figura 2). O ferrão das abelhas *Apis mellifera* é constituído de uma parte operante e uma parte glandular, com exceção de outras partes não vivas, tais como a quitina, esclerotina, resilina e cera, que estão presentes no corpo dos insetos e possibilitam que o mesmo tenha resistência, rigidez, flexibilidade e impermeabilidade. A parte operante é dividida em aparato motor, formado por placas cuticulares e lancetas, que ficam conectadas ao aparato motor por braços cuticulares curvos (CARVALHO, 2019).

Figura 2 - Divisão Morfológica das abelhas *Apis mellifera*



Fonte: ARBOITTE, M. Z - 2008

No momento da ferroada ocorre a inoculação do veneno, e a abelha vêm a óbito por deixar parte de seu abdome e intestino ligado ao ferrão, como mostra abaixo a Figura 1, que tem formato pontiagudo com fisga/farpas, relação essa que faz com que parte de seu corpo fique presa no momento da ferroada na pele da pessoa acometida (COSTA et al., 2020).

Figura 1 - Abelha realizando uma ferroada



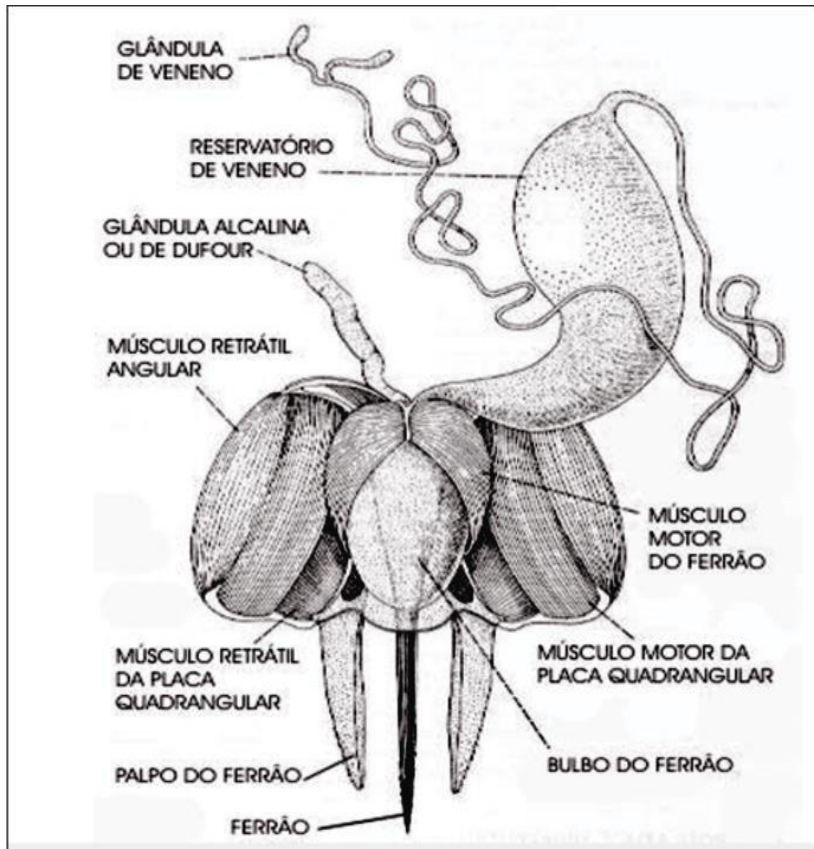
Fonte: ARBOITTE, M. Z - 2008

O ferrão pode ser utilizado pelas fêmeas para defesa individual ou da colmeia, embora a fêmea que ferroou morra, já que o ferrão fica preso no objeto ferroadado. Esta ação é vantajosa do ponto de vista da espécie, onde a perda de alguns indivíduos não afeta a sobrevivência da colônia. Na rainha, as farpas do ferrão são menos desenvolvidas do que nas operárias e a musculatura ligada ao ferrão mais forte, para que ela não o perca após a ferroada (CARVALHO, 2019).

Dessa forma, para a rainha, o ferrão é mais um instrumento de orientação, que visa à identificação das células dos favos onde vai depositar os ovos, ou para ferroar outra rainha que tenha nascido ao mesmo tempo, com quem disputará pela hegemonia da colmeia (RAMOS & CARVALHO, 2007).

As glândulas de veneno consistem em um tubo longo, fino e convoluto, que finda em uma bifurcação em fundo cego e uma parte alargada, que funciona como reservatório para a secreção. Este reservatório liga-se ao ferrão por um ducto curto, durante a ferroada, o veneno produzido pelas glândulas de veneno, escorre por um canal entre o estilete e as lancetas, penetrando no objeto ferroadado, como mostra abaixo na (Figura 3), (CARVALHO, 2019).

Figura 3 - Sistema glandular da Abelha



Fonte: Fonte: ARBOITTE, M. Z - 2008

1.3. Apitoxina, extração, composição e sintomas

A palavra apitoxina vem do latim e significa: apis - abelha e toxikon – veneno. O veneno é utilizado como formas de defesa e proteção da colmeia. Fato esse que favorece à eficiente comunicação entre as abelhas por meio de feromônios de alarme produzidos pelas células da glândula de veneno (isopentilacetato) e das glândulas mandibulares (2-heptanona) das operárias. Esses feromônios atuam como sinalizadores para as demais operárias da colmeia onde está o possível inimigo (NOGUEIRA-COUTO & COUTO, 2002).

Muitos métodos são utilizados para extração do veneno, porém, alguns métodos necessitam da retirada da bolsa de veneno, o que acomete a morte das abelhas. O método mais indicado é o que utiliza equipamentos que emitem impulsos elétricos, que permitem adquirir o veneno puro, sem sacrificar as abelhas. Na abelha *Apis mellifera*, a composição do veneno varia de acordo com a sub espécie, fase do

desenvolvimento e com os hábitos alimentares. As principais alterações encontradas são variações nas concentrações das proteínas do veneno ao longo das estações do ano, demonstrando uma influência do meio (RUVOLO-TAKASUSUKI, 2019).

A coleta por meio de estimulação elétrica proporciona uma solução de veneno muito mais consistente e clara do que a coleta manual. Diferenças significativas na forma, distribuição, intensidade e presença ou ausência de picos também são notáveis quando se comparam as duas metodologias de coleta de veneno. Portanto, a elétrica foi a metodologia selecionada para as comparações das análises de veneno realizadas neste trabalho (FERREIRA, J., et. Al. 2010).

Segundo Abreu *et al.* (2000), abelhas com sete dias são lentas a estímulos elétricos e melhoram sua produção de veneno com o passar do tempo, com a necessidade de sair das colmeias em busca de alimento seu sentido de defesa vai apurando, trazendo respostas mais ágeis ao perigo proporcionando maior quantidade de produção de veneno.

Segundo Valderrama (2003), realizando um comparativo nos Estados Unidos, em produção de veneno de diferentes espécies de abelhas, o veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera melífera*, *Apis mellifera scutellata*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*) e abelhas europeias (*Apis mellifera ligustica*), destoam em quantidades em produção sendo 94 e 147mg de apitoxina/abelha, respectivamente.

Segundo Funari (2011), os reservatórios de venenos das abelhas europeias constituem de maior quantidade de veneno comparados aos das abelhas africanizadas, mais no momento dos estímulos elétricos, as abelhas africanizadas liberam maior quantidade de veneno, comparado com as abelhas europeias. Neste contexto as particularidades das abelhas africanizadas trazem um animal mais resistente a doenças e ataques de possíveis predadores naturais, sendo uma característica positiva quanto a produção de apitoxina.

Contudo deve se preocupar com a frequência de extração. Segundo BOGDANOV (2018), quando realizado de três a quatro coletas mensais a produção de mel reduz em aproximadamente 10 a 15% de sua produção. Segundo DURAN et al. (2011), as eletroestimulações utilizadas para coleta de apitoxina no intervalo de 20 a 30 dias não interferem na produção das colônias, não havendo mortalidade significativa e sua produção de apitoxina continuaram o mesmo.

Segundo Valderrama (2003), as abelhas africanizadas são mais agressivas e conseqüentemente mais habilidosas quanto a sua ferroada, apresentando trintas vezes mais velocidade que as europeias. Utilizando desses mecanismos de proteção e defesa de colmeias a produção de veneno bruto é muito mais elevada do que outras abelhas e sua proliferação de enxames são de fácil formação, sendo uma espécie de fácil adaptação a diferentes climas e territórios.

Segundo Bucio & Martinez (2018), ao realizarem sua pesquisa constataram que a extração de veneno de abelha por estímulos elétricos é indicado, pois não matam os animais produtores e culmina em aumentos de ganhos econômicos no apiário sendo interessante sua associação a produção de mel, onde sua produção é alta ocasionada pelos períodos de floração.

Sendo assim o veneno injetado em uma ferroada contém aproximadamente 50 µg de matéria seca. As principais proteínas presentes são a Melitina (50% do Peso Seco do Veneno - PSV), Fosfolipase A2 (12% PSV), fator degranulador de mastócitos (3% PSV), hialuronidase (3% PSV) e apamina (2% PSV). Além disso, estão presentes aminas biogênicas, entre elas histamina (1 % PSV), dopamina (0,5% PSV) e noradrenalina (0,5% PSV), (JESUS, 2020).

A toxicidade desses venenos é atribuída a três componentes protéicos: enzimas (Fosfolipases A2 e Hialuronidase), grandes peptídeos (Melitina, Apamina e 7 Peptídeo degranulador de mastócitos - PDM) e pequenas moléculas (Peptídeo e Aminas biogênicas), que possuem atividades alérgicas e farmacológicas. Os fatores alergênicos são enzimas como melitina, fosfolipases, hialuronidases, lipases e fosfotases, proteínas antigênicas que inoculadas durante a ferroada, iniciam respostas imunes responsáveis pela hipersensibilidade de alguns indivíduos e pelo início da reação alérgica (JESUS, 2020).

Tanto as Fosfolipases A2 quanto a Melitina são tóxicas, porém quando agem juntamente seus efeitos são potencializados, fazendo com que a lise celular ocorra mesmo na presença de baixas concentrações desses componentes. A Melitina e Fosfolipase A2 agem de forma sinérgica sobre os fosfolipídios das membranas, resultando no comprometimento de sua integridade e da membrana mitocondrial, comprometendo a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória, ocasionando dano tecidual (LIMA et al., 2006).

Em indivíduos que levam múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas, geralmente é detectada hemólise intensa acompanhada por insuficiência renal,

causada pela ação da apamina, melitina e fosfolipase A2 sobre a membrana eritrocitária. Os indivíduos acometidos por milhares de ferroadas evoluem rapidamente para um quadro clínico grave de insuficiência respiratória e renal agudas. Nos casos letais, os indivíduos apresentam necrose tubular aguda com presença de cilindros de hemoglobina e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais. Os músculos esqueléticos apresentam proteólise intensa com liberação de mioglobina e creatinofosfoquinase para a circulação. Alguns indivíduos apresentam lesões com presença de necrose muscular. O fígado pode apresentar sinais de degeneração hidrópica decorrente do grave envenenamento (Barraviera, 1994).

Geralmente, as picadas de abelha podem apresentar dois resultados diferentes:

- Anafilaxia: ocorre em indivíduos alérgicos ao veneno de abelha. Nestes casos, uma única ferroadada pode causar reações alérgicas generalizadas graves, podendo levar à morte. Estas consequências não estão relacionadas com a toxicidade do veneno devido à pequena quantidade inoculada. (BARBOSA et al., 2014).
- Toxicidade direta do veneno: ocorre quando há um elevado número de picadas – geralmente mais de 200 em adultos. Nesse caso, o volume do veneno é suficiente para causar danos a órgãos vitais. Lesões diretas aos sistemas cardiovascular, muscular, neurológico, dermatológico, metabólico, hematológico, respiratório e renal podem levar à morte (BARBOSA et al., 2014).

1.4. Importância do estudo da apitoxina

A apitoxina é o veneno das abelhas. É produzido por glândulas de secreção ácida e secreção alcalina, as quais, por sua vez seu estudo é importante pois, podem ser usadas em tratamento de artrite, tendinite, afecção cutâneas, reumatismo, entre outras doenças, sendo utilizado por farmácias de manipulação e indústrias químicas pelo fato de possuir tal toxicidade, para produção de remédios anti-inflamatórios, relaxantes musculares, antibacterianos, entre outros (TOMAZINI, 2019).

Atualmente, existem muitos tratamentos que empregam apitoxina, os mais utilizados administram o veneno subcutânea, injeções ou diretamente pelas ferroadas das abelhas, este último, por sua vez, deve ser aplicado em pequenas doses (RUVOLO-TAKASUSUKI, 2019).

Outra grande importância do estudo da apitoxina e a sua ação de envenenamento após as ferroadas das abelhas melíferas, que favorece o estudo e desenvolvimento de um anti-soro contra o veneno da abelha *Apis mellifera* proporciona um tratamento mais rápido e eficiente para vítimas de ferroadas em massa. Mas um anti-soro eficaz deve levar em conta que deve ser o resultado da imunização de animais com um pool representativo de venenos de abelhas melíferas, provenientes das muito diferentes condições ambientais, estágios de desenvolvimento, época de ordenha e dieta que o inseto pode ser sujeito (SCIANI, et al. 2010)

Diante do crescente número de casos clínicos por acidentes por abelhas africanizadas e, conseqüentemente de óbitos, despertou-se a necessidade de se dispor de um tratamento eficaz. E desta forma, um estudo clínico Fase 1 e 2 utilizando de um soro antiapílico tem sido testado em pacientes que sofrem por múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas (BARBOSA et al, 2021).

Para tratar esses ataques massivos, pesquisadores brasileiros desenvolveram o primeiro antiveneno específico contra a exposição à ferroadas de abelhas africanizadas. Este produto único, o primeiro deste tipo no mundo, foi testado com segurança em 20 pacientes durante um ensaio clínico de Fase 2 (ORSI, et al, 2024).

O antiveneno apílico inibiu as atividades enzimáticas da fosfolipase e da hialuronidase. Em experimentos de citometria de fluxo, o antiveneno apílico

neutralizou a redução da viabilidade celular devido à necrose pelo veneno de abelha atividades da melitina. Estes resultados mostraram que este antiveneno é um inibidor eficaz das ações do veneno das abelhas (CRUZ, et al. 2021).

Neste contexto, observaram que mesmo após a soroterapia específica desses pacientes acometidos por múltiplas ferroadas de abelhas *Apis mellifera* deste estudo clínico, os estudos de venenemia evidenciaram a existência das toxinas do veneno da abelha no sangue dos pacientes tratados após 10 dias da alta médica (BARBOSA et al, 2021).

Durante a soroterapia específica, os níveis séricos do veneno da abelha no sangue dos pacientes reduziram drasticamente até o momento em que os pacientes tiveram alta hospitalar, porém, nas consultas de retorno após 10, 20 e 30 dias, os mesmos estudos de venenemia evidenciaram elevados níveis de veneno da abelha circulantes nos pacientes (BARBOSA et al, 2021).

Pesquisas realizadas através da técnica de espectrometria de massa qualitativa evidenciaram a presença da proteína melitina na corrente sanguínea dos pacientes em casos caracterizados como leves, moderado e graves em 30 dias após a administração do soro anti-apilico. Neste contexto os testes realizados em resposta clínica dos participantes, resultados dos exames laboratoriais de resposta de fase aguda, testes de ELISA e a espectrometria de massa consideram que embora o produto administrado seja seguro são necessários retornos clínicos e revisão do protocolo, para aferição da quantidade de frascos de soro anti-apilico a serem administrados (BARBOSA et al, 2021).

Diante dessa observação clínica e tendo em vista estudos já publicados na literatura sobre a presença de microvesículas no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (SOUZA-IMBERG, et. al, 2017), há a necessidade de pesquisas sobre os elevados níveis de veneno de abelha sendo transportados e novamente envenenado pelo deslocamento das microvesículas.

1.4. Microvesículas

A comunicação entre as células é um evento essencial em todos os organismos vivos que é alcançado através de vários mecanismos, entre os quais a secreção de elementos solúveis é um fator importante. Nas últimas duas décadas, um novo método de comunicação intercelular foi desenvolvido e são reconhecidas como um novo método de comunicação intracelular com uma faixa de sinalização, através da secreção de partículas nanométricas ligadas à membrana, conhecidas como vesículas extracelulares que são liberadas pelas células nos espaços extracelulares. (ZABOROWSKI, 2015 & YÁÑEZ-MÓ, 2015).

São consideradas vesículas de entrega de carga porque abrigam ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e metabólitos que refletem sua origem celular. As vesículas extracelulares são encontrados em quase todos os fluidos do corpo, desde fluidos sinoviais e leite materno até saliva, plasma e urina (YÁÑEZ-MÓ, 2015).

O termo “vesícula extracelular” foi usado pela primeira vez na literatura em 1971 por um estudo que envolveu análise microscópica eletrônica da alga de água doce 'Ochromonas danica' (SAILLIET, 2022). Naquela época, vários nomes eram usados para mencionar vesícula extracelular, como vesículas de desprendimento, fragmentos de membrana, vesículas de membrana plasmática, microvesículas e exossomos (SAILLIET, 2022).

As vesículas extracelulares surgiram como importantes mediadores da comunicação intercelular em uma ampla gama de processos biológicos. Para futuras aplicações terapêuticas e para a investigação em biologia de vesícula em geral, compreender o destino *in vivo* dos vesículas extracelulares é de extrema importância (WIKLANDER, et al, 2015).

Vesículas extracelulares são um grupo de vesículas com estrutura de membrana liberadas pelas células, incluindo exossomos, microvesículas, corpos apoptóticos e oncosomas. Vesículas extracelulares são agora reconhecidas como importantes ferramentas de comunicação célula a célula, permitindo que as células troquem proteínas, lipídios e material genético para participar de processos fisiológicos e patológicos. Foi relatado que os vesículas extracelulares regulam as interações hospedeiro-patógeno e participam de processos patológicos de doenças infecciosas, doenças neurológicas, câncer e doenças cardiovasculares, mas

também desempenham um papel importante no processo de crescimento e desenvolvimento (WANG & ZEMG, 2023).

Foi demonstrado que as vesículas extracelulares desempenham um papel importante na comunicação celular. Elas têm sido implicadas em processos importantes, como respostas imunes, manutenção da homeostase, coagulação, inflamação, progressão do câncer, angiogênese e apresentação de antígenos. Assim, as vesículas extracelulares participam de condições fisiológicas e patológicas (KONALA, et al. 2016 & RAPOSO, 2013).

As vesículas extracelulares também podem ser encontrados em fluidos fisiológicos, como urina normal, sangue, líquido de lavagem brônquica, leite materno, saliva, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, líquido sinovial e ascite maligna. As vesículas extracelulares mais importantes são as microvesículas (MVs) e exossomos (KONALA, et al. 2016 & RAPOSO, 2013).

A liberação de microvesículas para o espaço extracelular é um processo que ocorre tanto em procaríotos como em eucariotos. A conservação dessas estruturas ao longo da evolução sugere que esses compartimentos vesiculares extracelulares possuem funções essenciais (para revisão ver GYÖRGY et al., 2011).

Por muito tempo as microvesículas foram consideradas artefatos ou debris celulares, frequentemente observados por microscopia eletrônica no espaço intersticial de tecidos ou sangue, consideradas como consequência ou resultado da dinâmica celular. Atualmente são reconhecidas como estruturas específicas, distintas dos exossomos liberados após exocitose de corpos multivesiculares (CAMUSSI et al., 2010).

A secreção de vesículas extracelulares durante a maturação dos reticulócitos foi reconhecida em 1983. Vesículas extracelulares são vesículas repletas de membrana que são secretadas por uma variedade de tipos de células, incluindo células dendríticas, plaquetas, mastócitos, células epiteliais, células endoteliais, células neuronais, células cancerígenas, oligodendrócitos, células de Schwann e células embrionárias (KONALA, et al. 2016 & RAPOSO, 2013).

Microvesículas, ou vesículas de desprendimento, são formadas por brotamento externo da membrana celular em diferentes tipos de células que envolve a reorganização do citoesqueleto e também depende da concentração de cálcio intracelular (KONALA, et al. 2016).

Elas têm diâmetro de 100-1000 nm e podem ser isolados por ultracentrifugação com densidade de 1,04 a 1,07 g / mL em gradiente de sacarose (RANI, 2015). As Microvesículas contêm grandes quantidades de proteínas e são ricas no marcador de superfície, bem como em colesterol, esfingomiéline e ceramida (RAPOSO, 2013).

As microvesículas estão envolvidas não só em processos fisiológicos, mas também patológicos. Em geral são crescentes em processos patológicos, níveis anormais de microvesículas são observados, sendo que a origem e composição celular destas estruturas são indicadores do tecido onde se localiza a doença, (GYÖRGY et al., 2011).

Os exossomos e microvesículas, são regularmente secretados pelas células para manter a comunicação intercelular. Eles são bastante semelhantes em propriedades e são muito difíceis de separar. Uma das principais diferenças entre os dois é a forma como são produzidos. Os exossomos são formados através da via endolisossomal após a invaginação das membranas endossomais para formar corpos multivesiculares e são liberados após a fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática (SAILLIET, 2022).

As microvesículas são formadas pelo brotamento externo da membrana, eles são maiores em tamanho variando de 100 nm a 1000 nm, como já dito, enquanto os exossomos são menores em tamanho variando de 50 nm a 150 nm e têm uma densidade flutuante de 1,10 a 1,14 grama/ml (SAILLIET, 2022). Como os exossomos são formados dentro da membrana celular, eles são mais enriquecidos em fosfatidilserina, enquanto a composição das microvesículas é mais próxima da célula-mãe. A composição geral de ambas as Vesículas extracelulares são as mesmas, ou seja, cada um contém proteínas citoplasmáticas, lipídios, mRNA, miRNA e receptores (SAILLIET, 2022).

1.5. Análise Proteômica como uma estratégia investigativa prognóstica e/ou diagnóstica

O desenvolvimento de estudos de Proteômica voltado a abelhas vêm sendo realizado a partir do ano de 2005 com a publicação de seu primeiro artigo sobre a composição do veneno de *Apis mellifera*, combinando duas técnicas que são elas análise por espectrometria de massas no equipamento tipo MALDI-TOF/TOF e eletroforese bidimensional, que obteve o êxito do encontro de três novas proteínas das abelhas (PEIREN et al, 2005).

Sabe-se que as proteínas e peptídeos são responsáveis por controlar a maioria dos processos celulares, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares. As proteínas tem como importante função a catálise enzimática, transporte, movimentação, suporte mecânico, proteção imune, sinalização intra e extracelular dentre outras (ISFORT et al, 2002).

Para melhor conhecer proteínas e peptídeos é fundamental avaliar o conjunto de proteína de uma amostra biológica. Um proteoma é dito como complexo e dinâmico, uma vez que, a composição proteica de uma amostra reflete o estado metabólico/fisiológico e das fases da diferenciação celular que a célula, tecido, órgão ou organismo se encontra no momento da investigação (JENSEN, 2004). A utilização do termo proteômica refere-se ao estudo desses conjuntos de proteínas definas como proteoma, estudando de forma descritiva e quantitativa de uma organela sub celular até a de um ecossistema, interações com outras proteínas, suas variações populacionais, mudanças em decorrência a resposta a um ambiente, mudanças decorrentes ao desenvolvimento normal ou alterado e modificações (VALLEDOR et al, 2011).

Muitos foram os estudos de pesquisa básica publicados até o momento utilizando-se a estratégia proteômica para se comparar diferentes estados biológicos em geral, como por exemplo, identificar marcadores moleculares entre sistemas sadios e doentes, resistentes e susceptíveis, com características positivas e normais (SIZOVA et al, 2007).

No entanto, a proteômica vem se tornando uma ferramenta importante em estudos de aplicação clínica, a qual tem sido vista como uma das chaves para a descoberta de novas drogas e no desenvolvimento de testes diagnósticos mais

específicos, quando se identifica marcadores moleculares para um determinado quadro clínico (FERNANDEZ et al, 2008 & SONG et al, 2014).

No âmbito da investigação de biomarcadores em diferentes patologias, microvesículas extracelulares tem sido alvo de muitos estudos proteômicos a partir de fluídos corpóreos como o sangue e urina de pacientes (KIM, et al, 2015 & COCUCCI et al, 2015).

Diante dessa observação clínica e tendo em vista estudos já publicados na literatura sobre a presença de microvesículas no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (SOUZA-IMBERG et al, 2017) e da presença de melitina e fosfolipase A₂ em seu reaparecimentos em 10, 20 e 30 dias após o tratamento do soro anti apilico na maioria dos participante pacientes (BARBOSA et al, 2021), postulou-se duas hipóteses: (1) O veneno da abelha foi liberado na corrente sanguínea dos pacientes tardiamente pois estavam encapsulados em microvesículas oriundas do próprio veneno. (2) O veneno da abelha foi liberado na corrente sanguínea dos pacientes tardiamente pois estavam encapsulados em microvesículas formadas pelo próprio organismo dos pacientes por meio do brotamento de microvilos na fagocitose celular dos antígenos circulantes após o acidente?

Em suma, atualmente as microvesículas possuem múltiplas funções, dependendo de sua origem, sinalizando através de interações com outras células, transferindo material genético. Sua participação em processos fisiológicos ou patológicos mostra a importância das microvesículas e abre novas perspectivas de investigação sobre seu conteúdo e perfil proteico.

2. OBJETIVO

No âmbito de estudar as microvesículas extracelulares, as quais são alvos nos estudos investigativos de marcadores moleculares prognósticos/diagnósticos e, diante de experimentos pilotos realizados por nossa equipe, as quais já evidenciaram a presença de microvesículas no veneno da abelha *Apis mellifera*.

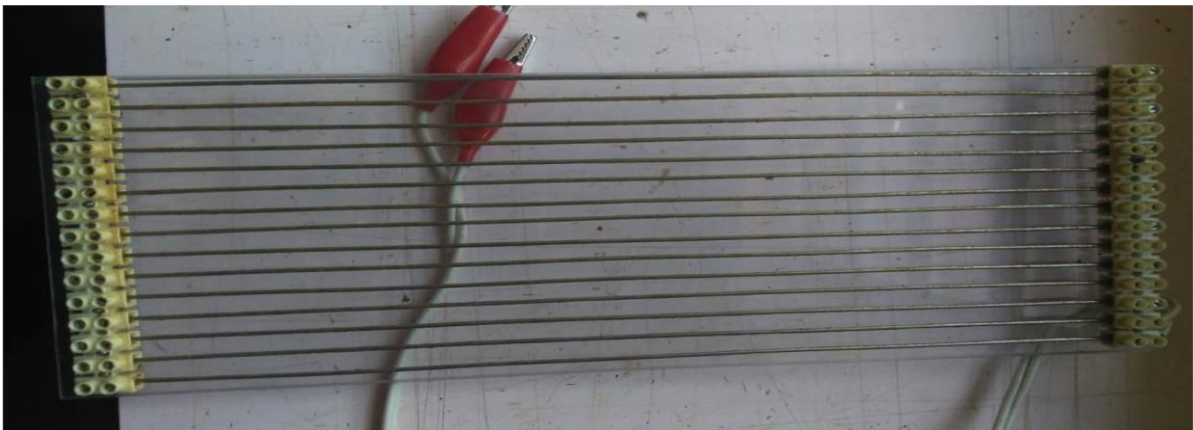
O objetivo desse trabalho foi isolar as microvesículas extracelulares do veneno de *Apis mellifera*, quantificar e mensurar seus diâmetros, além de descrever o perfil proteico total dessas microvesículas por meio da estratégia de análise proteômica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do veneno da abelha *Apis mellifera*

O veneno da abelha *Apis mellifera* que foi utilizado neste trabalho foi gentilmente coletado de colmeias de abelhas pertencentes ao grupo Nectar (Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, SP. O protocolo de coleta de veneno utilizado é semelhante ao descrito por Benton et al. (1963), que consiste no uso de uma placa de vidro associada à fios capazes de aplicar pequenos choques (Figura 4).

Figura 4 - Placa de vidro associada à fios elétricos de baixa voltagem



Fonte: Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional

Esta placa foi aderida à entrada da colmeia (Figura 5A e 5B) e algumas abelhas tocaram os fios elétricos de baixa voltagem e respondem ferroando a superfície em que se encontram, além de liberar sinais feromônios chamando as demais abelhas da colmeia que também liberam veneno na placa de vidro, que está instalado fios geradores de pulso de 6 volts. As colheitas ocorreram, nos períodos da manhã, com início sempre às 09h00 e no período da tarde às 14h00, com duração de 60 minutos cada. Ao término de cada colheita, os coletores foram retirados e encaminhados ao Laboratório do Setor de Apicultura, e os vidros contendo o veneno, mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, até a evaporação da fase volátil. Após, o veneno foi raspado com auxílio de espátula, pesado, armazenado em *ependorf* e mantido em *freezer* (MODANESI, 2012).

As placas de vidro com veneno foi submetida a evaporação em temperatura ambiente. Além disso, o manipulador utilizou EPIs, como luvas nitrílicas descartáveis e máscaras do tipo PFF2/P2 ou com maior grau de proteção contra micropartículas, além de avental estéril, avental e boné (ORSI, 2024).

Figura 5 - A. Placa de coleta de veneno aderida à caixa da colmeia. B. Funcionamento da voltagem dos fios de baixa voltagem e atividade das abelhas



Fonte: Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional

O coletor externo reduz o superaquecimento e o estresse e não compromete o desempenho do trabalho interno das abelhas mais jovens. Após foi realizado a raspagem das placas em sala limpa e climatizada, sem fluxo de ar, para evitar a dispersão de partículas do veneno. Foram utilizadas lâminas descartáveis de aço inoxidável para raspagem do veneno das placas. Por fim o veneno foi acondicionado em recipientes de plásticos e armazenado a -20°C até sua utilização para pesquisa. (ORSI, 2024)

3.2. Isolamento de microvesículas presentes no veneno da abelha *Apis mellifera*

O veneno da abelha (20 mg), foi solubilizado em 1 mL de PBS e submetido à coluna de cromatografia líquida de exclusão molecular Izon qEV™ (Izon Science, Oxford, UK), a qual foi pré-equilibrada com o tampão PBS. Após descarte do volume morto da coluna, 4 frações de 500 μL de volume cada foram eluídas e coletadas, sendo nomeadas F1, F2, F3 e F4.

3.3. Análise de rastreamento de nanopartículas ou *Nanoparticle Tracking Analysis*

O tamanho das microvesículas e a concentração das mesmas foram avaliados pela técnica de *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), por meio do equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) equipado com uma câmara de amostra e um laser de 532 nm. As microvesículas foram diluídas e injetadas na câmara da amostra com seringas estéreis até o líquido preencher a câmara. As medições foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (PONTES et al, 2020). Esta etapa experimental foi realizada nas dependências do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, por meio da colaboração da Profa. Dra. Eneida de Paula, onde, para realizar a caracterização das frações isoladas de Vesículas Extracelulares (EV) foram utilizadas análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). No NTA as suspensões de EV foram diluídas em tampão PBS e analisadas em termos de tamanho de nanopartículas utilizando um NS300 NanoSight LM10 (Malvern Instruments GmbH Ltda). As amostras foram introduzidas manualmente na câmara através de seringas estéreis, e três vídeos de 30 s cada foram capturados, com aproximadamente 2.000 faixas contadas em cada medida, em temperatura ambiente

3.4. Quantificação de proteínas

As proteínas presentes nas frações cromatográficas foram isoladas e quantificadas pelo método de absorção Ultravioleta sob comprimento de onda a 280nm, utilizando o equipamento NanoVue (Ge Healthcare).

3.5. Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE)

As frações obtidas da cromatografia líquida de exclusão molecular foram submetidas à eletroforese unidimensional utilizando gel de poliacrilamida 10% (m/v) e condições redutoras e reduzidas (SDS-PAGE) segundo os parâmetros adotados por (LAEMMLI, 1970), Após as amostras proteicas adentrarem no topo do gel, a eletroforese foi interrompida. O gel SDS-PAGE foi corado com o corante Coomassie Brilliant Blue R-250 0,025% (m/v).

3.6. Digestão Enzimática das proteínas em gel

Primeiramente, as amostras proteicas excisadas do gel de poliacrilamida e que foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente e em seguida, à digestão enzimática em solução contendo a enzima tripsina na concentração 1:50 (enzima: amostra bruta) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. Os digestos tripsinicos foram removidos do gel na presença do solvente orgânico Acetonitrila 70% (v/v), liofilizados e mantidos em freezer de menos 80°C até o momento das análises de espectrometria de massas. Os procedimentos utilizados nesta etapa compreendem as orientações contidas em (SHEVCHENKO et al, 2006).

3.7. Análises de Espectrometria de Massas e Análise dos Dados por ferramentas de Bioinformática Proteômica

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30µm x 5mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific), e dessalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300nL/min.

Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Repronil-Pur C18-AQ, 3µm, 120 Å, 105mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% à 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP).

O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29% a 35% com resolução de 17.500, 50ms de tempo de injeção,

4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

Os dados brutos no formato.RAW foram submetidos ao software PatternLab (versão 4.0.0.84 [Carvalho et al, 2016]) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados NCBI (taxonomia *Apis mellifera*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional fixa: carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável: oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,06 ppm. A taxa de FDR (*False Discovery*) máxima foi considerada de $\leq 1\%$. A ferramenta Panther ([www.http://www.pantherdb.org/geneListAnalysis.do](http://www.pantherdb.org/geneListAnalysis.do)) será utilizada para classificar as proteínas identificadas segundo suas funções moleculares.

4. RESULTADOS

As análises *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) das quatro frações obtidas nos ensaios de cromatografia de exclusão molecular evidenciaram a presença de microvesículas extracelulares apenas nas frações cromatográficas F1 e F2. A Tabela 3 evidencia o tamanho e a concentração das microvesículas extracelulares presentes na Fração 1 e na Fração 2.

Tabela 2 - Estatísticas Referentes às Microvesículas extracelulares do veneno da abelha *Apis mellifera* com o método Merger Data (+/- Desvio Padrão)

	F1	F2
Tamanho médio	160.8 nm (1.6 nm)	142.1 nm (1.5 nm)
Mode	126.9 nm (2.8 nm)	104.3 nm (2.3 nm)
SD	57.1 nm (1.4 nm)	74.7 nm (1.4 nm)
D10	107.4 nm (1.9 nm)	92.8.4 nm (1.5 nm)
D50	138.7 nm (0.5 nm)	111.5. nm (0.6 nm)
D90	225.3 nm (12.5 nm)	204.5 nm (12.7 nm)
Concentração	7.57e+011 partículas/mL	1.74e+012 partículas/mL
	19.2 partículas/frame	22.1 partículas/frame
	25.6 centres/frame	26.4 centres/frame

Fonte: Resultados originais da pesquisa

As análises de espectrometria de massas frente aos digestos tripisinicos presentes da Fração 1 e a Fração 2 revelaram a existência de diversas proteínas, as quais estão descritas na Tabela 4, juntamente com os parâmetros estruturais das análises de espectrometria de massas.

Tabela 3: Identificação das proteínas presentes nas microvesículas extracelulares do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Fração 1 (F1)									Continuação
Código de acesso	Length	Unique peptides	Mol w	Sequence count	Spectrum count	NSAF	Coverage	Protein Score	Description
NP_001153522.1	650	0	71023,2	1	7	0,004378363	0,0246	27,0994	heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]
NP_001153524.1	658	0	72802,8	1	7	0,00432513	0,0243	27,0994	heat shock protein cognate 3 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
NP_001153544.1	640	0	70326,9	1	7	0,004446775	0,025	27,0994	heat shock protein Hsp70Ab-like [<i>Apis mellifera</i>]
XP_392639.1	547	3	59456,4	3	6	0,004459549	0,0585	13,7654	PREDICTED: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006564892.1	516	1	55078,1	1	4	0,003151645	0,0213	9,4782	PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006569643.1	303	1	33996,7	1	3	0,004025369	0,0726	6,4698	PREDICTED: NIF3-like protein 1 isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006561121.1	700	0	77297,1	1	3	0,00174241	0,0114	5,7839	PREDICTED: tripartite motif-containing protein 2-like isoform X4 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016767881.1	939	0	103998,8	1	3	0,001298921	0,0085	5,7839	PREDICTED: tripartite motif-containing protein 2-like isoform X5 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006561120.1	702	0	77523,4	1	3	0,001737446	0,0114	5,7839	PREDICTED: tripartite motif-containing protein 2-like isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016767879.1	746	0	82509,8	1	3	0,001634969	0,0107	5,7839	PREDICTED: tripartite motif-containing protein 2-like isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016767880.1	725	0	80182,8	1	3	0,001682327	0,011	5,7839	PREDICTED: tripartite motif-containing protein 2-like isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006571402.1	263	1	30786,9	1	3	0,004637592	0,0228	4,5655	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100577648 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016770658.1	491	0	56043,6	1	2	0,001656058	0,0183	4,4128	PREDICTED: uncharacterized protein LOC552396 isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016770659.1	404	0	46340,7	1	2	0,002012684	0,0223	4,4128	PREDICTED: uncharacterized protein LOC552396 isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016767808.1	406	1	46260,6	1	3	0,003004155	0,0148	4,2725	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100578651 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_391994.1	788	0	85923,2	1	2	0,001031884	0,0102	3,1474	PREDICTED: probable aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006560252.1	784	0	85441,9	1	2	0,001037149	0,0102	3,1474	PREDICTED: probable aconitate hydratase, mitochondrial isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]

Continuação									
XP_395256.3	420	1	48434,2	1	1	0,000968005	0,0238	2,0122	PREDICTED: protein krasavietz [<i>Apis mellifera</i>]
XP_394614.1	527	1	56556,3	1	1	0,000771465	0,0152	1,7441	PREDICTED: putative aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 homolog [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006562376.1	502	0	54816,3	1	1	0,000809885	0,0139	1,6907	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006562374.1	526	0	57482,6	1	1	0,000772932	0,0133	1,6907	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006562377.1	502	0	54816,3	1	1	0,000809885	0,0139	1,6907	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016771901.1	502	0	54816,3	1	1	0,000809885	0,0139	1,6907	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_623823.1	526	0	57482,6	1	1	0,000772932	0,0133	1,6907	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006562375.1	519	0	56667,2	1	1	0,000783357	0,0135	1,6907	PREDICTED: facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_624815.1	920	1	103388,3	1	1	0,000441915	0,0109	1,4873	PREDICTED: WD repeat-containing protein 3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_395197.2	888	1	99243,6	1	1	0,00045784	0,018	1,2361	PREDICTED: sodium- and chloride-dependent GABA transporter ine isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]

Fonte: Resultados originais da pesquisa

Fração 2 (F2)									Conclusão
Código de Acesso	Length	Unique peptides	Mol w	Sequence count	Spectrum count	NSAF	Coverage	Protein Score	Description
XP_392237.2	482	1	53317,3	1	4	0,001242346	0,0187	9,2928	PREDICTED: protein phosphatase 1H [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016772635.1	576	0	65405,1	1	5	0,001299502	0,026	8,8882	PREDICTED: uncharacterized protein LOC551991 isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_624377.2	581	0	66014,4	1	5	0,001288319	0,0258	8,8882	PREDICTED: uncharacterized protein LOC551991 isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006559448.1	599	0	68249,5	1	5	0,001249605	0,025	8,8882	PREDICTED: uncharacterized protein LOC551991 isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016770434.1	1002	1	114844,2	1	2	0,000298808	0,01	4,011	PREDICTED: regulator of telomere elongation helicase 1 homolog [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016770530.1	844	1	98439,5	1	2	0,000354746	0,0142	2,926	PREDICTED: pre-rRNA processing protein FTSJ3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_624456.2	694	1	78029,4	1	1	0,00021571	0,0303	2,436	PREDICTED: saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase [<i>Apis mellifera</i>]
XP_396873.2	438	1	50897,1	1	1	0,000341787	0,0228	2,4077	PREDICTED: acid phosphatase type 7 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_396696.4	540	1	61349,1	1	1	0,000277227	0,0204	1,8428	PREDICTED: threonylcarbamoyladenosine tRNA methyltransferase [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006570772.1	1530	0	171948,9	1	1	9,78E-05	0,0046	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X2 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_016771412.1	1520	0	170666,1	1	1	9,85E-05	0,0046	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006570775.1	1520	0	170666,1	1	1	9,85E-05	0,0046	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006570771.1	1546	0	173744,6	1	1	9,68E-05	0,0045	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X1 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006570773.1	1520	0	170666,1	1	1	9,85E-05	0,0046	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006570776.1	1971	0	224243,5	1	1	7,60E-05	0,0036	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X4 [<i>Apis mellifera</i>]
XP_006570774.1	1520	0	170666,1	1	1	9,85E-05	0,0046	1,7966	PREDICTED: uncharacterized protein LOC412081 isoform X3 [<i>Apis mellifera</i>]

Fonte: Resultados originais da pesquisa

5. DISCUSSÃO

A reação de um indivíduo ao veneno da abelha depende de uma série de fatores, como a dosagem recebida, o estado fisiológico, além de fatores genéticos. O veneno é uma solução aquosa constituída por cerca de 30% de água e vários solutos, dos quais o que aparece em maior quantidade é a melitina (WEHBE et al, 2018).

Além disso, apresenta uma mistura de proteínas, das quais se destacam as enzimas fosfolipase A2, hialuronidase e fosfatase ácida, alérgeno C e as neurotoxinas apamina e histamina (WEHBE et al, 2018). A apamina possui ação neurotóxica, atuando como um vasomotor, aumentando a permeabilidade dos vasos; a melitina desempenha ação hemolítica, com ação vasomotora, antibacteriana e antifúngica; a hialuronidase participa na hidrólise do ácido hialurônico nos tecidos, conferindo permeabilidade aos vasos; histamina atua como vasodilatador; a fosfatase A2 e fosfolipase A2 atacam os fosfolípidios das membranas das células e o peptídeo MCD aumenta a permeabilidade capilar (WEHBE et al, 2018).

A produção de microvesículas é comum em vários tecidos e múltiplas funções a elas vêm sendo descritas. Sabe-se que microvesículas são formadas por fragmentos circulares de membrana que, em geral, se formam a partir de brotamento ou fragmentação de microvilos (KONALA, et al. 2016 e RAPOSO, 2013).

Contudo, independente dos distintos processos de formação, existe uma grande confusão em relação à denominação destas estruturas liberadas para o espaço extracelular, sendo que somente um estudo morfológico poderá caracterizá-los (SAILLIET, 2022).

Quanto ao tamanho das nanopartículas obtidas neste estudo, evidenciamos que 90% das partículas possuem 200nm, aproximadamente. Estes dados corroboram com os achados de Carregari e colaboradores (2018), onde microvesículas extracelulares foram descobertas nos venenos de serpentes, as quais também apresentaram tamanhos médios de 200nm. Porém, o conteúdo das microvesículas extracelulares de serpentes evidenciado por Carregari e colaboradores (2018) foi majoritariamente as toxinas ofídicas já conhecidas previamente na literatura, como metaloproteases, fosfolipases, serinoproteases, L-aminoxidases. Com base na caracterização molecular e nas evidências funcionais *in*

vitro e *in vivo* relatadas no estudo de Carregari e colaboradores (2018), as microvesículas extracelulares poderiam desempenhar um papel importante no envenenamento da presa, causando desequilíbrio hemostático e degradação endotelial, atingindo alvos celulares específicos e aumentando a eficiência da paralisia da presa .

Segundo Souza-Imberg (2017), em sua análise morfológica de *Crotalus durissus terrificus* foi sugerido que a grande maioria das pequenas vesículas desprendidas de membranas, são originadas da fragmentação ou brotação de microvilosidades, ou seja, microvesículas descoberta em sua composição do veneno. Foi evidenciado pela primeira vez em seus estudos vesículas extracelulares no veneno da serpente *Bothrops jararaca*, sobre seu possível papel biológico como a ação potencial na modulação celular e no processamento de venenos ou proteínas de presas, revelando a biodistribuição de Vesículas Extracelulares *in vivo* e para elucidar o papel biológico das Vesículas Extracelulares de veneno de serpente no envenenamento e na comunicação entre organismos (GONÇALVES-MACHADO, 2022).

Segundo Liao (2023), defende que os exossomos que estavam inativados iduziram após um espaço tempo, sintomas semelhantes ao envenenamento por serpentes em camundongos, ainda defende que o conteúdo desses exossomos material de seus estudos, poderiam desempenhar um papel vital no processo de envenenamento, pois além de conter proteínas, enzimas e peptídeos, os exossomos podem conter outras substâncias não proteicas, como miRNAs que desempenham um papel de fisiopatologia como papel regulador crítico no envenenamento por serpente.

As vesículas extracelulares e o plasma sanguíneo são ótimos biomarcadores de veneno de serpentes, mas o plasma é complexo e pode oferecer uma fonte rica para análise de potenciais biomarcadores, assim uma análise proteômica do plasma não é realizada facilmente devido a sua grande faixa dinâmica. Neste contexto os endossomos e as vesículas extracelulares, que provém da purificação do plasma, traz resultados interessantes e otimistas na busca da eficácia na administração do antiveneno (WILLARD, 2021).

A caracterização e análise funcional das vesículas extracelulares em veneno de cobra e vespa parasita demonstrou ainda que o veneno é uma arma bioquímica potente e diversificada. Foram isolados e caracterizou vesículas extracelulares do

veneno de aranha *Ornithoctonus hainana*, que quando adulto tem um comprimento de corpo (diâmetro da perna) de cerca de 15 cm e um comprimento de glândula de veneno de cerca de 2 cm, revelando a composição proteica HN-EV, atividade de collagenase e funções celulares. Seu estudo mostrou há presença de vesículas extracelulares no veneno de, onde também foram encontradas proteínas de virulência, tais como neurotoxinas e hialuronidase, bem como proteínas de transporte de vesículas (XUN, 2021).

A partir da pesquisa no banco de dados do genoma/proteoma da abelha *Apis mellifera*, as análises de espectrometria de massas do conteúdo proteico das microvesículas extracelulares, presentes no veneno de abelha evidenciaram a presença de proteínas que apresentam funções de transporte e proteínas que atuam no controle da homeostasia, em suas funções internas para prevenção fisiológica de um organismo.

Estes resultados sugerem que, em um envenenamento por abelhas, as toxinas apícolas são injetadas em suas vítimas e possivelmente proteínas transportadoras das microvesículas, podem atuar como sinalizadoras/carreadoras das toxinas pelo organismo da vítima.

Muitos estudos na literatura já foram realizados caracterizando proteínas presentes nos venenos de artrópodes, principalmente, da abelha *Apis mellifera*, detentora de inúmeras notificações de acidentes de elevada toxicidade por meio de múltiplas ferroadas (ALVES, 2016 e PEGORARO et al., 2017). De forma divergente, este trabalho evidencia pela primeira vez, a presença microvesículas extracelulares no veneno desta abelha e caracteriza o seu conteúdo proteico.

5.1. Proteínas encontradas nas frações estudadas das Vesículas Extracelulares

As proteínas de choque térmico cognata 4 – Gene HSP70-4, Precursor do cognato 3 da proteína de choque térmico – Gene HSP70-3 e Proteína de choque térmico semelhante a HSP70Ab - 410620 (Locus em Tabela 3: NP_001153522.1; NP_001153524.1; NP_001153544.1) foram identificadas na fração 1. As proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins – HSPs) fazem parte das chaperonas moleculares em sua ação protetiva nos enrolamentos incorretos das proteínas, (Frydman, 2001; Kregel, 2002). As proteínas de choque térmico são divididas em famílias distintas de acordo com sua massa molecular e homologia entre as suas sequências. As suas principais famílias são HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 (Sarkar et al., 2006; Elekonich, M. M., 2009). Essas proteínas tem sido evidenciado sua ação na montagem, tráfego, degradação, regulação de fatores de transcrição, secreção e proteínas quinases, ainda quando seus níveis são aumentados após diferentes acometimentos de estresse, demonstra o seu papel na homeostase celular (WELCH, 2005).

Nesse contexto essa classe de proteínas é responsável por respostas metabólicas do organismo quando exposto a algum estresse, atua como antioxidante aumentando a massa muscular para realização das funções de voo. Sua função molecular é voltada as ligações de ATP que dependente dessas ligações atuando juntamente com proteínas da classe das Chaperoninas, que são protetoras no momento de dobramento das proteínas em sua, formação tridimensional, para exercer sua ação futura específica (ELEKONICH, 2009).

As proteínas das classes do complexo F1 ATPase: Subunidade alfa da ATP sintase – Gene 409114 e Subunidade beta da ATP sintase – Gene 551766 (XP_392639.1 e XP_006564892.1), que está localizada fora da membrana plasmática, ou seja, na membrana interna mitocondrial que separa a matriz mitocondrial do espaço intermembranar, desenvolvem funções catalíticas, sendo composta por cinco unidades (alpha, beta, gama, delta e épsilon), alpha e beta respectivamente, voltadas ao fornecimento de energia para o funcionamento das células onde as subunidade gama funciona como um rotor interno da célula, que é composta juntamente pelas subunidade alpha e beta, que produz ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana (MOTA, 2018).

As proteínas do tipo NIF, neste caso, é a Isoforma X3 da proteína 1 semelhante a NIF3 (XP_006569643.1), que são responsáveis na fixação de nitrogênio, onde são codificados em proteínas que estão relacionados diretamente neste processo, ou seja, na geração de energia para a nitrogenase, maturação pós-traducional da nitrogenase e regulação do nível de transcrição (UNIPROT, 2024 & INTERPRO, 2024).

Foram encontradas proteínas Isoforma X1 da proteína 2 contendo motivo tripartido, Isoforma X2 da proteína 2 contendo motivo tripartido, Isoforma X3 da proteína 2 contendo motivo tripartido, Isoforma X4 da proteína 2 contendo motivo tripartido e Isoforma X5 da proteína 2 contendo motivo tripartido (XP_006561121.1, XP_016767881.1, XP_006561120.1, XP_016767879.1, XP_016767880.1), são proteínas que tem a função molecular de ligação de íons de Zinco e função no processo biológico de regulação do processo metabólico de macromoléculas aumentando ou diminuindo a velocidade das reações químicas do organismo. Desempenham papéis em uma variedade de funções celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, oncogênese e apoptose, sendo ainda ligada a imunidade antiviral nas abelhas (UNIPROT, 2024 & INTERPRO, 2024).

Foram identificadas enzimas Prováveis aconitato hidratase, isoforma mitocondrial X1 e X2 (XP_391994.1 e XP_006560252.1), que atua em uma das etapas da respiração celular, como catalizadora na transformação reversível do citrato em isocitrato, no momento da formação intermediária do ácido tricarboxílico cis-aconitato, ou seja, é uma de muitas enzimas caracterizada por realizar mais de uma função sendo uma enzima plurifuncional, estando na segunda etapa na reação do ciclo do ácido cítrico na formação do isocitrato (LEHNINGER, 2019). O metabolismo de glicídios é de grande importância para o desenvolvimento e homeostase energética de todos os organismos, sendo o catabolismo de carboidratos a via principal de obtenção de energia durante o desenvolvimento embrionário (GUIZZO et al., 2012). Devido a sua importância diante da produção e formação de moléculas energéticas, a aconitato hidratase é uma proteína que caracteriza o funcionamento normal das atividades cerebrais das abelhas *Apis mellifera* (PAULA, 2020).

A proteína Krasavietz (XP_395256.3) tem a função segundo a base de dados FlyBase (2024), de ligação de pequenas subunidades ribossômicas, ligação do fator de iniciação da tradução, ligação ao ribossomo, ligação proteica. Está envolvido no processo biológico descrito como comportamento, célula folicular do desenvolvimento da câmara do ovo, resposta ao composto contendo oxigênio, memória de longo prazo, regulação do processo biossintético. Expressão máxima observada em estágios ao longo da embriogênese, em estágios ao longo do período larval, em estágios ao longo do período pupal, em estágios femininos adultos ligado ao sistema reprodutor. Segundo a base de dados UniProt (2024), pode estar envolvido a formação de memória. Segundo a base de dados Alliance of Genome Resources (2024), permite a atividade de ligação de pequenas subunidades ribossômicas e a atividade de ligação do fator de iniciação da tradução. Envolvido em diversos processos, incluindo resposta comportamental ao etanol e memória de longo prazo. Localizado em diversos componentes celulares, incluindo corpo celular neuronal. É expresso em diversas estruturas, incluindo cabeça adulta, sistema nervoso central e neurônios colinérgicos

A proteína Suposto homólogo A1 de 7 membros da família aldeído desidrogenase (XP_394614.1), tem função parecida com proteínas membros da família aldeído desidrogenase, onde em estudo proteômico da glândula hipofaríngea, esta enzima foi relatada como participante do metabolismo energético e de carboidratos desta glândula em nutridora (SANTOS et al, 2005).

Encontramos as proteínas Transportador facilitado de TREALOSE Tret1-2 homólogo isoforma X1, X2 e X3 (XP_006562376.1, XP_006562374.1, XP_006562377.1, XP_016771901.1, XP_623823.1, XP_006562375.1). Segundo a base de dados UniProt é atuante como atividade de transporte transmembranar de moléculas para dentro e para fora das células. Constituinte da membrana plasmática, onde a trealose é da classe dos glicídios sendo prevalentes em borboletas, gafanhotos e abelhas, no qual o açúcar circulante no sangue é a trealose e também quando decomposta em glicose pela enzima trealase podendo ser utilizada pelo inseto em ocasiões de trocas nutritivas entre abelhas e larvas. Dentro deste contexto essa proteína da classe de transportadores é que facilita a ação da trealose (OUCHEMOUKH, et al, 2010).

A proteína 3 contendo repetição WD – Gene LOC552439 (XP_624815.1), é uma proteína contendo domínio de repetição WD sendo um termo alternativo para WD40, ou seja, é uma pequena unidade estrutural de proteínas que tem a função de sinalização celular, regulação da transcrição e controle do ciclo celular na autofagia e apoptose, ou seja, proteínas que contêm repetições WD40 frequentemente atuam como plataformas de montagem de complexos multiproteicos que são duas ou mais cadeias polipeptídicas associadas (KRAEMER, *et al*, 2000).

A proteína Transportadora ácido gama amino butírico (GABA) dependente de sódio e cloreto na isoforma X1 (XP_395197.2), o comando do impulso nervoso no envolvimento das células nervosas são dependentes da localização dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- em sua concentração, contudo para que haja a proliferação dos estímulos nervosos entre as sinapses é necessária à ação de neurotransmissores. Os principais neurotransmissores é a acetilcolina e o ácido gama amino butírico (GABA), (DOWSON, 1977). Dentre suas atividades normalmente, o GABA atua como inibidor do estímulo nervoso na membrana pós-sináptica, reestabelecendo o estado de normalidade do sistema nervoso central e muscular, aumentando a permeabilidade da membrana aos íons Cl^- (MOHLER *et al.*, 2004).

Dentre as proteínas de membrana, encontramos a proteína Proteína Fosfatase 1H – Gene 408701 (XP_392237.2). Tais proteínas são consideradas ativamente importante para de degeneração dos ovariolos das abelhas operárias e também na modificação do corpo gorduroso no momento da preparação de sua metamorfose que são divididas em quatro etapas. Dentre todo conteúdo que compõe o pólen das abelhas *Apis mellifera*, a fosfatase faz parte, juntamente com a catalase, redutase e lactase, de 7,2% do total de pólen produzido pelo inseto (FAVARETTO, 2003). Essa enzima constitui fatores alergênicos tóxicos para os seres humanos e animais (JESUS, 2020)

A proteína Regulador da helicase 1 de alongamento de telômeros homólogo – Gene LOC412546 (XP_016770434.1), são enzimas responsáveis em regular o avanço dos garfos de replicação do DNA, onde vai promovendo a abertura da hélice do DNA quebrando as ligações de hidrogênio e separando em duas fitas simples para que possa sofrer replicação. Dentro desse atua com uma anti-recombinase, neutralizando a recombinação tóxica e limita o cruzamento durante a meiose. Através dos telômeros transmitem suas características hereditárias quanto a sua integridade e igualdade homóloga, sendo são complexos nucleoproteicos

especializados que formam as extremidades naturais dos cromossomos eucarióticos e têm importantes funções estruturais e protetoras (UNIPROT, 2024).

A proteína de processamento de pré-rRNA FTSJ3- Gene 107963983 (XP_016770530.1), atua juntamente com outras proteínas como processamento de pré-rRNA, com atividade catalítica no processamento de pré-rRNA e proliferação celular na via que leva à maturação rRNA (UNIPROT, 2024).

A proteína oxidorreductase semelhante à sacaropina desidrogenase, (XP_624456.2), enzimas essas que catalisam reações redox de transferência de elétrons para outros reagentes, sendo que a sacaropina desidrogenase é uma ação intermediária no metabolismo do aminoácido antiviral Lisina (DEPONTE, 2013).

Foi encontrada a proteína Fosfatase ácida tipo 7 (XP_396873.2), que se trata da fosfatase ácida da apitoxina sendo considerada um dos principal alergênicos componentes da apitoxina, sendo a Fosfolipase A2 a mais alergênica, seguindo da hialuronidase e da proteína aqui encontrada, ocupando 3% da base seca da apitoxina (KETTNER et al., 1999). Esta enzima está associada à liberação de histamina dos basófilos humanos, além de produzir inflamação e ardor na pele (MAIA, 2002).

A proteína tRNA treonilcarbamoiladenosina-metiltiotransferase (XP_396696.4), é encontrada nos corpos gordurosos das abelhas operárias sendo um catalisador que colabora em ações oxidativa por conta da adenosina, transcrição do tRNA pela treonina e relações com o sistema nervoso do inseto pela cabamoil (LEHNINGER, 2019). Atuante na metilação do DNA genômico onde ocorre a substituição de um átomo de hidrogênio (H) por um metil (CH₃) (BATAGLIA, 2018).

Muitas proteínas foram encontradas como relacionado na Figura3, mas nenhuma com relação ao envenenamento das abelhas *Apis mellifera*, mas o processo de atuação de tais proteínas ainda deixa dúvidas sobre os conceitos de seus impactos no corpo humano, onde temos proteínas que desenvolvem ações térmicas de choque térmico, características do Alérgeno C uma das propriedades do veneno. Sendo a proteína Fosfatase ácida tipo 7, tendo relação ao envenenamento das abelhas africanizadas *Apis mellifera* como um potente proteína da classe dos alergênicos.

Na fração tabela 3 podemos encontrar algumas proteínas descaracterizadas em sua relação, sendo essas acometidas por algumas dessas ações ou outras existentes.

6. CONCLUSÃO

Utilizando técnicas proteômicas para identificação das proteínas presentes nas micorvesículas do veneno de abelha *Apis mellifera*, após descarte do volume morto da coluna, 4 frações foram eluídas e coletadas e neste parâmetro somente as frações F1 e F2 foram aptas a pesquisa científica com microvesículas. Desta forma, supoe-se que, as microvesículas presentes no veneno da abelha *Apis mellifera* são frutos do desprendimento de brotos membranares de orgaos/tecidos durante sua vida, os quais podem ser conduzidos para a glandula de veneno pela proximidade que a mesma tem com o intestino deste inseto.

Muitas proteínas foram encontradas, onde nenhuma com relação ao envenenamento das abelhas africanizadas *Apis mellifera* mas o processo de atuação de tais proteínas ainda deixa dúvidas sobre os conceitos de seus impactos no corpo humano, onde temos proteínas que desenvolvem ações térmicas característica do Alérgeno C uma das propriedades do veneno, ações catalíticas e de transporte.

Dentre várias proteínas encontradas a proteína acid phosphatase type 7 (Fosfatase ácida tipo 7) juntamente com a proteína Fosfatase 1H, têm relação ao envenenamento das abelhas africanizadas *Apis mellifera*, induz reações de toxicidade que são inoculadas durante a ferroada no momento de defesa das abelhas melíferas, conduzido o acometido a reações alérgicas após envenenamento da apitoxina.

Por fim os resultados obtidos neste trabalho serão de grande contribuição para próximos estudos envolvendo as proteínas caracterizadas nas microvesículas, qual a sua ação no corpo humano após o desprendimento de microvesículas das células, proveniente do envenenamento de múltiplas picadas de abelhas *Apis mellifera*.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU, R. M. M. Efeito de choques elétricos no comportamento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). 1996. 102f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.
- ALLIANCE OF GENOME RESOURCES. Fração 1: Proteína Krasavietz. Disponível em: <https://www.alliancegenome.org/gene/FB:FBgn0250753>. Acesso em 04/01/2024.
- ALVES, T. I. P. Aspectos históricos da apicultura em Sergipe: gerenciamento e aplicação de arranjo produtivo local de apicultura. 2016. 78 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2016. Disponível em: <https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/handle/set/3083?show=full>. Acesso em 25/01/2024.
- ARBOITTE, M. Z. Figura 1 – Abelha realizando uma ferroadada. Disponível em chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/670/2019/07/Morfologia-abelha.pdf>. Acesso em 03/01/2024.
- ARBOITTE, M. Z. Figura 2 – Sistema Gladular da Abelha. Disponível em chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/670/2019/07/Morfologia-abelha.pdf>. Acesso em 03/01/2024.
- BARBOSA, A. N. et al. Single-Arm, Multicenter Phase I/II Clinical Trial for the Treatment of Envenomings by Massive Africanized Honey Bee Stings Using the Unique Apilic Antivenom. *Front Immunol.* 2021 Mar. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.653151/full>. Acesso em 05/01/2024.
- BARBOSA A. N. et al. Soro antiapílico. 1ª ed. Botucatu (SP), CEVAP-UNESP, 2014. Disponível em: <https://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-017-0106-y>. Acesso em 25/01/2024
- BARRAVIERA, B. Acidentes por abelhas e vespas. In: BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 1994. p. 339-344.
- BASE DE DADOS DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS E SUAS FUNÇÕES UniProt. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>. Acesso em 18/12/2022.
- BATAGLIA, L. Maquinaria epitranscriptômica em *Apis mellifera*: identificação, anotação gênica e expressão. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002961757>. Acesso em: 05/01/2024.
- BENTON, A. W., MORSE, R. A., STEWART J.D. Venom collection from honey bees. *Science* 142: 228-230, 1963.
- BOGDANOV, S. Bee Venom: Production, composition, quality. In: The Bee Venom Book. Brisbane Amateur Beekeepers' Society Inc: Brisbane, Australia. Disponível em: <https://www.brisbanebeekeepers.club/The-Bee-Venom-Book>. Acessado em: 16 abr. 2022
- BUCIO-VILLALOBOS, C. M. MARTINEZJAIME, O. A. Extracción de apitoxina com un colector elettrico em irapuato, guanajuato, Mexico. *AGRON. MESOAM.* v. 30, n. 2, p. 459-467, 2019.

CAMUSSI, G. et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, v. 78, n. 9, p. 838-848, 2010. Review.

CARREGARI, V. C, et al. Snake Venom Extracellular vesicles (SVEVs) reveal wide molecular and functional proteome diversity. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30104604/>. Acesso em 26/01/2024

CARVALHO, D. M. C. et al. Apicultura em São Raimundo Nonato, Piauí. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 14, n. 1, p. 85-91, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332715724_Apicultura_em_Sao_Raimundo_Nonato_Piaui. Acesso em 25/01/2024.

COCUCCI, E. MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends cell biol.*, 25 (6), 364-372, 2015.

COSTA, A. C. O. et al. Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera*: Boas práticas de produção e extração. *Boletim Didático*, [S. l.], n. 148, 2020. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmninnibpcjpcglclefindmkaj/https://ciram.epagri.sc.gov.br/ciram_arquivos/apicultura/acervo/BD148-qualidade-mel-abelhas.pdf. Acesso em 25/01/2024.

CRUZ, J. M. T. et al. A novel apilic antivenom to treat massive, africanized honeybee attacks: A preclinical study from the lethality to some biochemical and pharmacological activities neutralization. Publicado em 05 de Janeiro de 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/1/30>. Acesso em: 25/01/2024.

DOMINGOS, A. T. S.; NÓBREGA, M. M.; SILVA, R. A. Biologia das abelhas *Apis mellifera*: Uma revisão bibliográfica. *Acta Apicola Brasileira*, v. 4, p. 8, 2016. Disponível em: <https://agris.fao.org/search/en/providers/122436/records/64747bfc2d3f560f80aefb27>. Acesso em 25/01/2024.

ELEKONICH, M. M. 2009. Extreme thermotolerance and behavioral induction of 70-kDa heat shock proteins and their encoding genes in honey bees. *Cell Stress and Chaperones*, 14(2): 219-226.

FAVARETTO, V. F. Atividade da fosfatase ácida nos ovários, hemolinfa e corpo gorduroso durante a diferenciação de costas e metamorfose de *Apis mellifera*. 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001366889>. Acesso em 05/01/2024.

FERNANDEZ, M. L. et al. Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. *BR. J. DERMATOL.*, 158 (2), 281-290, 2008.

FERREIRA, R. S. J. et al. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011000142X?via%3Dihub>. Acesso em 25/01/2024

FlyBase para encontrar informações sobre fenótipos/função/estoques/expressão genética. Fração 1: Proteína Krasavietz. Disponível em: <http://flybase.org/reports/FBgn0250753>. Acesso em 03/01/2024.

FUNARI, S. C. R. et al. Venon production by africanized honeybees (*Apis mellifera*) and africanized-european hybrids. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 7, n. 2, 2011.

GONÇALVES-MACHADO, L. et al. Extracellular vesicles from Bothrops jararaca venom are diverse in structure and protein composition and interact with mammalian cells. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36422980/>. Acesso em 25/01/2024.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, 2011.

INTERPRO. Família TRIM/RBCC. Disponível em <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR047153/>. Acesso em 03/01/2024.

ISFORT, R. J. Proteomics analysis of striated muscle. *Journal of Chromatography* 771, 155-165, 2002.

JESUS, N. R. M. Caracterização do panorama sanitário apícola nacional e estudo preliminar de fatores de risco de manejo apícola na ocorrência de doenças da *Apis mellifera* em Portugal. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal, 2020. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/19753/1/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20panorama%20sanit%C3%A1rio%20ap%C3%ADcola%20nacional%20e%20estudo%20preliminar%20de%20fatores%20de%20risco%20de%20manejo%20ap%C3%ADcola%20na%20ocorr%C3%Aancia%20de%20doen%C3%A7as%20da%20Apis%20Mellifera%20em%20Portugal.pdf>. Acesso 25/01/2024

KONALA, V.B. et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytherapy*. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26631828/>. Acesso em 25/01/2024.

Kraemer, C. et al. Mapping and Structure of DMXL1, a Human Homologue of the DmX Gene from *Drosophila melanogaster* Coding for a WD Repeat Protein. *Genomics*. 64. 97-101. 10.1006/geno.1999.6050. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0888754399960500>. Acesso em 04/01/2024.

LEHNINGER, D. MICHAEL, M. C. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 7. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. XXXIV, 1278p. Referência contida na página 627.

LIAO, T. et al. miRNAs derived from cobra venom exosomes contribute to the cobra envenomation. Disponível em: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-023-02131-7>. Acesso em 25/01/2024.

MATHIVANAN, S. JI, H. SIMPSON, R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 10, p. 1907-1920, 2010.

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 30, n.3/4, p.113-117, 2006.

MAIA, A. B. O potencial terapêutico da apitoxina. *Mensagem Doce*. APACAME 2002. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/66/apitoxina.htm>. Acesso em 05/01/2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - 2024. Acidentes por abelhas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/acidentes-por-abelhas>. Acesso em 03/01/2024.

MODANESI, M. S. Produção de apitoxina por abelhas *Apis mellifera* L. E seu efeito na expressão de genes relacionado ao estresse. Orientador Ricardo de Oliveira Orsi. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.fmvz.unesp.br/Home/ensino/pos-graduacao768/zootecnia/dissertacoeseses/melina-stoian-modanesi.pdf>. Acesso em 26/01/2024.

MOHLER, H. et al. Specific GABA (A) circuits in brain development and therapy. *Biochem. Pharm.*, v. 15, n. 8, p. 1685-1690, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15451412/>. Acesso em 04/01/2024.

MOTA, M. V. B. Análise da expressão tecidual de atpase da bomba sódio/potássio (SUBUNIDADE ALFA-3) e atp sintase mitocondrial (SUBUNIDADE BETA) em espécimes cirúrgicos de pacientes com esclerose hipocampal 2018. 1 recurso online (75 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1634782>. Acesso em: 15/11/2022.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. N. COUTO, L. A. Apicultura: manejo e produtos. Jaboticabal: Funep, 2002. 191p.

ORSI, R. O. et al. Standardized guidelines for Africanized honeybee venom production needed for development of new aplic antivenom. Publicado em 21 de Janeiro de 2024. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10937404.2023.2300786>. Acesso em 25/01/2024.

OUCHEMOUKH, S. et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry*. v. 121, p. 561-568, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/223482226_HPLC_sugar_profiles_of_Algerian_honeys. Acesso em 04/01/2023.

PAULA, G. M. Análise neuroproteômica do comportamento agressivo de *Apis mellifera* / Gabriela Paula. -- Rio Claro, 2020, 125 páginas. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bits/treams/58f933ff-53c7-4be0-885e-e4ae415bc499/contente>. Acesso em 04/01/2024.

PEGORARO, A. et al. Aspectos práticos e técnicos da Apicultura no Sul do Brasil. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2017. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/45536>. Acesso em 25/01/2024.

PEIREN, N, VANROBAEYS, F. DE GRAAF, D. C. DEVREESE, B. VAN BEEUMEN, J. JACOBS, F. J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Aug 31;1752(1):1-5. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.07.017. PMID: 16112630. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16112630/>. Acesso em 07/01/2024.

PONTES, L. G. et al. Extracellular vesicles in infectious diseases caused by protozoan parasites in buffaloes. Published online 2020 May 29. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7262785/#B42>. Acesso em 25/01/2023.

QUEIROGA, C. F. M. A.; LEITE FILHO, F. G.; MACHADO, A.V.; COSTA, R.O. Cadeia Produtiva do Mel de Abelhas: Fonte Alternativa de Geração de Renda para Pequenos Produtores e Qualidade Físico-química do Mel. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*, v. 5, n. 1, p. 24 - 30, 2015. Disponível em:

<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/article/view/3681>. Acesso em 25/01/2024.

RAMOS, J. M. CARVALHO, N. C. (2007). Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal, 6(10):1-21.

RAPOSO, G. STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3575529/>. Acesso em 25/01/2024.

RODRIGUES, N.; HABERMANN, M. A.; ALTEMBURG, S. G. N. Limites e desafios na produção de mel no município de Dom Pedrito. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 9, n. 1, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/85438>. Acesso em 25/01/2024.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; SOUZA, P. M. Apitoxina: Utilização do veneno da abelha *Apis mellifera*. PUBVET, v. 13, p. 153, 2019. Disponível em: <http://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/774>. Acesso em 25/01/2024.

SAILLIET, N. et al. Extracellular vesicles in transplantation. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.800018/full#B1>. Acesso em 25/01/2024.

SANTOS, K.S. et al. Profiling the proteome complement of the secretions from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybee (*Apis mellifera* L.). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15607658/>. Acesso em 04/01/2024.

SANTOS, C. E. E. Acidentes por abelhas (*Apis mellifera*) no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. 2017. 51 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.sbmt.org.br/medtrop2016/wp-content/uploads/2016/10/9633-Acidentes-por-abelhas-Apis-mellifera-no-Estado-do-Rio-Grande-do-Norte.pdf>. Acesso em 25/01/2024.

SCIANI, J. M. et al. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978110002056?via%3Dihub>. Acesso em 25/01/2024.

SHEVCHENKO, A. TOMAS. H. HAVLIS, J. OLSEN, J.V. Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006; 1(6):2856-60.

SILVA, M. G. et al. Rotulagem de méis de *Apis mellifera* vendidos no Alto Sertão da Paraíba, BRASIL. ACTA Apícola Brasileira, v.8, e7777, 2020. Disponível em: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/775/7754209005/html/>. Acesso em 25/01/2024.

SINAN - SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES. ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em 23/11/2023.

SIZOVA, D et al. Proteomics analysis of brain tissue from an alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiology of aging* 28, 357-370, 2007.

SONG, F. et al. Plasma protein profiling of mild cognitive impairment and alzheimer's disease using itraq quantitative proteomics. *Proteome science* 12, 5, 2014.

SOUZA, D. C. Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural. Versão adaptada, São Leopoldo: CEEPRO, 2019. Disponível em: <https://sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/RN/Anexos/Apicultura-Apicultura-Integrada-e-Sustentavel.pdf>. Acesso em 25/01/2024.

SOUZA-IMBERG, A. et al. Origin and characterization of small membranous vesicles presente in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *TOXICON* 136, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010117301939?via%3Dihub>. Acesso em 25/01/2024

UniProt. Fração 1: Proteína de choque térmico cognata 4 - Gene HSP70-4. Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M6UCT9/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Precursor do cognato 3 da proteína de choque térmico - Gene HSP70-3. Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M6URI6/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Proteína de choque térmico semelhante a HSP70Ab - 410620. Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M6UVC2/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Proteína Subunidade alfa da ATP sintase - Gene 409114. Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7R5I4/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Proteína Subunidade beta da ATP sintase - Gene 551766. Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7R5I4/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Isoforma X3 da proteína 1 semelhante a NIF3 - Gene LOC100642636. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A9C6W6D4/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Isoforma X1 da proteína 2 contendo motivo tripartido - Gene 409206. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7IF54/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Isoforma X2 da proteína 2 contendo motivo tripartido - Gene 409206. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7ILH3/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Isoforma X3 da proteína 2 contendo motivo tripartido - Gene 409206. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7GST3/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Isoforma X4 da proteína 2 contendo motivo tripartido - Gene 409206. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7GPD1/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Isoforma X5 da proteína 2 contendo motivo tripartido - Gene 409206. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7IGB0/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Prováveis aconitato hidratase, isoforma mitocondrial X1 e X2 – Gene 409485. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7TF08/entry>. Acesso em 04/01/2024.

UniProt. Fração 1: Proteína Krasavietz – Gene LOC411789. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9VNE2/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração 1: Transportador facilitado de trealose Tret1-2 homólogo isoforma X1, X2 e X3 – Gene LOC551428. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7GPU4/entry>. Acesso em 03/01/2024.

UniProt. Fração1: Proteína 3 contendo repetição WD. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7RAV3/entry>. Acesso em 04/01/2024.

UniProt. Fração 1: Transportadora ácido gama amino butírico (GABA) dependente de sódio e cloreto na isoforma X1. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7IHC8/entry>. Acesso em 04/01/2024.

UniProt. Fração 2: Proteína fosfatase 1H – Gene 408701. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7TET3/entry>. Acesso em 05/01/2024.

UniProt. Fração 2: Regulador da helicase 1 de alongamento de telômeros homólogo - Gene LOC412546. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7MX79/entry>. Acesso em 05/01/2024.

UniProt. Fração 2: proteína de processamento de pré-rRNA FTSJ3 – Gene 107963983. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7II55/entry>. Acesso em 05/01/2024.

UniProt. Fração 2: proteína oxidoredutase semelhante à sacaropina desidrogenase. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A919XZF0/entry>. Acesso em 05/01/2024.

UniProt. Fração 2: Fosfatase ácida tipo 7. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A217EFQ4/entry>. Acesso em 05/01/2024.

UniProt. Fração 2: tRNA treonilcarbamoiladenosina-metiltiotransferase. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A919Y149/entry>. Acesso em 05/01/2024.

VALDERRAMA, R.H. Aspectos toxicológicos y biológicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. IATREIA, v. 16, n. 3, 2003. Disponível em: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/4004>. Acesso em 23/01/2023.

VALLEDOR L, JORRIN J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two-dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. J Proteomics. 74(1),1-18, 2011.

VIEIRA, J. Biologia molecular da morfogênese diferencial inicial do cérebro em castas de abelhas *Apis mellifera*. 2020. 147 f. Tese (Doutorado em Biociência Aplicada à Saúde) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2020. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1584>. Acesso em 25/01/2024.

WELCH, W. J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1993 Mar 29;339(1289):327-33. doi: 10.1098/rstb.1993.0031. PMID: 8098537. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8098537/>. Acesso em 03/01/2024

WANG, K. ZENG, C. Extracellular Vesicles and Obesity. Agosto de 2023. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-99-1443-2_10. Acesso em 25/01/2024.

WEHBE, R. et al. Bee Venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. Pub. July 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/16/2997>. Acesso em 25/01/2024.

WIKLANDER, O. P. B. et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. Publicado em 20 de Abril de 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.26316>. Acesso em 25/01/2024.

WILLARD, N. K. et al. Proteomic identification and quantification of snake venom biomarkers in venom and plasma extracellular vesicles. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/9/654>. Acesso em 25/01/2024.

XUN, C. et al. Origin and Characterization of Extracellular Vesicles Present in the Spider Venom of *Ornithoctonus hainana*. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/8/579>. Acesso em 25/01/2024.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. J Extracellular Vesicles (2015). Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.27066>. Acesso em 25/01/2024.

ZABOROWSKI, M. P. BALAJ, L. BREAKEFIELD, X.O. LAI, C. P. Vesículas Extracelulares: Composição, Relevância Biológica e Métodos de Estudo. BioCiência (2015) 65:783-97. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26955082/>. Acesso em 25/01/2024