



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

Letícia Murback

Variação das isoformas de melitina no veneno de *Apis mellifera* Africanizada

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Botucatu

2022

Letícia Murback

**Variação das isoformas de melitina no veneno de *Apis mellifera*
Africanizada**

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Murback, Letícia.

Variação das isoformas de melitina no veneno de *Apis mellifera* Africanizada / Letícia Murback. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Daniel Carvalho Pimenta
Capes: 20800002

1. Abelhas. 2. Abelha-europeia. 3. Venenos de abelha.
4. Melitino. 5. Isoformas de proteínas.

Palavras-chave: *Apis mellifera* Africanizada; Apitoxina;
Isoformas; Melitina.

AGRADECIMENTOS

Quero começar agradecendo a Deus por me guiar e me sustentar até agora e por me provar que sou capaz de tudo. Por todas as dificuldades que me permitiu passar, que me tornaram mais forte.

Agradeço à minha família por todo o apoio e sacrifícios que fizeram para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Por ser meu porto seguro, agradeço a Mariana, Sheila, Terezinha, Elenize, Vicky e Francilene.

Professor Daniel Pimenta, meu orientador, obrigada por seu amor, paciência e dedicação. Agradeço seu incentivo e sua fé em mim.

Ao professor Ricardo Orsi, obrigada pelos conselhos e todo auxílio na coleta da apitoxina.

Obrigada, Dra. Luciana Curtolo de Barros, por segurar minha mão e me instruir com toda paciência, e também por me emprestar seu ombro durante muitos momentos difíceis.

A toda a equipe da Pós-Graduação, em especial a Tatiane, que sempre esteve pronta para me ajudar.

À Daniela Araújo Vilella, minha irmã de caminhada, pelas risadas, conversas e auxílio que facilitaram minha jornada.

Aos meus amigos de laboratório e de manejo, Kauan, Leonardo Melo, Laudicéia, Gustavo, Vitória, Davi, Bruna e Bárbara, assim como às funcionárias Sandra e Tiquinha, e à técnica Alessandra, pelo simples fato de estarem presentes e alegrar meus dias.

Obrigada a todos que estiveram comigo nesta fase da minha vida.

RESUMO

A melitina, principal componente do veneno das abelhas melíferas, é responsável pela atividade hemolítica e quadro de reação alérgica. Estudos identificaram variações de nucleotídeos em melitina derivada entre *A. mellifera* e *A. cerana*, porém a única descrita bioquimicamente até o momento é a melitina-S. Nosso estudo constatou a presença de inúmeras isoformas de melitina em apitoxinas de dois apiários da cidade de Botucatu (Edgárdia e Lageado), através da análise proteômica “shotgun” da fração melitina. Para comprovar a existência destas isoformas, as seguintes análises foram utilizadas: HPLC detecção UV, com 27 isoformas identificadas, LC-MS, 56 isoformas, sequenciamento ‘de novo’, 33 sequências, e proteômica, 72 sequências de isoformas. A análise com o Peaks, apresentou os novos N-terminais e C-terminais observados nos espectros de massas do “shotgun”, apontando a correlação entre esses dois métodos. A proposta para o padrão de substituição de aminoácidos para a melitina, resultantes dos alinhamentos das 72 sequências peptídicas obtidas do Peaks, também corroboram com as variações indicadas no “shotgun”. É crucial estar ciente da existência das variações dos componentes menores, principalmente na produção de um soro antiveneno, pois em um ataque de 500-1000 picadas, cerca de 0,5 g de veneno pode ser injetado e nesta fase as isoformas começam a desempenhar funções importantes.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, apitoxina, isoformas, melitina.

ABSTRACT

Melittin, the main component of honey bee venom, is responsible for hemolytic activity and allergic reaction. Studies have identified nucleotide variations in melittin derived between *A. mellifera* and *A. cerana*, but the only one biochemically described so far is melittin-S. Our study verified the presence of numerous melittin isoforms in apitoxins from two apiaries in Botucatu city (Edgárdia and Lageado), through shotgun proteomic analysis of the melittin fraction. To prove the existence of these isoforms, the following analyses were used: HPLC UV detection, with 27 isoforms identified, LC-MS, 56 isoforms, 'de novo' sequencing, 33 sequences, and proteomics, 72 isoform sequences. The analysis with Peaks, showed the new N-terminals and C-terminals observed in the shotgun mass spectra, pointing out the correlation between these two methods. The proposed pattern of amino acid substitutions for melittin resulting from the alignments of the 72 peptide sequences obtained from Peaks also corroborate with the variations indicated in the shotgun. It is crucial to be aware of the existence of the variations of the minor components, especially in the production of an antivenom serum, because in a attack of the 500-1000 bites, about 0.5 g of venom can be injected and at this stage the isoforms start to play important roles.

Keywords: *Apis mellifera*, apitoxin, isoform, melitin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. AS 33 SUBESPÉCIES DE ABELHAS <i>A. MELLIFERA</i> ESTÃO DISTRIBUÍDAS ESPACIALMENTE NO MAPA. OS NÚMEROS CORRESPONDEM AO NÚMERO DA SUBESPÉCIE LISTADAS NO QUADRO 1.	4
FIGURA 2. AVANÇO DA <i>A. MELLIFERA</i> PELA AMÉRICA.....	6
FIGURA 3. GLÂNDULA DE VENENO DE UMA ABELHA OPERÁRIA.....	7
FIGURA 4. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA MELITINA. EM BRANCO OS RESÍDUOS HIDROFÓBICOS, EM VERMELHO OS CARREGADOS POSITIVAMENTE E EM CINZA OS POLARES.	9
FIGURA 5. ISOFORMAS DE MELITINA DETECTADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. NUMERAÇÃO BASEADA NO PEPTÍDEO MADURO.	14
FIGURA 6. NOVOS N E C-TERMINAIS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE MASSA.	15
FIGURA 7. A) CROMATOGRAMA DA APITOXINA COLETADA NA FAZENDA EDG. B) CROMATOGRAMA AMPLIADO DAS ISOFORMAS DA FAZENDA EDG.	15
FIGURA 8. A) CROMATOGRAMA DA APITOXINA COLETADA NA FAZENDA LAG. B) CROMATOGRAMA AMPLIADO DAS ISOFORMAS DA FAZENDA LAG.	15
FIGURA 9. 29 PICOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA NA APITOXINA DA FAZENDA LAG.	16
FIGURA 10. 33 PICOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA NA APITOXINA DA FAZENDA EDG.	16
FIGURA 11. A) COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DAS APITOXINAS DE AMBAS AS FAZENDAS (ROSA – LAG/PRETO – EDG). B) COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS COM ENFOQUE NAS ISOFORMAS DA MELITINA.	17
FIGURA 12. A) CROMATOGRAMAS EM UV DAS ISOFORMAS DA FAZENDA EDGÁRDIA. A) ISOFORMA 1, B) ISOFORMA 2 E C) ISOFORMA 3.	18
FIGURA 13. SOBREPOSIÇÃO DAS ISOFORMAS DA FAZENDA EDGÁRDIA.	19
FIGURA 14. A) CROMATOGRAMAS EM UV DAS ISOFORMAS DA FAZENDA LAGEADO. A) ISOFORMA 1, B) ISOFORMA 2 E C) ISOFORMA 3.	19
FIGURA 15. SOBREPOSIÇÃO DAS ISOFORMAS DA FAZENDA LAGEADO.	20
FIGURA 16. SOBREPOSIÇÃO DE TODAS AS ISOFORMAS.	20
FIGURA 17. DETALHE DA REGIÃO ENTRE 13 E 23 MINUTOS DO GRADIENTE DE SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO ISOFORMA 1 DA FAZENDA EDGÁRDIA, MOSTRANDO O CROMATOGRAMA BASE (BPC) E ALGUNS CROMATOGRAMAS DE ÍONS EXTRAÍDOS (VALORES DE m/z NO CANTO SUPERIOR DIREITO) UTILIZADOS NA DECONVOLUÇÃO.	21
FIGURA 18. INTEGRAÇÃO DO CROMATOGRAMA ENTRE 18,5 E 19 MIN, DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO ISOFORMA 3 DA FAZENDA LAGEADO, INDICANDO A PRESENÇA DE UMA ISOFORMA PREDOMINANTE DE MELITINA ELUINDO NESSE TEMPO DE RETENAÇÃO.	22
FIGURA 19. DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE CARGA DO ÍON 570,13. A DIFERENÇA DE 0,2 m/z CORRESPONDE A UM ÍON COM 5 CARGAS, DERIVADO DE UM PEPTÍDEO DE 2845,65 Da, QUE CORRESPONDE A PRÓPRIA MELITINA.	22
FIGURA 20. DISTRIBUIÇÃO DA CONFIANÇA ESTATÍSTICA (ALC) PARA O SEQUENCIAMENTO DE NOVO BASEADO NOS DADOS REAIS (AZUL) VERSUS ESTIMATIVAS ERRÔNEAS (ROSA), DE ACORDO COM O SOFTWARE PEAKS STUDIO 7.	29
FIGURA 21. DISPERSÃO DO ERRO DE MASSA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ESPECTROS MEDIDOS.....	29
FIGURA 22. DISTRIBUIÇÃO DO ERRO DE MEDIÇÃO DE MASSA EM FUNÇÃO DO VALOR DE m/z DO ÍON PRECURSOR SELECIONADO.	29
FIGURA 23. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS 72 VARIANTES DE MELITINA IDENTIFICADAS PELO ALGORITMO SPIDER DO PEAKS STUDIO 7, NUMERADAS SEQUENCIALMENTE DE CONFORME APRESENTADO NA TABELA 6.....	33
FIGURA 24. ANÁLISE DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS 72 VARIANTES DE MELITINA REALIZADA PELO MVIEW 1.6.	35

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. TAXONOMIA DAS PRIMEIRAS ABELHAS A. MELLIFERA.	2
---	---

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPONENTES DA APITOXINA.....	8
TABELA 2. INFORMAÇÕES DO TEMPO DE RETENÇÃO E ÁREA EM PORCENTAGEM DOS PICOS COLETADOS.....	17
TABELA 3. MASSAS MOLECULARES PRESENTES NAS FRAÇÕES COLETADOS EM AMBAS AS FAZENDAS SEGUNDO SEU TEMPO DE RETENÇÃO.	23
TABELA 4. MASSAS MOLECULARES (Da) PRESENTE NAS APITOXINA COLETADAS NAS FAZENDAS.	26
TABELA 5. DADOS DA FRAGMENTAÇÃO LC-MS/MS.	27
TABELA 6. SEQUENCIAMENTO PEPTÍDICO DAS FRAÇÕES (PEAKS).	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HISTÓRIA, IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO DAS ABELHAS	1
1.2. CHEGADA DAS ABELHAS MELÍFERAS NO BRASIL.....	5
1.3. APITOXINA	6
1.4. MELITINA.....	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. OBJETIVO GERAL.....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. METODOLOGIA	11
3.1. LOCAL DE COLETA.....	11
3.2. ANÁLISE PROTEÔMICA “SHOTGUN” DA FRAÇÃO DA MELITINA.....	12
3.3. PROCESSAMENTO DE DADOS.....	12
3.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA / FASE REVERSA (CLAE/FR).....	13
3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-UV)	13
4. RESULTADOS	14
4.1. SHOTGUN DA FRAÇÃO DA MELITINA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	14
4.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA / FASE REVERSA (CLAE/FR).....	15
4.3. SEGUNDA ETAPA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA / FASE REVERSA (CLAE/FR).....	17
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	37
7. ETAPAS FUTURAS	38
8. REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	41
1. APROVAÇÃO PELO CEUA/FMVZ	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. História, importância e distribuição das abelhas

Registros fósseis indicam que as abelhas surgiram no continente asiático, a cerca de 45 milhões de anos atrás, e o uso humano delas remota a 2400 a.C. Na Grécia antiga, Hipócrates, o pai da medicina, já utilizava as abelhas para produzir mel e preservar neste as virtudes de plantas medicinais de seu interesse¹.

Os egípcios foram a primeira civilização a empregar potes de barro como colmeias e transportar abelhas para mais perto de suas casas para que o mel pudesse ser consumido. Anteriormente, a coleta de mel exigia sair em busca de colmeias, que frequentemente se encontravam em locais perigosos e colocavam em risco a vida do coletor, transformando o processo em uma verdadeira caça por esses insetos^{1,2}.

O homem vem atribuindo às abelhas enorme importância devido à diversidade de recursos que elas podem fornecer, o que as torna muito importantes economicamente, e essa importância econômica do mel prevalece até os dias de hoje. Os principais países exportadores de mel são China, Argentina, México, Estados Unidos e Canadá. Outros produtos apícolas que movimentam o mercado incluem a cera, que é usada nas indústrias cosmética, farmacêutica e de velas, própolis, geleia real, além de as abelhas serem os principais polinizadores das plantas³.

As abelhas do gênero *Apis*, que são membros da ordem Hymenoptera e superfamília Apoidea, originalmente encontradas nativamente na Europa, África e Ásia antes de terem sido introduzidas em outras partes do mundo por meio do homem.⁴ As abelhas da espécie *A. mellifera* podem ser encontradas em uma variedade de ambientes, incluindo savanas, desertos, florestas tropicais e áreas costeiras. Devido à diversidade de clima e vegetação, muitas subespécies/raças de abelhas evoluíram, cada uma com suas próprias adaptações e características únicas¹. O padrão taxonômico moderno da abelha *A. mellifera* encontra-se no Quadro 1, assim como sua distribuição espacial (Figura 1).

Quadro 1. Taxonomia das primeiras abelhas *A. mellifera*.

Nº	SUBSESPÉCIE	NOME POPULAR	DISTRIBUIÇÃO
África (11 subespécies)			
1	<i>A. mellifera lamarckii</i> (Cockerell 1906)	Abelha egípcia	Egito, Sudão
2	<i>A. mellifera litorea</i> (Smith 1961)	Abelha costeira da África Oriental	Quênia
3	<i>A. mellifera adansonii</i> (Latreille 1804)	Abelha da África Ocidental	Nigéria, Burquina Fasso, Uganda, Tanzânia, Zâmbia, Senegal, Sudão
4	<i>A. mellifera scutellata</i> (Lepeletier de Saint Fargeau, 1836)	Abelha africana	Quênia, Tanzânia, Uganda, República da África do Sul, Somália
5	<i>A. mellifera monticola</i> (Smith 1961)	Abelha da montanha da África Oriental	Montanhas do Quênia, Tanzânia
6	<i>A. mellifera capensis</i> (Escholtz 1822)	Abelha do Cabo	Região do Cabo na República da África do Sul
7	<i>A. mellifera unicolor</i> (Latreille 1804)	Abelha de Madagascar	Madagascar
8	<i>A. mellifera simensis</i> (Meixner et al., 2011)	Abelha etíope	Etiópia
9	<i>A. mellifera sahariensis</i> (Baldensperger 1932)	Abelha do Saara	Marrocos, Argélia, Tunísia, Líbia, Mauritânia, Saara Ocidental
10	<i>A. mellifera intermissa</i> (Maa 1953)	Abelha do Tellian	Marrocos, Líbia, Tunísia
11	<i>A. mellifera jemenitica</i> (Ruttner 1976)	Abelha árabe	Península Arábica, Chade, Arábia Saudita, Somália, Sudão, Uganda, Iêmen
Ásia Ocidental e Oriente Médio (9 subespécies)			
12	<i>A. mellifera ruttneri</i> (Sheppard et al., 1997)	Abelha maltesa	Malta
13	<i>A. mellifera syriaca</i> (Skorikov 1929b)	Abelha Síria	Síria, Israel, Líbano, Palestina, Jordânia
14	<i>A. mellifera mellifera</i> (Linnaeus 1758)	Abelha escura europeia	França, Reino Unido, Suíça, parte europeia da Rússia, Polónia, Dinamarca, Noruega, Suécia, Irlanda
15	<i>A. mellifera pomonella</i> (Sheppard and Meixner 2003)	Abelha Tian Shan	Montanhas Tian Shan do Cazaquistão, Quirguistão
16	<i>A. mellifera sinisxinyuan</i> (Chen et al., 2016)	Abelha Xinyuan	Região Autônoma Uigur da China
17	<i>A. mellifera meda</i> (Skorikov 1929b)	Abelha Persa	Irã, Iraque, Síria, Turquia

Quadro 1. Continuação

18	<i>A. mellifera caucasica</i> (Pollmann 1889)	Abelha caucasiana	Sul da Rússia, Turquia, Geórgia
19	<i>A. mellifera remipes</i> (Gerstäcker 1862)	Abelha armênic	Sul da Rússia, Armênia, Irã, Geórgia
20	<i>A. mellifera anatoliaca</i> (Maa 1953)	Abelha da Anatólia	Irã, Armênia, Síria, Turquia
Europa (13 subespécies)			
21	<i>A. mellifera iberiensis</i> (Engel 1999)	Abelha espanhola	Espanha, Portugal
22	<i>A. mellifera macedonica</i> (Ruttner 1988)	Abelha macedônica	Bulgária, Grécia, Macedônia, Ucrânia
23	<i>A. mellifera ligustica</i> (Spinola 1806)	Abelha italiana	Itália
24	<i>A. mellifera carnica</i> (Pollman 1879)	Abelha carniolana	Eslovênia, Bulgária, Polônia, Áustria, Croácia, Bósnia e Herzegovina, Sérvia, Hungria, Romênia
25	<i>A. mellifera carpathica</i> (Foti 1965)	Abelha dos Cárpatos	Ucrânia, Bulgária, Romênia, Moldávia
26	<i>A. mellifera rodopica</i> (Petrov 1991)	Abelha búlgara	Bulgária
27	<i>A. mellifera cecropia</i> Kiesenweiter 1860	Abelha grega	Grécia
29	<i>A. mellifera siciliana</i> (Dalla Torre 1896)	Abelha siciliana	Sicília
20	<i>A. mellifera adami</i> (Ruttner 1975)	Abelha cretense	Creta
30	<i>A. mellifera cypria</i> (Pollman 1879)	Abelha de Chipre	Chipre
31	<i>A. mellifera artemisia</i> (Engel 1999)	Abelha da estepe russa	Sul da Rússia, Ucrânia
32	<i>A. mellifera sossimai</i> (Engel 1999)	Abelha ucraniana	Crimeia, Sul da Rússia, Ucrânia
33	<i>A. mellifera taurica</i> (Alpatov 1935)	Abelha da Crimeia	Crimeia, Sul da Rússia, Ucrânia

Fonte: Adaptado de Ilyasov RA et al. (2020)⁵.

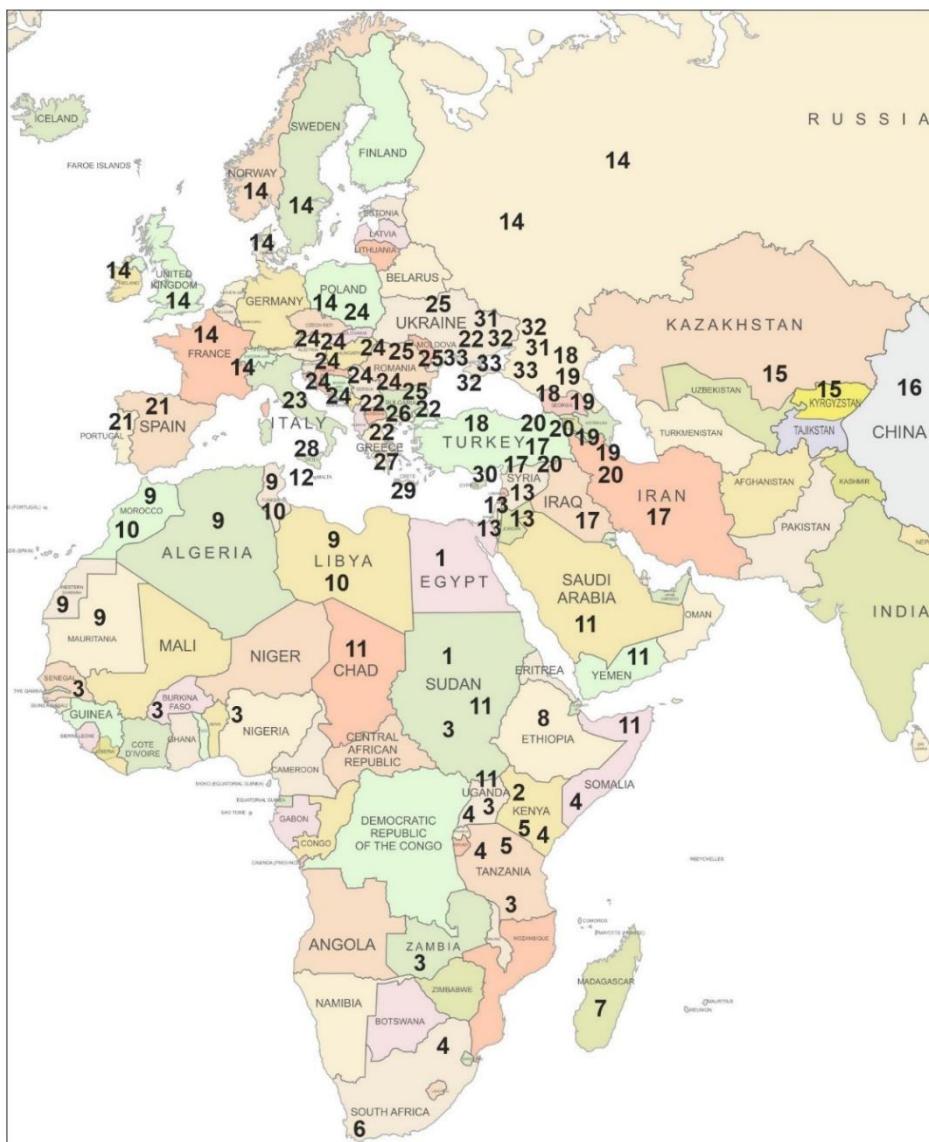


Figura 1. As 33 subespécies de abelhas *A. mellifera* estão distribuídas espacialmente no mapa. Os números correspondem ao número da subespécie listadas no Quadro 1.⁵

As abelhas são insetos sociais que vivem em colônias. Estas se organizam em zangão (macho) e rainha e operárias (fêmeas). As operárias são responsáveis pelo equilíbrio dos ecossistemas, pois através de sua busca alimento que garante a reserva de mel e a sobrevivência de sua colmeia, realizam a polinização de cerca de 80% das plantas. Além da polinização, também são responsáveis pela variação genética na comunidade vegetal, diversidade floral e sua evolução^{6,7}. As glândulas da cabeça das operárias produzem a geleia real, que é uma mistura concentrada de proteínas, aminoácidos essenciais, lipídios únicos, vitaminas e outros⁸.

Nos últimos anos tem-se visto um declínio acentuado em colônias de abelhas melíferas. Estudos apontam que este declínio pode ser causado por inúmeros fatores

tanto internos (doenças e problemas nutricionais) como externos (condições climáticas desfavoráveis e uso de agrotóxicos). Esses fatores externos são os mais preocupantes, pois são ocasionados pelo homem e, se não forem reconsiderados, podem causar grandes problemas para a agricultura, já que as abelhas são essenciais para a polinização e seus benefícios ajudam a impulsionar o mercado global em mais de US\$ 200 bilhões anualmente⁹.

1.2. Chegada das abelhas melíferas no Brasil

Em 1938 chegaram ao sudeste do Brasil as primeiras abelhas melíferas vindas da Europa (*A. mellifera ligustica*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera caucasica* e *A. mellifera mellifera*)¹⁰. No ano de 1956 pesquisadores introduziram no Brasil 33 rainhas de *A. mellifera scutellata*, a abelha africana, com o intuito de realizar um programa de melhoramento genético das subespécies oriundas da Europa, buscando seu desenvolvimento para que fossem mais produtivas e resistentes às condições tropicais do país¹¹.

Dessas, 26 colônias fugiram dentro de um ano de sua chegada e, espalharam-se pela América a uma taxa de 250 a 300 quilômetros por ano, chegando ao México em 1985 e aos Estados Unidos em 1990 (Figura 2). Essas abelhas cruzaram com as populações de abelhas europeias locais, criando o novo híbrido conhecido como abelha africanizada. Essa abelha é mais defensiva e tem maior capacidade de liberação de veneno em sua picada, o que pode causar acidentes graves em humanos e animais domésticos^{6,12}.

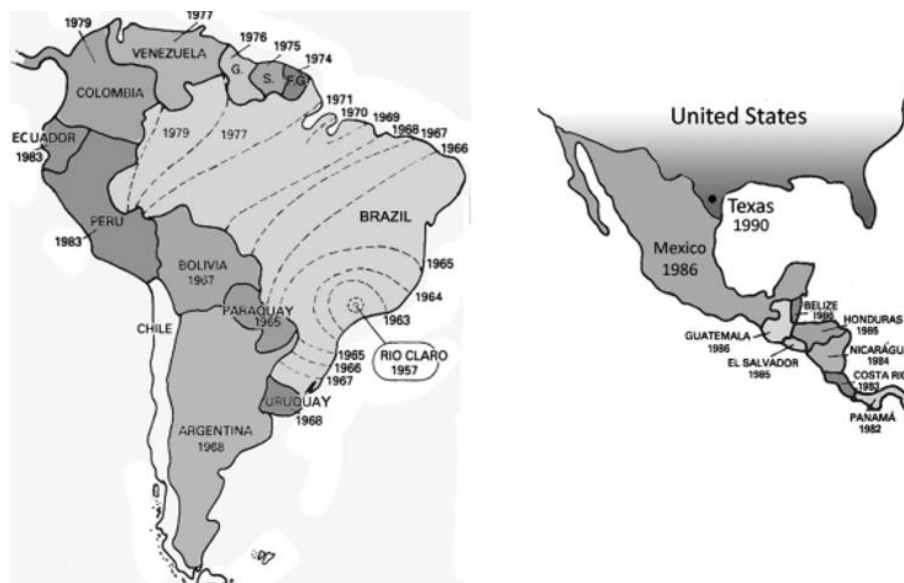


Figura 2. Avanço da *A. mellifera* pela América⁶.

As abelhas africanizadas têm uma taxa de enxameamento rápida e podem se reproduzir rapidamente, tornando-as aptas para climas e flora tropicais. O método de enxame começa com as operárias reconhecendo o local. Assim, elas começam a dança (forma de comunicação) e a glândula de Nasonov libera feromônio para identificar o local de nidificação da nova colônia. Essas características foram essenciais para sua dispersão¹³.

1.3. Apitoxina

Filogeneticamente, o sistema do ferrão originou-se da evolução do aparelho reprodutor. Do ponto de vista prático, este sistema é constituído por dois componentes distintos: uma estrutura muscular quitinosa que suporta e permite a penetração do ferrão e posterior inoculação do veneno, e uma estrutura glandular que é responsável por produzir, armazenar e dispersar o veneno (Figura 3)⁶.

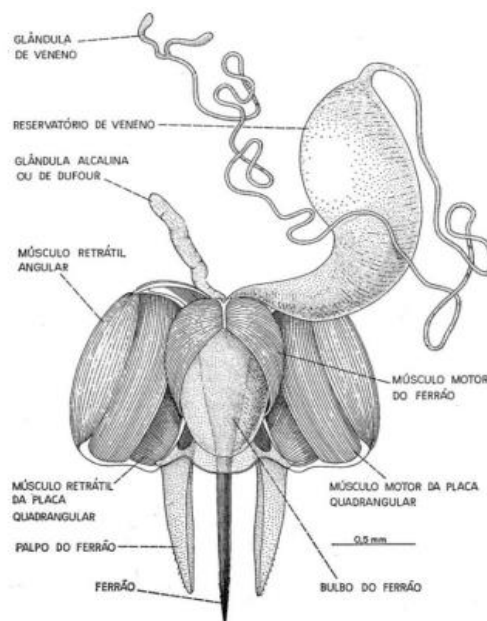


Figura 3. Glândula de veneno de uma abelha operária⁶.

A seção de glândulas de Koshewnikow que estão conectadas ao ferrão em *A. mellifera* são básicas (Dufour) e ácidas (de veneno)¹⁴. Estas glândulas ácida e básica estão ligadas à produção de veneno, a glândula Koshewnikow na rainha tem função de produzir feromônios sexuais para os zangões, já nas operárias produzem feromônios de alarme. A defensividade dessas abelhas é influenciada por fatores ambientais e genéticos, incluindo temperatura, pressão atmosférica e umidade¹⁵.

O veneno produzido pelas abelhas *A. mellifera* para defender a colônia de uma variedade de predadores, é conhecido como apitoxina¹⁶. Sua composição pode variar de acordo com a subespécie, fase do desenvolvimento e hábitos alimentares, havendo também influência do meio de acordo com a sazonalidade⁶.

A apitoxina contém uma intrincada mistura de peptídeos biologicamente ativos, como melitina e apamina, peptídeo degranulante de mastócitos, adolapina, aminas como histamina, dopamina e noradrenalina, enzimas como fosfolipase A2, hialuronidase, vários carboidratos e lipídios (Tabela 1)^{17,18}.

Tabela 1. Componentes da apitoxina¹³.

Peso molecular (D)	Componente	%peso seco	Observação
<1.000	Peptídeos	15	Cadeia de até 9 aminoácidos Histamina, dopamina e noradrenalina
	Monoaminas	3	Aminoácidos isolados, carboidratos e fosfolípidios
	Outros	6	Peso seco
Polipetídios	Melitina	50	Anti-inflamatório
1.000 a 10.000		..	
	Apamina	2	Anti-inflamatório
	PeptídiomCD	2	Anti-inflamatório.
	Outros	3	Tertiapina, secapina e cardiopep.
Enzimas	Fosfolipase A2	12	Alergênico principal
> 10.000	Hialuronidase	2	Alergênico secundário
	Outros	3	Fosfatase ácida, α -glucosidase e esterases.
Outras substâncias		2	Adolapina, inibidor de protease

A fosfolipase A2 é a mais ativa neste veneno e apresenta maior capacidade alergênica na apitoxina¹⁹. De baixa massa molecular, potencial imunogênico significativo e alta atividade catalítica, essa enzima atua na produção de mediadores químicos, proliferação celular, contração muscular e processos anti-inflamatórios. Também possui propriedades antibacterianas e anticoagulantes²⁰.

A hialuronidase corresponde a cerca de 1-2% do peso seco do veneno, sendo responsável por espalhar os componentes do veneno pelos tecidos^{6,21}.

As aminas biogênicas encontradas na apitoxina são: histamina, serotonina, dopamina e noradrenalina. A histamina ocasiona vasodilatação e aumenta a permeabilidade capilar, em níveis elevados pode ativar a liberação de adrenalina²².

A apamina é uma neurotoxina de 10 aminoácidos e duas pontes dissulfeto, representando 2% do peso seco do veneno. Esta provoca efeitos neurotóxicos no sistema nervoso central e também na medula espinhal de mamíferos, causando hiperatividade e convulsões em ratos^{24,25,26}.

O peptídeo degranulador de mastócitos desempenha função no quadro de intoxicação histamínica e é um dos responsáveis pela liberação de mediadores de mastócitos e blastócitos, como histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos²².

Em casos de acidentes com abelhas africanizadas, a manifestação clínica pode resultar tanto em reação de hipersensibilidade por uma única picada (quadro de reação alérgica), envenenamento por poucas picadas (reação tóxica local), ou por múltiplas picadas (reação tóxica sistêmica)²³. Os sintomas apresentados por suas vítimas variam de pequenos inchaços locais, a casos de hipersensibilidade, hemorragias, choque anafilático e insuficiência renal aguda, podendo levar a óbito²¹.

1.4. Melitina

A melitina, principal componente do veneno das abelhas melíferas, possui massa molar de 2.847,5 Da e representa cerca de 50% da massa seca do veneno. Apresenta atividade hemolítica e é responsável pelo quadro de reação alérgica. Ela é formada na abelha durante o processo de síntese a partir de seu precursor, a promelitina, e posteriormente é formada ainda dentro do corpo da abelha. Esse peptídeo catiônico é composto por 26 resíduos de aminoácidos, tendo uma extremidade amino-terminal, composta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos e outra extremidade carboxi-terminal formada principalmente por aminoácidos hidrofílicos (Figura 4)^{27,28}.

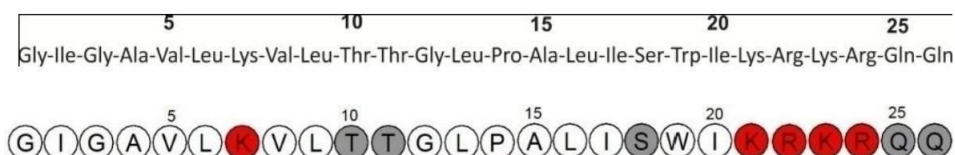


Figura 4. Sequência de aminoácidos da melitina. Em branco os resíduos hidrofóbicos, em vermelho os carregados positivamente e em cinza os polares²⁷.

Quando armazenada na vesícula, a forma tetramérica na qual está se encontra diminui sua toxicidade, porém no momento que o veneno é liberado passa a ter uma alta toxicidade devido a sua forma monomérica. Esse peptídeo pode também adotar diferentes estados de agregação dependendo de sua concentração, além de associar-se à fosfolipase A2 aumentando suas funções catalíticas^{29,12}.

Possui também propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias e analgésicas. Outra função é a lise celular seguida de liberação de histamina, já que esta age como detergente natural diminuindo a tensão superficial da água no nível da membrana plasmática^{25,30,31}.

Devido a esta vasta área de atuação e sua alta capacidade, inúmeras pesquisas são realizadas com a melitina e se mostram muito eficientes, como por exemplo em tratamentos de câncer. Segundo Zarrinnahad, H (2018)³², a melitina induz apoptose em várias linhas de células cancerígenas, como câncer de pulmão, ovário, leucemias, entre outros. Em células cancerígenas do fígado a melitina atua impedindo sua metástase^{32,33}.

Estudos recentes mostram que a melitina afeta a viabilidade e a ultraestrutura dos tripanossomídeos. Essa apresentou atividade *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania infantum* e amastigotas intracelulares, afetando indiretamente este segundo por meio do efeito imunomodulador de macrófagos³⁰. Além disso, este peptídeo em sua forma natural foi capaz de afetar o crescimento de formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi*³⁴.

Foram identificadas variações de nucleotídeos em melitina derivada entre *A. mellifera* e *A. cerana*. Essa comparação revelou sete substituições nucleotídicas diferentes. Também foi relatado variações de sequências localizadas na posição 10 do aminoácido na melitina em diferentes espécies de abelhas: serina em *A. dorsata*, alanina em *A. florea* e treonina em *A. cerana* e *A. mellifera*. Não foram encontradas variações neste polimorfismo, embora estes sejam funcionais³⁵.

A única isoforma de melitina descrita bioquimicamente até o momento é a melitina-S. A abordagem utilizada pela autora Sciani, J. M. *et al*³⁶ em 2010 foi capaz de identificá-la, uma vez que está se revelava como novo componente majoritário do veneno. Isto permitiu seu isolamento e sequenciamento químico por degradação de Edman. Esta isoforma está presente no veneno ao longo do ano, porém em meses de inverno no hemisfério sul tem alteração em sua porcentagem indo de 1% a 10%, tornando-se um componente principal do veneno em nível similar à fosfolipase A2.

Levando em consideração que já se sabe que modificações nos transcritos primários podem originar em variações, é de grande importância estudar se há um padrão de variação nessas mutações, e se estes apresentam mudanças características sempre em mesma posição ou ordem, pois a determinação deste padrão se mostra relevante para que mais estudos sobre a melitina possam ser realizados e assim seja possível cada vez mais desenvolver meios de utilizá-la na biotecnologia ou fins farmacológicos. Além disso, ao desenvolver um método para isolar tais isoformas da melitina, estes peptídeos podem no futuro serem testados

isoladamente em modelos biológicos a fim de verificar se possuem atividade biológica intrínseca.

Por outro lado, entender melhor o quanto essas mutações interferem na toxicidade da melitina, trará possibilidades promissoras para a melhoria da soroterapia antiveneno, por meio de possíveis aprimoramentos no soro antiapílico do CEVAP.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Purificar a melitina do veneno de *A. mellifera* mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (UNESP), verificar se ocorre variação na sequência de seus aminoácidos, desenvolver um método eficiente de separação das isoformas e verificar se estas variações possuem um padrão preferencial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um método cromatográfico para obtenção das isoformas de melitina;

Desenvolver metodologia para analisar individualmente tais isoformas por espectrometria de massas;

Estabelecer se existe um padrão de variação na composição dos aminoácidos da melitina.

3. METODOLOGIA

3.1. Local de coleta

Os venenos utilizados foram provenientes de apiários situados em fazendas na cidade de Botucatu. A cidade possui uma altitude relativamente elevada, variando de 756 a 920 metros acima do nível do mar, o que influencia seu clima que é classificado como subtropical úmido, tendo sua temperatura média em torno de 22°C.³⁷ A Fazenda Experimental Lageado (Lag) com lat:-22.8412/long:-48.42850 e a Fazenda Experimental Edgárdia (Edg) com lat:-22.8004/long:-48.4009, fazem parte da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP), sendo suas atividades voltadas para ensino, pesquisa e extensão³⁸.

As coletas destes venenos foram realizadas por meio de um coletor de apitoxina, formado por uma placa de vidro com impulsos elétricos leves localizada na

entrada da colmeia. As abelhas depositando seu veneno na placa como resposta aos impulsos elétricos. A apitoxina após seca foi raspada desta superfície e armazenada em freezer. Sua solubilização e filtração foram realizadas com solução salina e filtros de 0,22µm sendo trocado a cada 5 ml para evitar a passagem de contaminantes, e após estes procedimentos a amostra foi liofilizada e armazenada em geladeira (2° a 8°C).

3.2. Análise proteômica “Shotgun” da fração da melitina

Para a análise de MS, utilizou-se as mesmas amostras da autora Sciani, J. M. *et al.*³⁶, provenientes do apiário da Fazenda Experimental Lageado/Botucatu. Estas foram dissolvidas em 10 µL de ácido fórmico (FA) 0,1% e alíquotas de 2 microlitros foram injetadas em uma coluna Acclaim PepMap™ C-18 de 15 cm x 50 µm (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) acoplada ao sistema de nanocromatografia EASY-nLC 1200 (Thermo Scientific). O conteúdo eluído foi inserido automaticamente em um espectrômetro de massa Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos em um gradiente linear de 4-40% B1 (A1: 0,1% FA; B1: 80% ACN em 0,1% FA), a 300 nL/min durante 100 min. A voltagem de ionização foi ajustada em 2,5 kV e o espectrômetro de massa foi operado no modo dependente de dados, no qual uma varredura MS completa foi adquirida na faixa m/z de 300-1.500 seguida de aquisição MS/MS usando dissociação de colisão de energia mais alta (HCD) para os dez íons mais intensos da varredura. Os espectros MS e MS/MS foram adquiridos no analisador Orbitrap com resolução de 70.000 e 17.500 (a 200 m/z), respectivamente. O tempo máximo de injeção e o alvo AGC foram definidos para 25 ms e 3,106 para MS completo e 40 ms e 105 para MS/MS. O limite mínimo de sinal para acionar o evento de fragmentação, janela de isolamento e energia de colisão normalizada (NCE) foram definidos para, respectivamente, 2.5.104 cps, 1,4 m/z e 28. A exclusão de pico dinâmico foi aplicada para evitar o mesmo m/z de ser selecionado pelos próximos 30 segundos.

3.3. Processamento de dados

Os arquivos RAW foram carregados diretamente no software Peaks Studio V7.0 (BSI, Canadá) e os dados foram processados para sequenciamento de peptídeos de novo e identificação proteômica.³⁹ Os parâmetros de sequenciamento peptídico de novo foram: erro MS e MS/MS 10 ppm e 0,01 Da; oxidação de metionina

e carbamidometilação como modificação variável e confiança local média (ALC) $\geq$ 95%.

3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Fase Reversa (CLAE/FR)

Para o isolamento das isoformas da melitina do veneno de *Apis mellifera* foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu® modelo LC-20AR, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-M20A, constituído por duas bombas LC-20AR (bombas A e B), um coletor automático modelo FRC-10A e um sistema controlador modelo CBM-20A. O controle de aquisição de dados foi feito através do software LabSolution. Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC e a água Milli-Q obtida em ultrapurificador de água Milipore®.

O cromatograma foi obtido sob fase reversa, utilizando-se uma coluna semipreparativa C-18 (20 X 250 mm) (Shimadzu®). O veneno liofilizado, na concentração de 50 mg, foi solubilizado em 1 mL Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) e injetado manualmente no sistema com o auxílio de um loop de 2 mL. A eluição das amostras foi feita através de dois solventes: (A) TFA 0,1% (v/v) e (B) TFA 0,1% (v/v) e Acetonitrila 90% (v/v) através de um gradiente não linear de 5% a 70% do tampão B por 25 minutos, após foi feita uma eluição de 10 minutos com 5% do tampão B. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min, sendo coletados 15 mL/tubo. A eluição foi monitorada na absorbância de 214nm.

Esta metodologia foi desenvolvida pela área laboratorial do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) – UNESP.

3.5 Espectrometria de massas

A caracterização das isoformas de melitina foi realizada por espectrometria de massas, em um espectrômetro ESI-IT-ToF (*Electrospray ionization - Ion trap - time of flight*) (Shimadzu Co., Japão) do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e/ou por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF/TOF, em instrumento Axima Performance (Shimadzu Co. Japão), também no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Para as análises ESI, a fração foi diluída em solvente (A) ácido fórmico / água (5: 1000) e injetada diretamente no espectrômetro, por injeção manual, em modo positivo. Foram utilizados os solventes A e (B) ácido fórmico / ACN / água (5: 900:

100), em fluxo constante de 50 μ L/minuto de 50% de B. Foram utilizadas voltagem da interface de 4,5 KV e voltagem do detector de 1,76 KV, e temperatura de 200° C.

A fragmentação (MS/MS) das moléculas presentes na fração foi induzida por colisão com gás argônio.

Análises complementares por LC-MS/MS foram realizadas em uma sistema Q-TOF Bruker, em colaboração com o Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

Para o sequenciamento de peptídeos, o íon de interesse foi selecionado e fragmentado. O espectro gerado foi analisado pelo software *Peaks*.

A faixa de detecção utilizada para aquisição de dados foi de 150 a 1.500 m/z.

4. RESULTADOS

4.1. Shotgun da fração da melitina e processamento dos dados

Utilizando uma abordagem proteômica de shotgun na ‘fração’ melitina do veneno, verificamos a presença de diferentes variantes de melitina, tanto relativas a possíveis processamentos quanto a substituições de aminoácidos.

As figuras abaixo apresentam o resumo destes resultados:

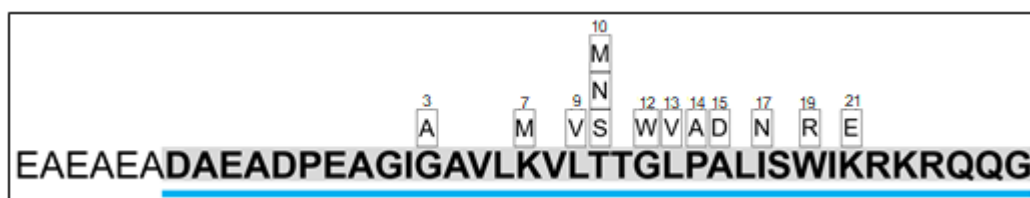


Figura 5. Isoformas de melitina detectadas por espectrometria de massas. Numeração baseada no peptídeo maduro.

Os aminoácidos sobre a sequência acima (ex A na posição 3) foram ‘validados’ pelos experimentos em espectrometria de massas. Lembrando que a Serina na posição 10 já foi identificada quimicamente em um estudo anterior pela autora Sciani, J. M. *et al*³⁶.

Novos N-terminais observados (nos espectros de Massa)

GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
 DAEADPEAGIGA....
 ADPEAGIGA...
 EAGIGA...
 AGIGA...

Novos C-terminais observados (nos espectros de Massa)

GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
 ...KRQQG
 ...KRQQ-NH2

Figura 6. Novos N e C-terminais observados nos espectros de massa.

4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Fase Reversa (CLAE/FR)

Os cromatogramas obtidos de ambos os venenos mostraram leves alterações (pequenos picos coeluidos com a melitina) entre os tempos 22.8 e 26.5, como podemos constatar nas figuras 7 e 8.

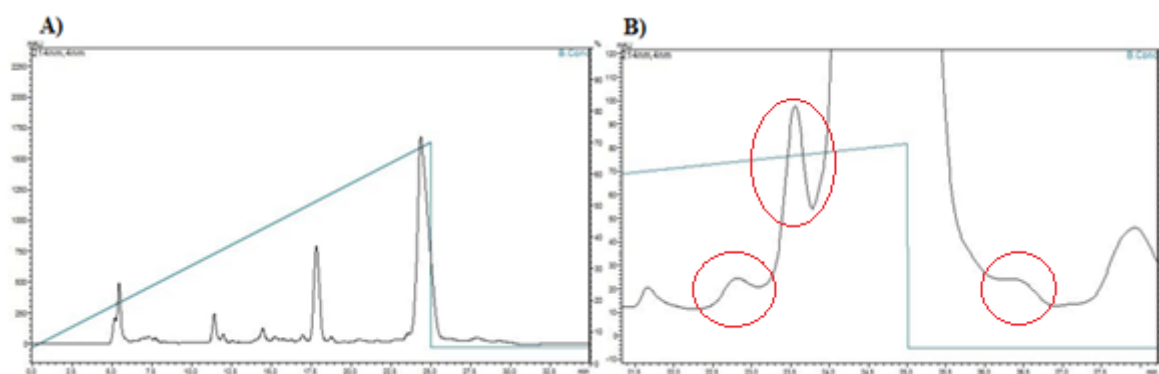


Figura 7. A) Cromatograma da apitoxina coletada na fazenda Edg. B) Cromatograma ampliado das isoformas da fazenda Edg.

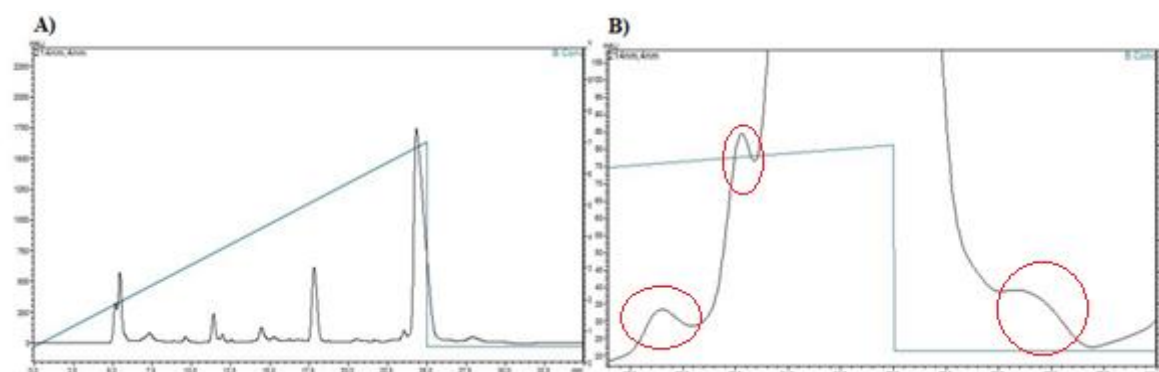


Figura 8. A) Cromatograma da apitoxina coletada na fazenda Lag. B) Cromatograma ampliado das isoformas da fazenda Lag.

Pode-se observar que a apitoxina da fazenda Lag apresentou 4 picos a mais que a fazenda Edg (Figura 9 e 10). Os picos coletados para posterior análise por

espectrometria de massas das isoformas foram 28, 29 e 31 da fazenda Lag e 24, 25 e 27 da fazenda Edg, e serão chamadas de isoformas 1, 2 e 3 futuramente.

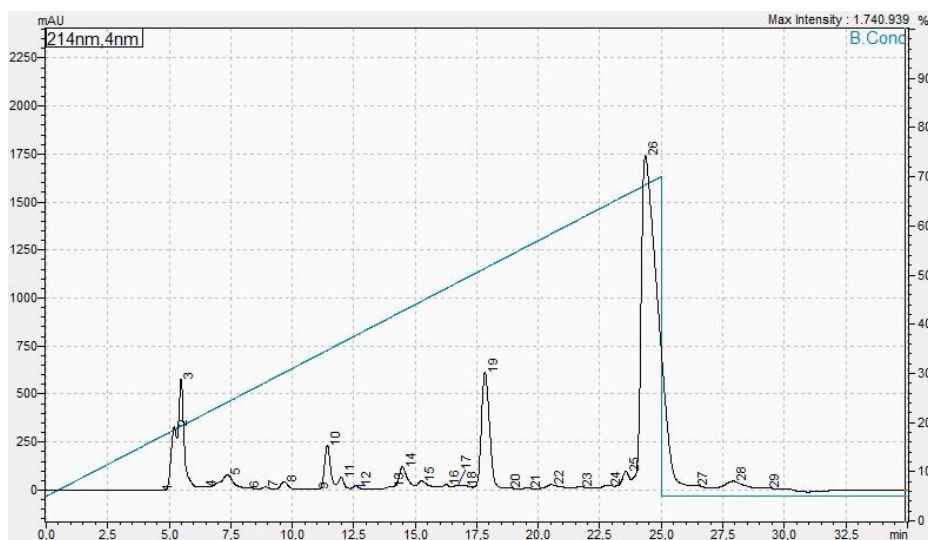


Figura 9. 29 picos identificados por cromatografia na apitoxina da fazenda Lag.

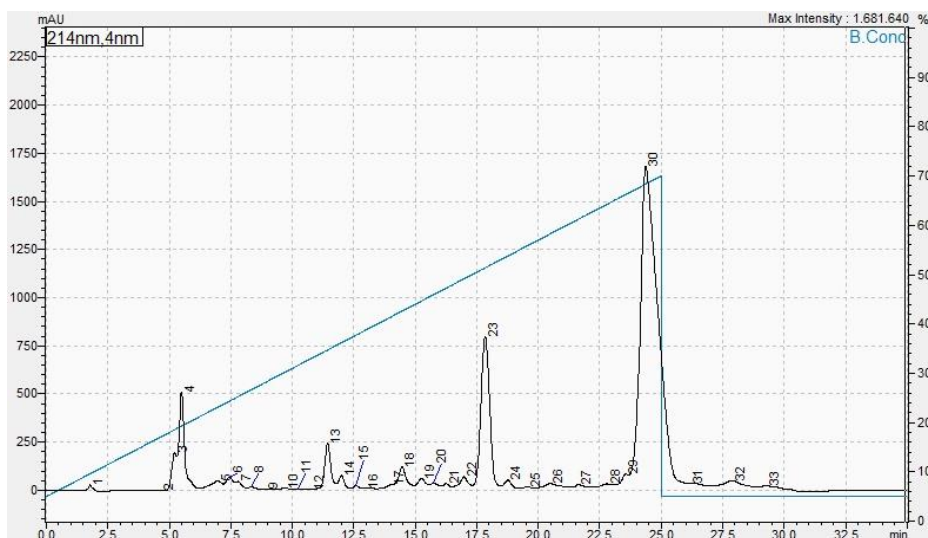


Figura 10. 33 picos identificados por cromatografia na apitoxina da fazenda Edg.

A figura 11, contendo a comparação de ambas as fazendas, mostra o comportamento de cada apitoxina durante a corrida. Na apitoxina da fazenda Lag (rosa) foi detectado em maior concentração, se comparado com os mesmos picos da fazenda Edg, o primeiro e o terceiro pico (28 e 31), já na apitoxina da fazenda Edg (preto) foi detectado o pico 2 (25). Também podemos confirmar essas informações na porcentagem da área na tabela 2.

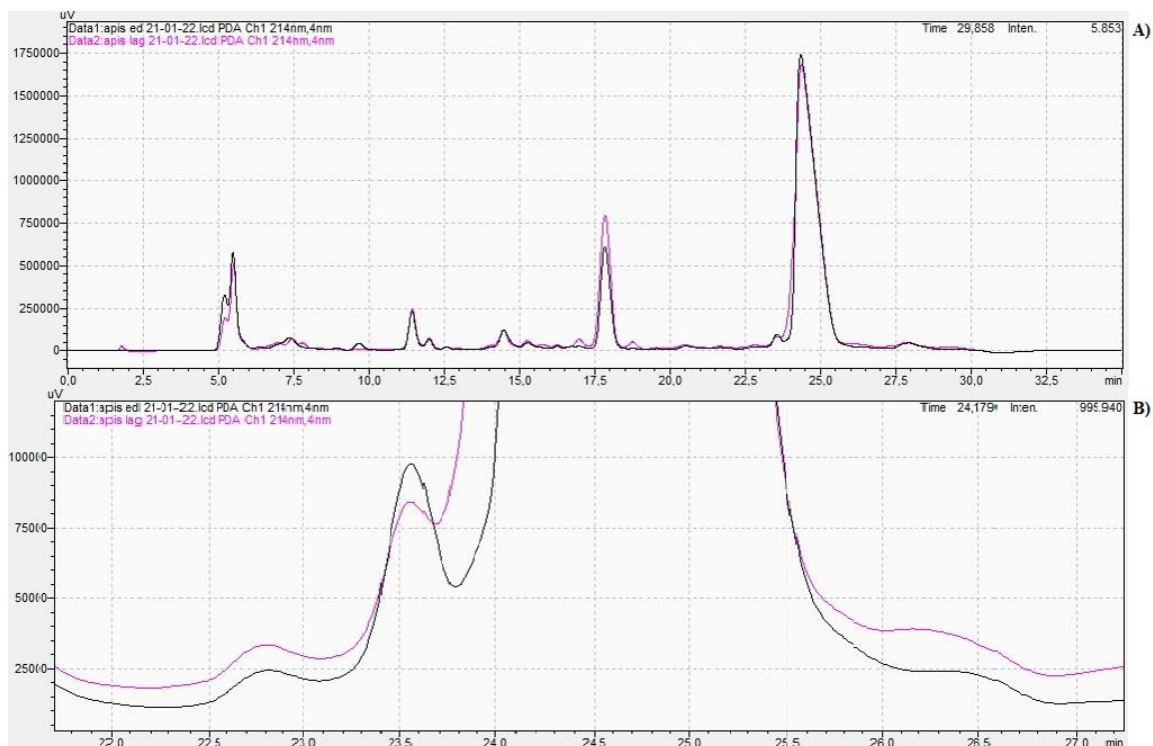


Figura 11. A) Comparação dos cromatogramas obtidos das apitoxinas de ambas as fazendas (rosa – Lag/preto – Edg). B) Comparação dos cromatogramas com enfoque nas isoformas da melitina.

As informações das duas apitoxinas contendo o tempo de retenção e a área em porcentagem de cada pico estão reunidas na tabela 3. Apesar da diferença na quantidade de picos entre as fazendas, é semelhante ao tempo de retenção quando comparamos os três que foram coletados para posterior análise.

Tabela 2. Informações do tempo de retenção e área em porcentagem dos picos coletados.

Apis Lag			Apis Edg		
Picos	Tempo de retenção	Área (%)	Picos	Tempo de retenção	Área (%)
28	22,796	1,090	24	22,808	0,940
29	23,553	1,376	25	23,555	1,759
31	26,159	0,090	27	26,357	0,046

4.3. Segunda etapa de cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Fase Reversa (CLAE/FR)

Após a cromatografia líquida os 3 picos de cada fazenda foram coletados manualmente e submetidos a nova etapa de CLAE, em condições analíticas micro

para desenvolvimento de método, e subsequente análise por espectrometria de massas (MS e MS/MS). Os resultados dos cromatogramas, apenas com detecção UV para fins de desenvolvimento de método, dessas 6 frações contendo as isoformas podem ser observados nas figuras seguintes:

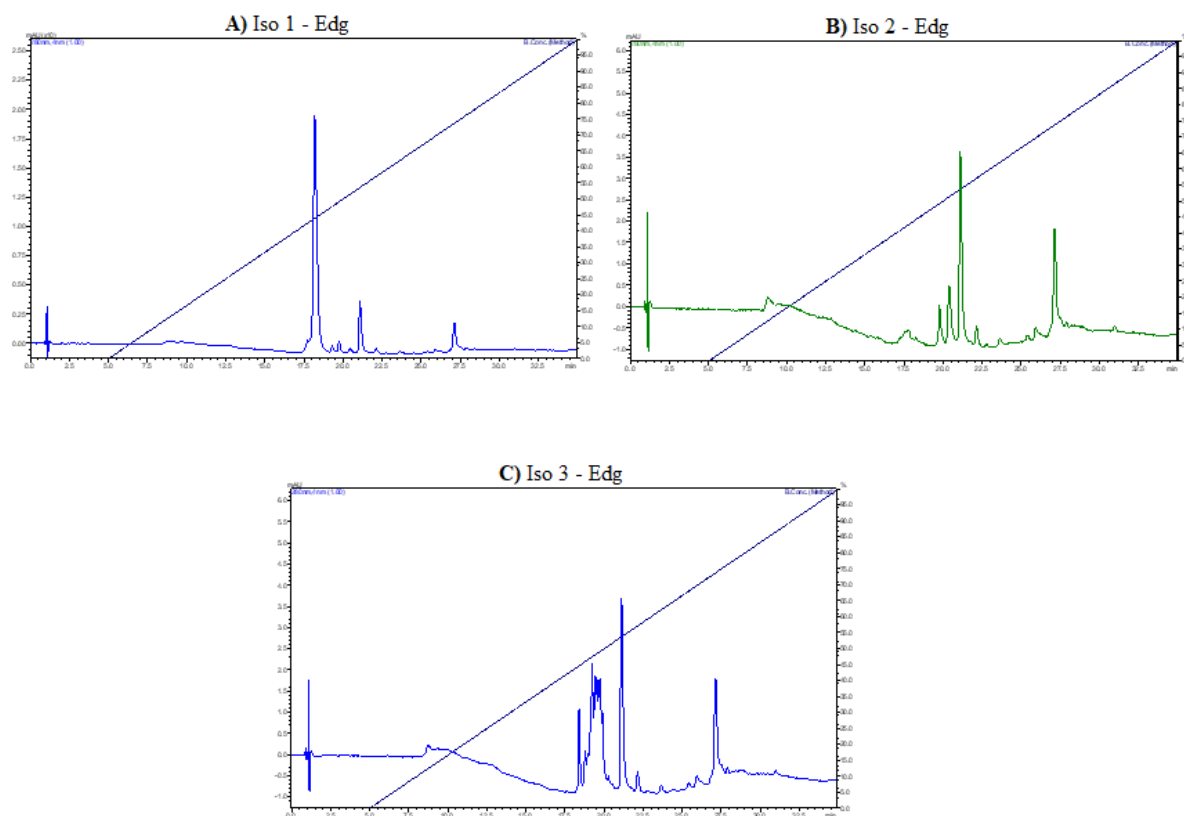


Figura 12. A) Cromatogramas em UV das isoformas da Fazenda Edgárdia. A) Isoforma 1, B) Isoforma 2 e C) Isoforma 3.

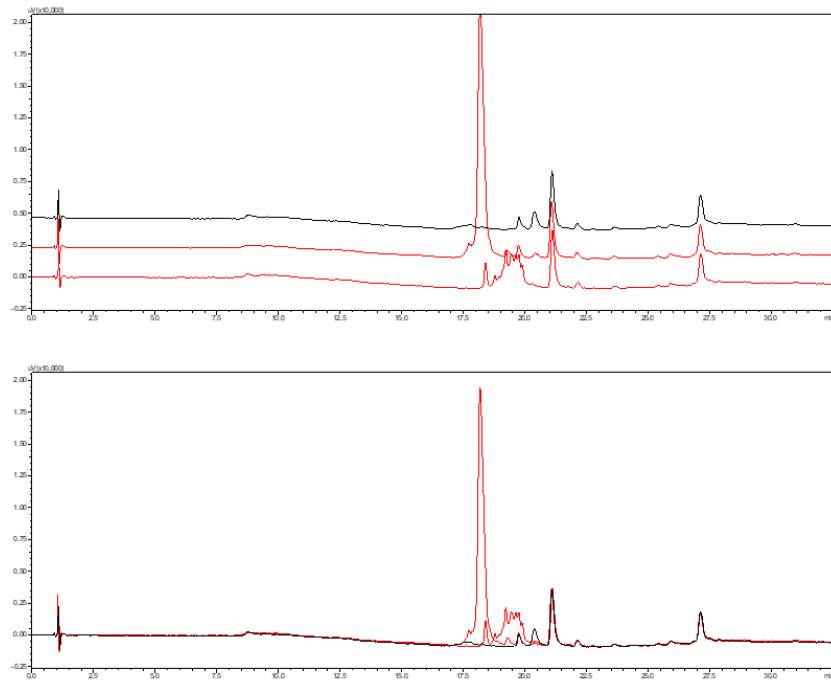


Figura 13. Sobreposição das isoformas da Fazenda Edgárdia.

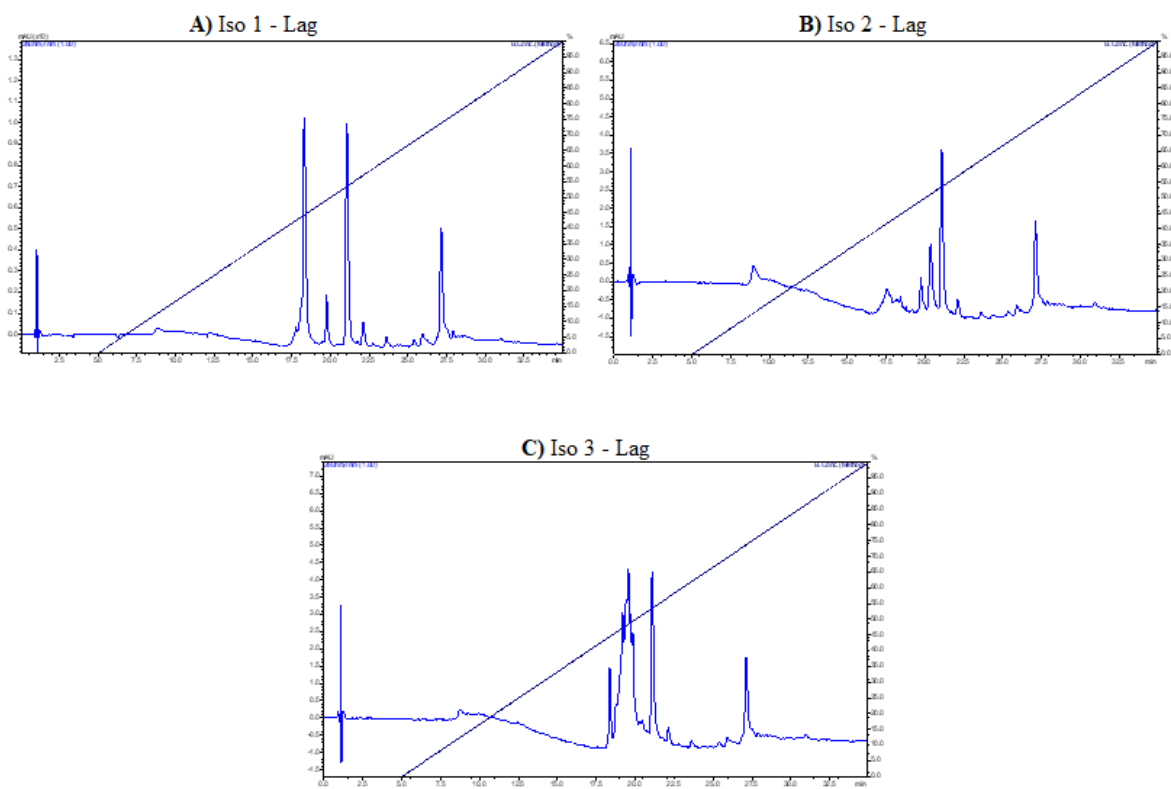


Figura 14. A) Cromatogramas em UV das isoformas da Fazenda Lageado. A) Isoforma 1, B) Isoforma 2 e C) Isoforma 3.

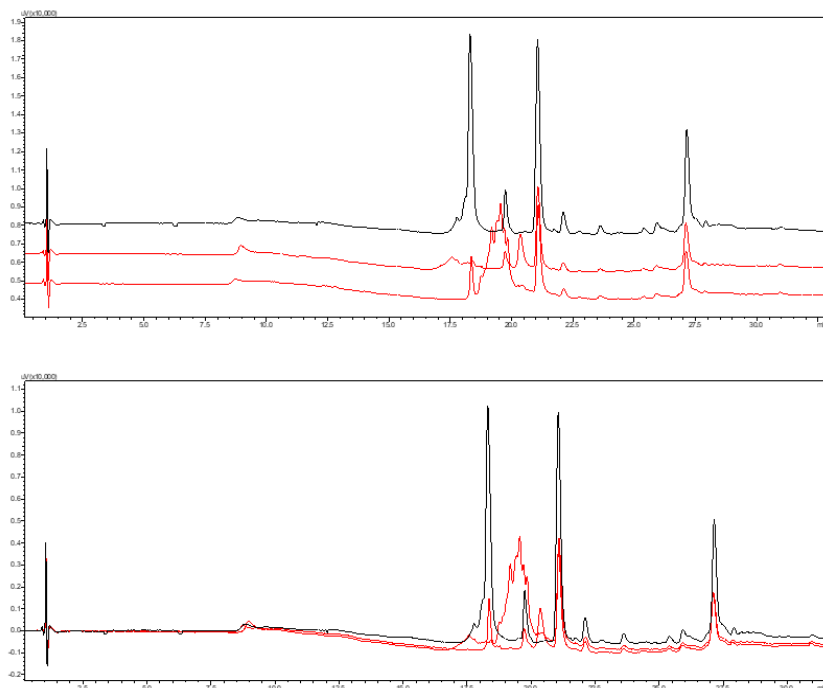


Figura 15. Sobreposição das isoformas da Fazenda Lageado.

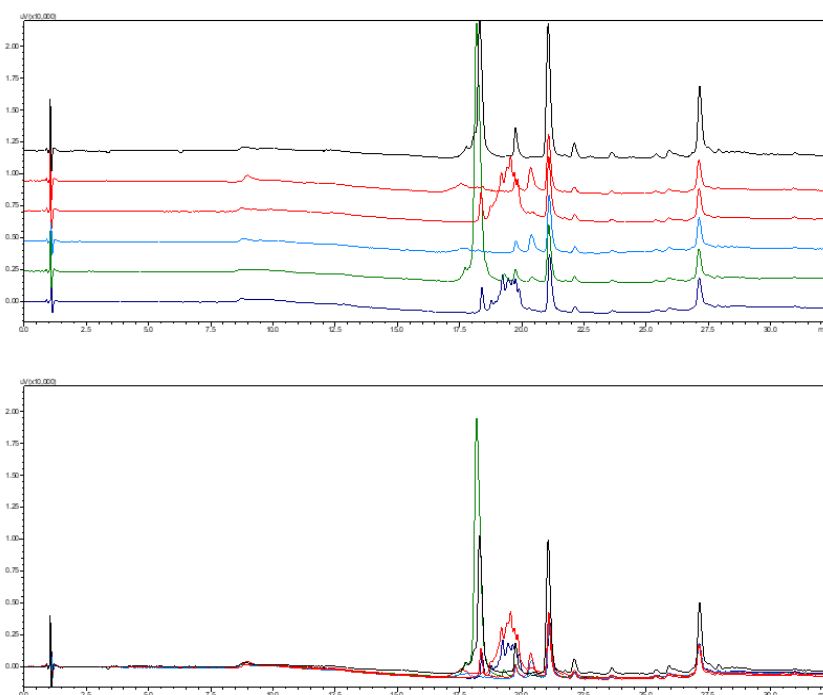


Figura 16. Sobreposição de todas as isoformas.

De acordo com a integração dos cromatogramas representados acima, foram detectados 4 picos na fração ED01, 3 picos na fração ED02, 4 picos na fração ED03, 5 picos na fração LAG01, 5 na fração LAG02, 4 na fração LAG03 e uma fração não resolvida na EDG03 e LAG03, com um total de 27 isoformas de melitina, conforme detecção por UV.

Uma vez que o desenvolvimento de método se mostrou eficiente, análises de LC-MS foram conduzidas nas mesmas condições e os íons presentes nas diferentes frações (Figura 17) foram deconvoluídos e estão apresentados na tabela abaixo.

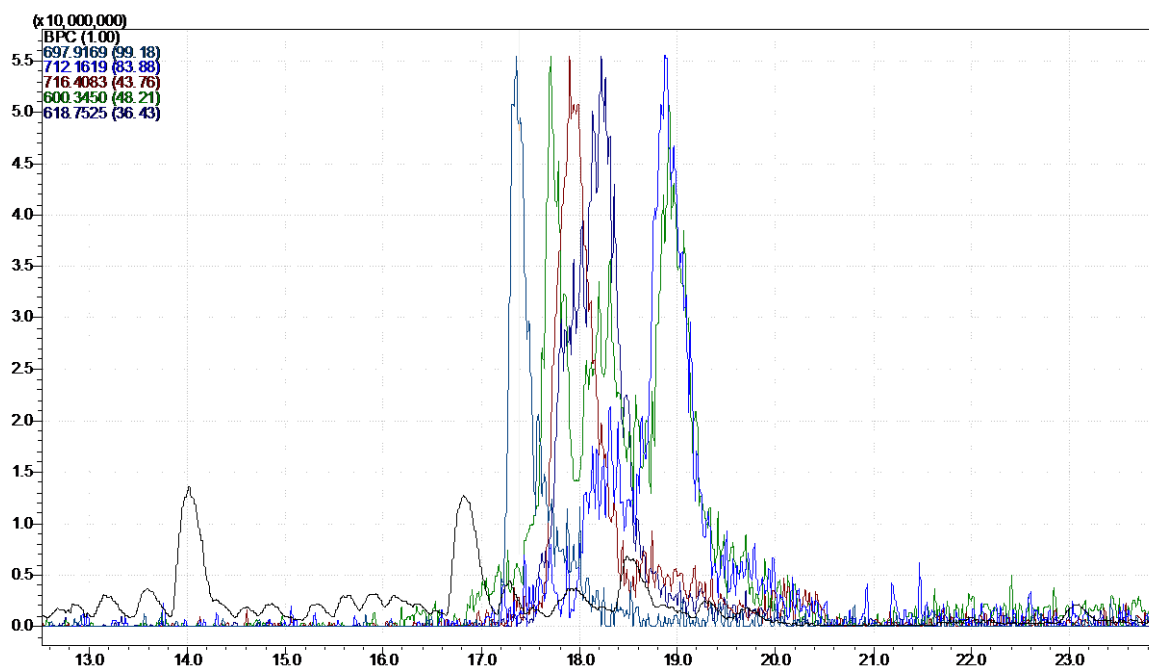


Figura 17. Detalhe da região entre 13 e 23 minutos do gradiente de separação da fração isoforma 1 da fazenda Edgárdia, mostrando o cromatograma base (BPC) e alguns cromatogramas de íons extraídos (valores de m/z no canto superior direito) utilizados na deconvolução.

Como apresentado na figura 17, o método analítico desenvolvido separou frações contendo isoformas de melitina, que puderam ser individualmente analisadas, como apresentado na figura 18.

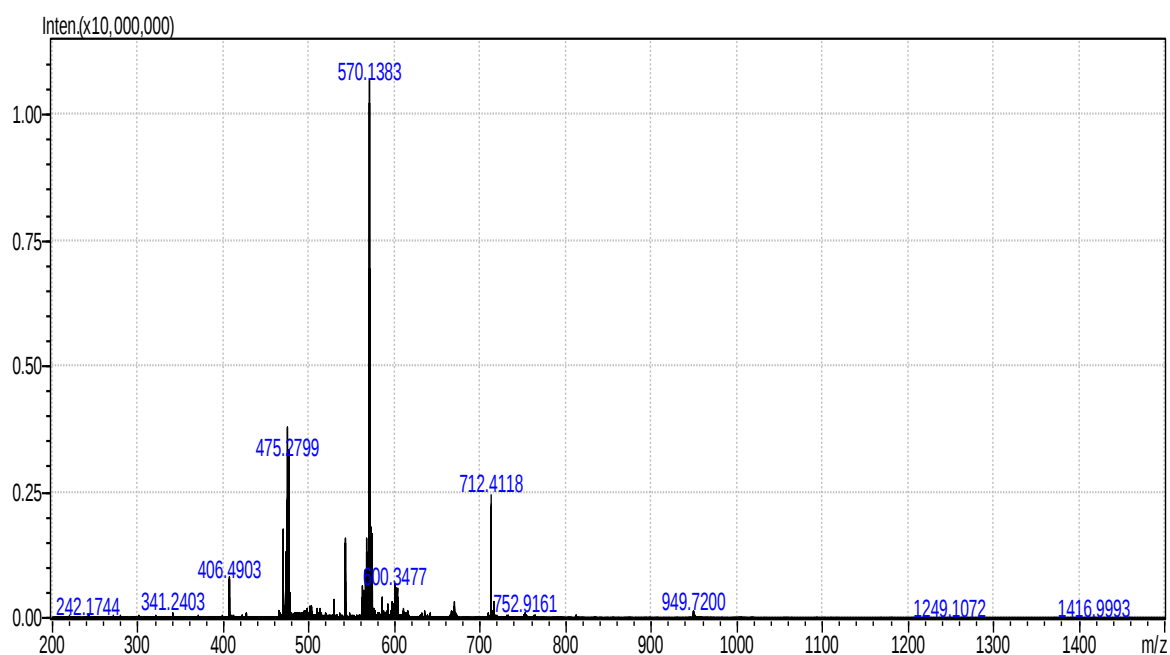


Figura 18. Integração dos cromatograma entre 18,5 e 19 min, da separação cromatográfica da fração isoforma 3 da fazenda Lageado, indicando a presença de uma isoforma predominante de melitina eluindo nesse tempo de retenção.

De acordo com a resolução do espectrômetro de massas empregado (~ 10.000), foi possível medir o estado de carga deste íon, conforme apresentado na figura 19.

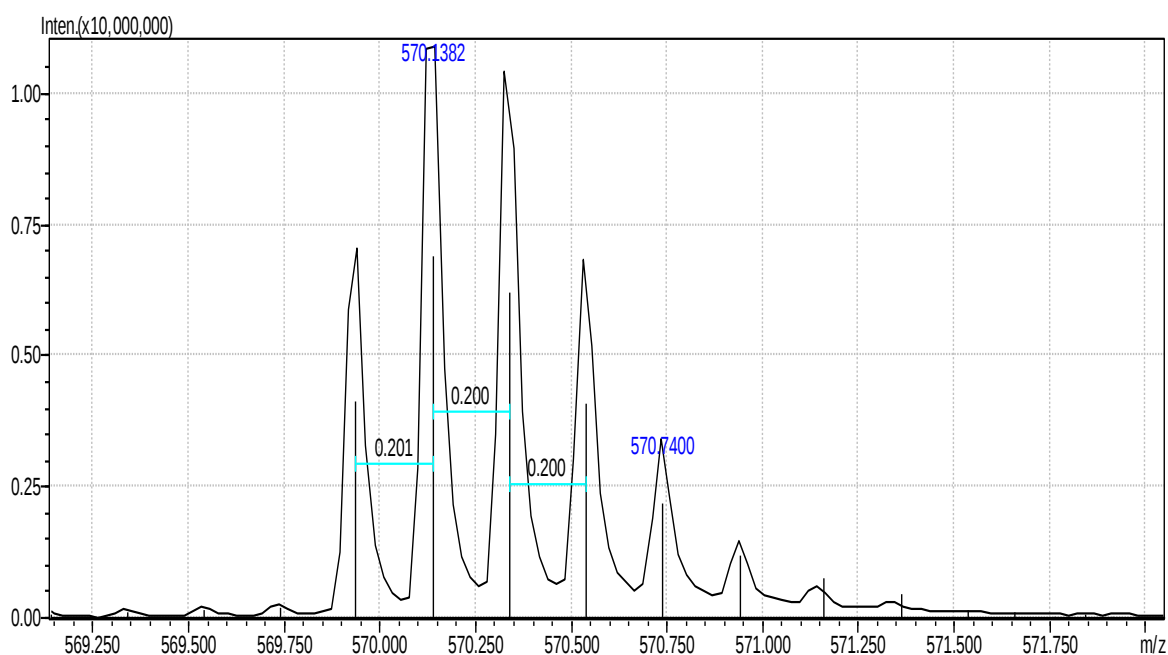
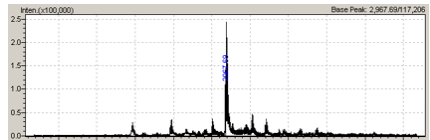
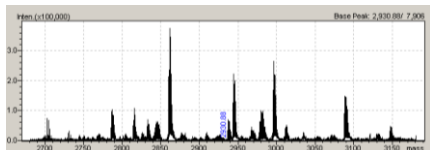
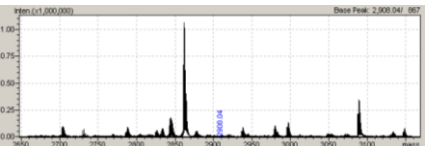
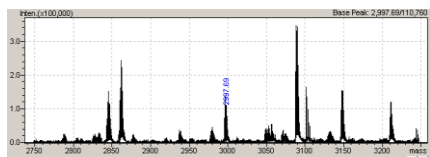
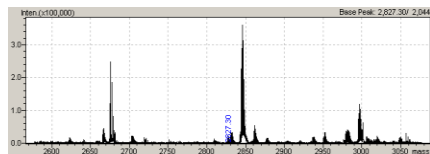
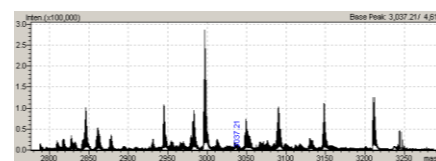


Figura 19. Determinação do estado de carga do íon 570,13. A diferença de 0,2 m/z corresponde a um íon com 5 cargas, derivado de um peptídeo de 2845,65 Da, que corresponde a própria melitina.

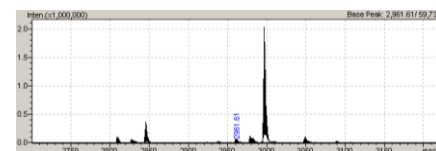
As análises apresentadas acima foram realizadas para todas as frações cromatográficas separadas conforme apresentado nas figuras 12 A, B, C e 13 A, B, C (dados não mostrados). As massas moleculares resultantes da espectrometria de massas ESI foram deconvoluídas manualmente segundo seu tempo de retenção considerando até 0,5 Da como mesma massa, e inseridas na tabela 3. Está também contém as imagens das deconvoluções gráficas automáticas.

Tabela 3. Massas moleculares presentes nas frações coletados em ambas as fazendas segundo seu tempo de retenção.

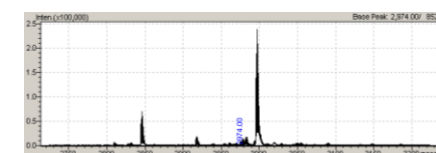
Tempo de retenção (min)	Massas Moleculares (Da) (deconvolução manual)	Espectro deconvolvido (deconvolução gráfica automática)
ED01		
17.2 – 17.5	2943.69/2814.64/2786.60/2773.92/ 2769.58	
17.5 – 17.8	2860.62/3146.73/3087.73/2995.67/ 2978.66/2943.70/2785.57/2966.93/ 2814.62	
17.8 – 18.0	2860.60/3087.72/2995.68/2978.66/ 2936.67/2842.61	
18.1 – 18.4	3087.56/2860.61/2844.61/3146.73/ 2995.67/2842.63/3069.71	
18.6 – 19.1	2845.19/2995.64/2844.61/2559.00/ 2517.38	
ED02		

17.4 – 18.22995.57/2861.61/2844.62/3209.75/
3146.73/3087.73/2943.71/3089.75/
3047.70**18.3 – 18.8**

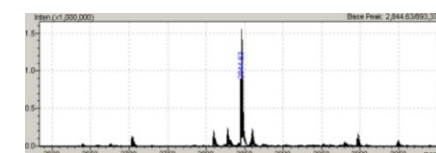
2995.56/2844.61/2997.65

**20.7 – 21.7**

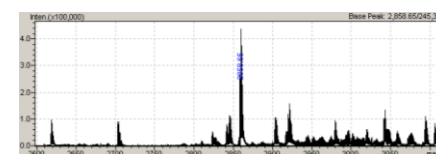
2995.67/2844.62

**ED03****18.5 – 19.1**

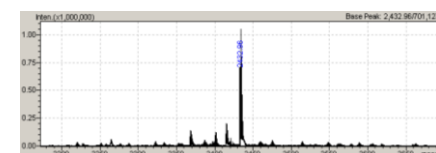
2844.61

**19.1 – 19.5**

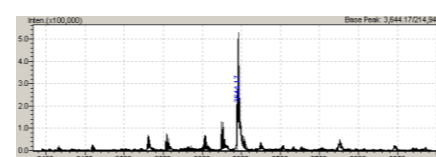
2858.63

**19.4 – 19.8**

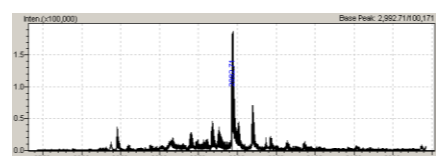
2432.89/2433.01

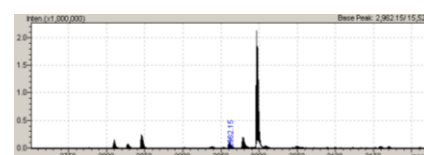
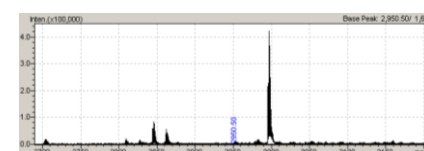
**20.0 – 20.5**

3644.35

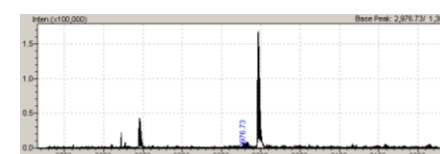
**21.0 – 21.5**

2993.19/2993.62

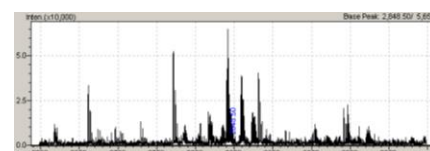
**LAG01**

18.5 – 19.12995.55/2844.62/2808.63/2997.66/
2959.65**20.0 – 20.7**2996.17/2995.68/2861.60/2844.62/
2808.62**21.7 – 22.1**

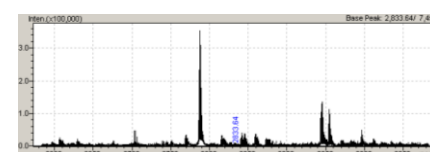
2997.15/2995.68/2844.64

**LAG02****16.7 – 17.1**

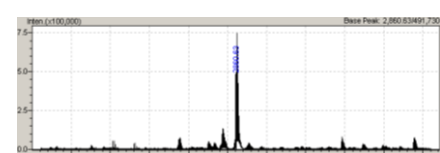
2858.60/2840.60

**17.1 – 17.6**

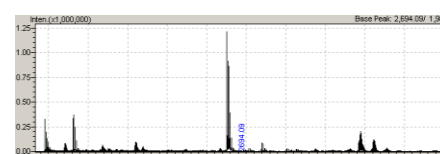
2786.36/2995.68/2953.70/2943.70

**17.6 – 18.2**

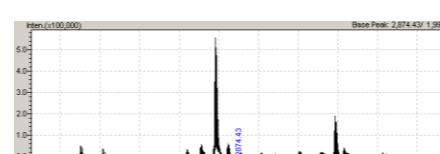
2860.61

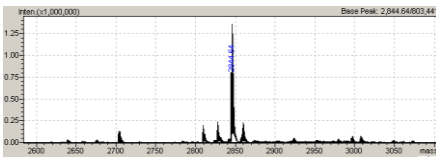
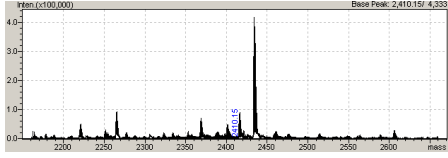
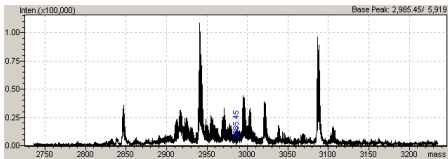
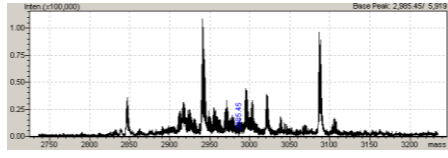
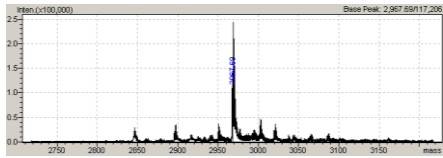
**18.3 – 18.6**

2842.61/2675.55/2559.01

**18.7 – 19.2**

2845.21/2995.65/2844.62

**LAG03**

18.5 – 19.1	2844.61	
19.3 – 19.8	2433.21/2263.86/2219.71	
20.0 – 20.6	3644.37	
20.8 – 21.3	3085.98/2939.21/2845.08/3250.26/ 2992.62/2938.61	
21.3 – 21.8	2967.89	

As massas moleculares variam entre 2219.17 a 3644.98 Da, somando um total de 56 massas, sendo 29 pertencentes a fazenda Edg, 27 a fazenda Lag e 12 presentes em ambas (Tabela 4). Esses valores são 107% maiores do que as quantidades de isoformas propostas pela análise por contagem de picos por detecção UV, conforme apresentado acima.

Tabela 4. Massas moleculares (Da) presente nas apitoxinas coletadas nas fazendas.

Fazenda Edgárdia (Da)	Fazenda Lageado (Da)	Presente em ambas
2943.69	2808.63	2995.55
2814.64	2959.65	2844.62
2773.92	2996.17	2997.66
2769.58	2953.70	2861.60
3146.73	2675.55	2858.60
3087.73	2263.86	2860.61
2978.66	2219.17	2842.61
2785.57	3644.98	2559.01
2966.93	2939.21	2845.21
2936.67	2938.61	2433.21

3069.71	3085.98	2992.62
2517.38	2840.60	2786.36
3209.75	2943.70	
3089.75	3250.26	
3047.70	2967.89	
3644.35		
2993.82		

Como a simples medição de massa molecular, mesmo que com alta resolução, como apresentado acima, não é suficiente para garantir a identidade de uma molécula, análises complementares por LC-MS/MS (com o material biológico não processado, isto é não reduzido, não alquilado e não digerido) foram realizadas em uma sistema Q-TOF Bruker, em colaboração com o Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Maria Aparecida Juliano. As condições analíticas foram as mesmas empregadas anteriormente. Os dados brutos foram convertidos para mzML e posteriormente analisados pelo software Peaks Studio 7.0, com foco inicial no processamento para sequenciamento ‘de novo’ dos peptídeos presentes na amostra. Estes resultados estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 5. Dados da fragmentação LC-MS/MS.

EDG 01			
Massa Molecular/RT	m/z : cargas	Sequência	Probabilidade (%)
2786,63 / 17.2-17.5	697,66 : 4	LGQVLQVLTTGLPALLMVGGVLVLSGPALG	60%
2860,62 / 17.5-17.8	716,17 : 4	GLGAVEKVLTTGLPACKDGVLTGLGPGLKP	74%
3146,74 / 17.5-17.8	787,70 : 4	CGAAGLGAVLQVLTTGLPALLFETLVAGLGQPP	55%
3087,77 / 17.5-17.8	772,94 : 4	GWGLQVLQVLTTGLPALLSPTLVQLVAGPF	64%
2995,72 / 17.5-17.8	749,93 : 4	HALGAVLQVLTTGLPACKLGTTLVGVAAPKPP	57%
2978,65 / 17.5-17.8	745,68 : 4	NSCGAVLKVLTTGLPALLSPSYLVAGLAGPP	78%
2785,55 / 17.5-17.8	697,41 : 4	LGQVLQVLTTGLDGADLGLGSPLVGAKPP	61%
2936,67 / 17.8-18.0	979,90 : 3	YVGAVLQVLTTGLPACKLGTTLVGALGKPP	73%
2844,66 / 18.1-18.4	712,7 : 4	AVGAVLQVLTTGLPALLCKGGGLLTGPRVA	79%

EDG 02			
Massa Molecular/RT	m/z : cargas	Sequência	Probabilidade (%)
2995,76 / 17.4-18.2	749,93 : 4	HALGAVLKVLTTGLPACKLGTTLGLGLGPPK	61%
2861,62 / 17.4-18.2	716,42 : 4	FPAVLQVLTTGLTLADLGTTHLKVKE	73%
2844,66 / 17.4-18.2	712,17 : 4	AVGAVLQVLTTGLPALLCKGGGLLMKPPK	85%
3209,81 / 17.4-18.2	803,45 : 4	NHNLGAVLQVLTTGLPALLLYTLVAVGAAGPP	54%
3087,71 / 17.4-18.2	772,94 : 4	QDGLQVLQVLTTGLPALLSSASKSVVGGVGPP	55%
2943,70 / 17.4-18.2	736,94 : 4	VAGAVLVQVLTTGLPCKALGMALVGVLLTH	75%

3047,71 / 17.4-18.2	1016,92 : 3	RAALMGNKVLTTLGLVPVCNGTTLVKLGHGK	64%
---------------------	-------------	---------------------------------	-----

EDG 03

Massa Molecular/RT	m/z : cargas	Sequência	Probabilidade (%)
2844,66 / 18.5-19.1	712,16 : 4	GLGAVLQVLTTLGLPALLCKGGGLLGTPRVA	76%
2858,66 / 19.1-19.5	715,67 : 4	VAGALLQVLTTLGLPALLCNGKLLGTPGVVA	71%
2433,44 / 19.4-19.8	812,14 : 3	LGGAVLQVLTTLGLPALLSWLKRQ	91%
2993,68 / 21.0-21.5	998,89 : 3	CCLGAVLKVLTTLGLNALLTTLVQLVAHVM	62%

LAG 01

Massa Molecular/RT	m/z : cargas	Sequência	Probabilidade (%)
2995,72 / 18.5-19.1	749,73 : 4	VAGAALGHLVLTTLGLCKAPLGTTLVAGVAPPK	55%
2844,66 / 18.5-19.1	712,16 : 4	VAGAVLQVLTTLGLPALLCKGGGLLGTPRVA	77%
2861,62 / 20.0-20.7	716,41 : 4	FPAVLQVLTTLGLTLADLGTTHLKVLSP	76%

LAG 01

Massa Molecular/RT	m/z : cargas	Sequência	Probabilidade (%)
2995,65 / 17.1-17.6	749,92 : 4	PSHGAVLQVLTTLGLPACKLGTTLVGVLGFF	57%
2943,67 / 17.1-17.6	736,92 : 4	VAGAVLVAGVLTTLGLAPSGSLSTALVAAKHAA	59%
2786,56 / 17.1-17.6	929,86 : 3	HSDLKVLTTGLPALLLCTTLVSVAPAGP	56%
2860,53 / 17.6-18.2	954,53 : 3	GLGAVEKVPTTWPALNASTTEVKPVAGAP	75%
2844,65 / 18.3-18.6	712,16 : 4	VAGAVLQVLTTLGLPALLCKGGGLLGTPPKT	79%

LAG 03

Massa Molecular/RT	m/z : cargas	Sequência	Probabilidade (%)
2844,66 / 18.5-19.1	712,16 : 4	AVGAVLQVLTTLGLPALLCKGGGLLSAPRVA	79%
2433,42 / 19.3-19.8	812,14 : 3	VAGAVLQVLTTLGLPALLSFELKPP	95%
2992,63 / 20.8-21.3	749,17 : 4	M(+15.99)NGGAVLQVLTTLGLPALLSGSGGGLLGA TP	55%
2938,57 / 20.8-21.3	735,66 : 4	YTGAVLQVLTTLGLPAHMGTCVLTLPRL	74%
2938,64 / 20.8-21.3	950,55 : 3	TYGAVLQVLTTLGLPALLM(+15.99)TELVAVGAPPK	72%

Mesmo que a análise estatística demonstre que haja boa qualidade espectral (Figura 20), com baixa dispersão de erro de medição de massa tanto pelo número de espectros atribuídos – PSM - (Figura 21) quanto pela faixa de massa do íon precursor selecionado (Figura 22), podemos ver que a análise automática não foi capaz de produzir sequências similares a melitina e nem valores globais de confiança elevados (tabela acima).

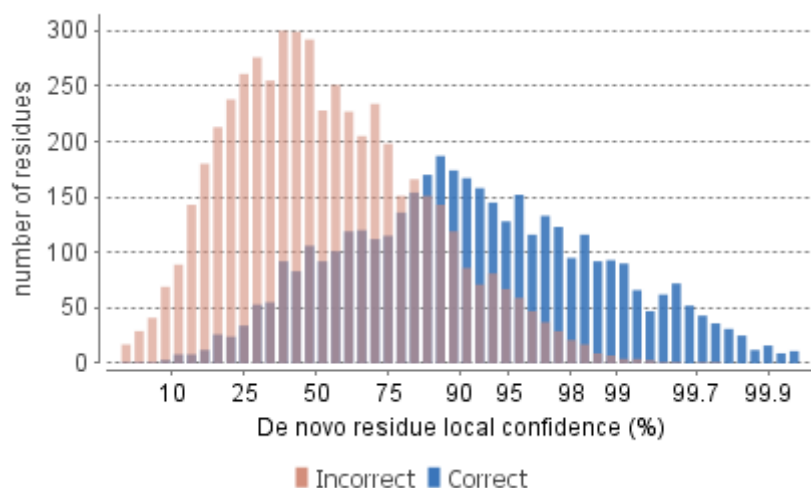


Figura 20. Distribuição da confiança estatística (ALC) para o sequenciamento de novo baseado nos dados reais (azul) versus estimativas errôneas (rosa), de acordo com o software Peaks Studio 7.

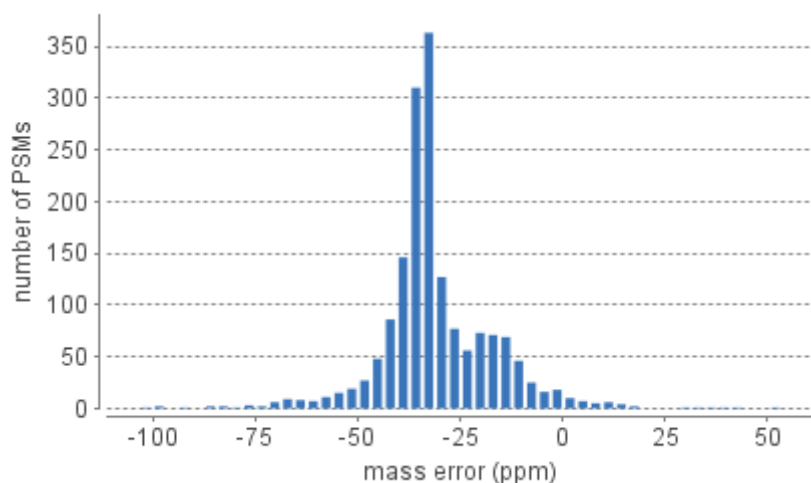


Figura 21. Dispersão do erro de massa em função do número de espectros medidos

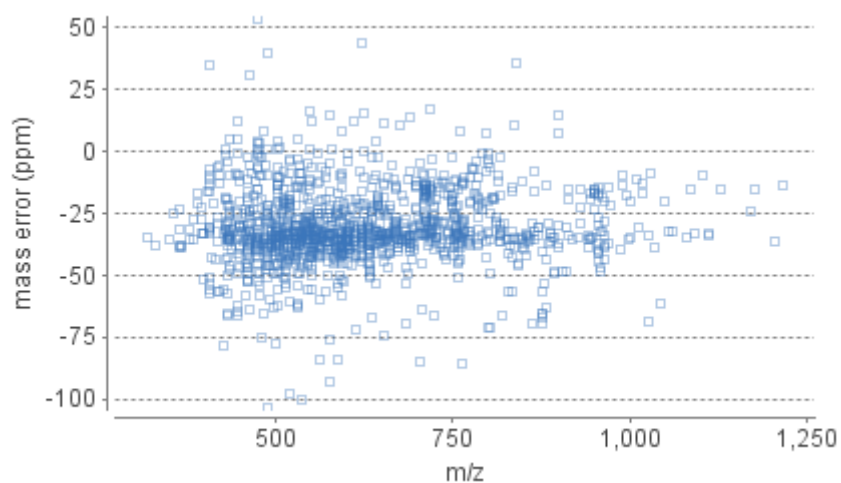


Figura 22. Distribuição do erro de medição de massa em função do valor de m/z do íon precursor selecionado.

Portanto, a fim de direcionar melhor as análises dos vastos conjuntos de dados em função do tempo disponível, optamos por reanalisar os dados pela abordagem proteômica em um banco de dados obtido para o gênero *Apis* a partir do servidor UniProt, em novembro de 2022. Optamos também pela análise com o algoritmo SPIDER do Peaks que propõe não apenas modificações pós-traducionais mas também substituições de aminoácidos. No entanto, apresentaremos apenas os resultados para as substituições de aminoácidos, já que a validação de modificações pós-traducionais exigiria uma série de experimentos complementares.

As sequências propostas por proteômica foram analisadas e limitadas a 12 soluções para cada íon. Estes dados estão apresentados na tabela 6. As sequências desta em negrito apresentam substituições validadas pelo software, de acordo com os parâmetros de análise padrão empregados.

Tabela 6. Sequenciamento peptídico das frações (Peaks).

Sequência proposta por proteômica Algoritmo SPIDER do Peaks Studio	Massa molecular calculada (Da)
EDG01	
APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	4495.4073
APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTNLPALISWIKRKRQQG	4552.4288
APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	4495.4073
APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLYALISWIKRKRQQG	4561.4179
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3644.0412*
AEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	3586.0357
EADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3457.9772
ADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3328.9346
<u>SD</u> PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKHQQ	3343.8437*
DPEAGIGAVLKVLTTGLPALIS	2134.2248
DPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3257.8975
PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3142.8705
EDG02	
EPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	4327.3174
EPEAEADAEADPEFGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	4403.3487
EPEAEADAEADPEAGIGANLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	4342.2920
EPEAEADAEADPEAGIGAALKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	4299.2861
EPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGYPALISWIKRKRQQG	4313.3018
ADAEADPEAYIGAVLKVLTTGYPALISWIKRKHQQ	3806.0188
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3644.0412*
PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3142.8705
PHMGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKHQQ	3209.8045*
PEAGIGAVLRVLTGLPALISWIKRKHQQ	3169.7909
PEAGIGAVLKVLTTGLPALIS	2019.1979
PEAGIGAVLKVLTTGLPALISW	2205.2772
EDG03	
MVVYISYIYAPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	6318.2924

MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQG	6345.3033
MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLSTGLPALISWI KRKRQQG	6304.2768
MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGALLKVLTTGLPALISWI KRKRQQG	6332.3081
MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQG	6344.3081
MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADTEAGIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQG	6322.2874
MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEEDPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQG	6376.2979
MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEDGIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQG	6362.2823
EPEPAPEPEAEADAPADPEAGIGAVLKVLTTGLPALMSWIKRKHQQG	4914.5224
EPEPAPEPEAEADAEADPEAGFGAVLKVLTTGLPALISWMKRKRQQG	4999.5388
APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPAL	3114.5971
EPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQG	4326.2317
LAG01	
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	3701.0627
DAEADPEAGIGAVLKVLVTGLPALISWIKRKRQQG	3699.0834
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGVPALISWIKRKRQQG	3687.0470
DAEADPEAGIGAVLKVLTAGLPALISWIKRKRQQG	3671.0521
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLYALISWIKRKRQQG	3767.0733
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLAALISWIKRKRQQG	3675.0470
DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3644.0412*
AEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	3529.0143
EADPEAGIGAVLRVLTGTPALVNWVKRKRQQ	3484.9629
ADPEAGIGSVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ	3343.8437
CDPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ	3359.8209
DPEWGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ	3371.8539
LAG02	
YAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	5349.7883
YAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGSPALISWIKRKRQQ	5323.7363
G	
AEADPHAGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKHQRQQ	3535.9448
EADPECGIGEVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ	3546.8690
EADPEAGIGAVHKVLTTGLPALISWMKRKHQQ	3480.8662
MDPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQG	3444.8736
PEAGIGAVLKVLTTGLP	1634.9606
PETGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ	3171.7953
PESGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ	3157.7797
PENGIGAVLEVLTGTPALISWMKRKHQQ	3185.7382
PENGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKHQRQQ	3184.7906
EAGCGAVLKVLTTGLPALISWMKHQRQQ	3034.6571
LAG03	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	5462.8724
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADTEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5466.8673
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPESGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5478.8673
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAYIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5568.9142
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGALLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5476.8880
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVMKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5480.8288
G	

IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5462.8724
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLTALISWIKRKRQQ	5466.8673
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5506.8622
G	
IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAALKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	5434.8411
G	
EPEPAPEPEAEADAEADPMAGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ	4891.4887
AEADAEADPEVGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ	3942.1036

As 72 sequências obtidas (12 por fração) foram então compiladas num arquivo FASTA e submetidas a um alinhamento múltiplo pelo algoritmo ClustalW, conforme apresentado na figura 23.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

018      -----ADAEADPEAYIGAVLKVLTTGVPALISWMKRKHQQ-      35
060      -----EAGCGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      28
058      -----PENGIGAVLEVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      29
021      -----PHMGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      29
052      -----EADPECGIGEVVKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ-      32
059      -----PENGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ-      29
051      -----AEADPHAGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ-      33
047      -----EADPEAGIGAVLRVLTGGLPALVNWVKKRKHQQ-      32
027      MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLSTGLPALISWIKRKRQQG      59
039      -----DAEADPEAGIGAVLKVLSTGLPALISWIKRKRQQG      35
038      -----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      35
072      -----EPEPAPEPEAEADAEADPMAGIGAVLKVLTTGLPAMISWIKRKHQQ-      46
053      -----EADPEAGIGAVHKVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      32
048      -----ADPEAGIGSVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      31
022      -----PEAGIGAVLRVLTGGLPALISWMKRKHQQ-      29
057      -----PESGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      29
056      -----PETGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKHQQ-      29
034      -----EPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWMKRKRQQG      47
030      MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADTEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      59
062      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADTEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      52
044      -----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLAALISWIKRKRQQG      35
042      -----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGAPALISWIKRKRQQG      35
041      -----DAEADPEAGIGAVLKVLTTAGPALISWIKRKRQQG      35
017      -----EPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGVPALISWIKRKRQQG      41
040      -----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGVPALISWIKRKRQQG      35
004      -----APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLYALISWIKRKRQQG      43
043      -----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLYALISWIKRKRQQG      35
016      -----EPEAEADAEADPEAGIGAALKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      41
071      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAALKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      52
028      MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGALLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      59
066      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGALLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      52
015      -----EPEAEADAEADPEAGIGANLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      41
014      -----EPEAEADAEADPEFGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      41
002      -----APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTNLPALISWIKRKRQQG      43
050      -----YAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGSPALISWIKRKRQQG      51
069      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLTALISWIKRKRQQG      52
067      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVMKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      52
065      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAYIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      52
064      -----IYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      52
032      MVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEDGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG      59

```

070	-----IYAAPEPEPEPEPEAEADAEADPEDGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	52
029	MVYIISYIYAAPEPEPEPEAEADAEADPEPGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	59
026	MVYIISYIYAAPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	59
063	-----IYAAPEPEPSPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	52
054	-----MDPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	32
036	-----EPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	41
035	-----APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	32
033	-----EPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	47
031	MVYIISYIYAAPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	59
024	-----PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	22
020	-----PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	29
012	-----PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	29
009	-----SDPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	31
006	-----AEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	34
001	-----APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	43
003	-----APEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	43
005	-----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	34
007	-----EADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	32
008	-----ADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	31
010	-----DPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	22
011	-----DPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	30
013	-----EPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	41
019	-----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	34
023	-----PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	21
025	MVYIISYIYAAPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	59
037	-----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	35
045	-----DAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	34
046	-----AEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	33
049	-----YAAPEPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	51
055	-----PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	17
061	-----IYAAPEPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	52
068	-----IYAAPEPEPEPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG	52

* . ** .

Figura 23. Alinhamento múltiplo das 72 variantes de melitina identificadas pelo algoritmo SPIDER do Peaks Studio 7, numeradas sequencialmente de conforme apresentado na tabela 6.

Uma análise um pouco mais detalhada deste alinhamento, conforme realizada pelo MView 1.6 ilustra que há diferentes graus de consenso nas conservações dos aminoácidos (figura 24).

Reference sequence (1): 018

Identities normalised by aligned length.

Colored by: identity

		cov	pid	1 [. :] 59
1 018	100.0%	100.0%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGVPALISWKRKHQQ	
2 060	80.0%	82.1%	-----EAGIGAVLKVLTGVPALISWKRKHQQ	
3 058	82.9%	86.2%	-----FENGIGAVLEVLTTGLPALISWKRKHQQ	
4 021	82.9%	86.2%	-----PHMGIGAVLKVLTGVPALISWKRKHQQ	
5 052	91.4%	81.2%	-----EADPECGIGELVKVLTGLPALISWKRKHQQ	
6 059	82.9%	75.9%	-----FENGIGAVLKVLTGVPALISWKRKHQQ	
7 051	94.3%	78.8%	-----AE DPHAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
8 047	91.4%	78.1%	-----EADPEAGIGAVLRVLTGLPALISWKRKHQQ	
9 027	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
10 039	97.1%	82.9%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
11 038	97.1%	82.9%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
12 072	100.0%	65.2%	-----EPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
13 053	91.4%	90.6%	-----EADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
14 048	88.6%	90.3%	-----ADPEAGIGSVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
15 022	82.9%	82.8%	-----PEAGIGAVLRVLTGLPALISWKRKHQQ	
16 057	82.9%	89.7%	-----PESGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
17 056	82.9%	89.7%	-----PETGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
18 034	100.0%	66.0%	-----EPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
19 030	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
20 062	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
21 044	97.1%	82.9%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLAALISWKRKHQQ	
22 042	97.1%	85.7%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGAPALISWKRKHQQ	
23 041	97.1%	82.9%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGAPALISWKRKHQQ	
24 017	100.0%	78.0%	-----EPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGVPALISWKRKHQQ	
25 040	97.1%	88.6%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGVPALISWKRKHQQ	
26 004	100.0%	69.8%	-----APEPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLYALISWKRKHQQ	
27 043	97.1%	82.9%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLYALISWKRKHQQ	
28 016	100.0%	73.2%	-----EPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
29 071	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
30 028	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
31 066	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
32 015	100.0%	73.2%	-----EPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
33 014	100.0%	73.2%	-----EPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
34 002	100.0%	69.8%	-----APEPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
35 050	100.0%	60.8%	-----YAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGSPALISWKRKHQQ	
36 069	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLTALISWKRKHQQ	
37 067	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
38 065	100.0%	61.5%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
39 064	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
40 032	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
41 070	100.0%	57.7%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
42 029	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
43 026	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
44 063	100.0%	59.6%	-----IYAAPEPEPSPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
45 054	88.6%	87.5%	-----MDPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
46 036	100.0%	75.6%	-----EPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
47 035	71.4%	71.9%	-----APEPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
48 033	100.0%	63.8%	-----EPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
49 031	100.0%	50.8%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
50 024	62.9%	90.9%	-----PEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
51 020	82.9%	86.2%	-----PEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
52 012	82.9%	86.2%	-----PEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
53 009	88.6%	90.3%	-----SDPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
54 006	94.3%	85.3%	-----AE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
55 001	100.0%	72.1%	-----APEPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
56 003	100.0%	72.1%	-----APEPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
57 005	97.1%	88.2%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
58 007	91.4%	87.5%	-----EADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
59 008	88.6%	87.1%	-----ADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
60 010	62.9%	90.9%	-----DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
61 011	85.7%	86.7%	-----DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
62 013	100.0%	75.6%	-----EPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
63 019	97.1%	88.2%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
64 023	60.0%	90.5%	-----PEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
65 025	100.0%	52.5%	MVVYISYIYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
66 037	97.1%	85.7%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
67 045	97.1%	88.2%	-----DAE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
68 046	94.3%	87.9%	-----AE DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
69 049	100.0%	60.8%	-----YAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
70 055	48.6%	88.2%	-----PEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
71 061	100.0%	59.6%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
72 068	100.0%	59.6%	-----IYAAPEPEPAPEAEAEADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
consensus/100%			hHgt.hcVlsts	
consensus/90%			-----PEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
consensus/80%			-----DPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	
consensus/70%			-----EADPEAGIGAVLKVLTGLPALISWKRKHQQ	

Figura 24. Análise do alinhamento múltiplo das 72 variantes de melitina realizada pelo MView 1.6.

Esta figura evidencia, em branco, os aminoácidos substituídos em relação ao consenso, em verde. Com base nos alinhamentos acima, e não levando em conta as variações no processamento N e C-terminais, temos a seguinte proposta para o padrão de substituição de aminoácidos para a melitina, na qual os espaços deixados em branco correspondem aos pontos preferenciais de substituição de aminoácidos.

G I G _ V L _ V L _ T G _ P A L I S W _ K _ K _ Q Q

De maneira interessante, esse resultado corrobora o resultado preliminar, obtido por meio de uma abordagem ‘shotgun’ e apresentado na figura 5, acima, aqui reproduzida de maneira modificada:



Figura 5 reproduzida de maneira modificada.

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo constatou a presença de inúmeras isoformas de melitina em ambas apitoxinas, por meio da análise proteômica “shotgun” da fração melitina. Podemos ressaltar como ponto positivo que utilizando um Orbitrap temos muitos espectros e, portanto, muitos resultados indicativos da presença de isoformas. Lembrando que por espectrometria de massas detecta-se aquilo que efetivamente existe no veneno, em nível de proteína, e não genes transcritos ou mesmo RNAm. Já como ponto negativo, temos a não separação das isoformas cromatograficamente, por este motivo não é possível estimar a real quantidade de isoformas presentes de fato no veneno e nem sua concentração relativa (determinada pela área/altura do pico em detecção UV), pois em função da elevada sensibilidade do espectrômetro de massa orbitrap mesmo isoformas em baixa concentração são detectadas.

Para comprovar a existência dessas isoformas identificadas, seguimos para CLAE/FR, onde constatamos a presença de 3 picos coeluídos com a melitina em cada fazenda (ED 1, 2 e 3/LAG 1, 2 e 3). Estes picos foram coletados, e em uma nova análise foram detectados 4 picos na fração ED01, 3 picos na fração ED02, 4 picos na fração ED03, 5 picos na fração LAG01, 5 na fração LAG02, 4 na fração LAG03 e uma fração não resolvida na ED03 e LAG03, com um total de aparentes 27 isoformas de melitina, conforme detecção por UV.

Nas análises de LC-MS, podemos observar que a figura 19 apresentou um peptídeo derivado da melitina, mostrando que os métodos utilizados foram eficientes para a separação das isoformas. A deconvolução manual apresentou massas moleculares variando entre 2219.17 a 3644.98 Da, constatando a existência de 56 massas. Comparando os resultados dos dois métodos utilizados, onde 27 isoformas foram identificadas por detecção UV e 56 pela LC-MS, podemos observar que o segundo método teve valores 107% maiores do que o primeiro.

Devido a insuficiência do método anterior, foi necessária a análise complementar de LC-MS/MS que mostrou como ponto positivo uma boa qualidade espectral e baixa dispersão de erro de medição de massa; porém, como ponto negativo este método foi incapaz de produzir sequências similares a melitina e 89% dos seus valores de confiança foram inferiores a 80%, mostrando baixa confiabilidade.

Os seguintes passos, que foram reanalisar os dados seguindo uma abordagem proteômica em banco de dados do gênero *Apis* obtido do servidor UniProt, e análise com o algoritmo SPIDER do Peaks, apresentaram os novos N-terminais e C-terminais observados nos espectros de massas do “shotgun”, apontando a correlação entre esses dois métodos. Outra correlação entre eles foram os resultados dos alinhamentos das 72 sequências peptídicas obtidas do Peaks, que sugeriu como proposta para o padrão de substituição de aminoácidos para a melitina a alanina (A) na posição 4, a lisina (K) na posição 7, a treonina (T) na posição 10, a leucina (L) na posição 13, a isoleucina (I) na posição 20 e a arginina (R) nas posições 22 e 24. As substituições de K, T e L também são confirmados nos resultados do “shotgun”.

Autores como Sciani, J. M. *et al.*³⁶ e Park, D. *et al.*³⁵ já haviam identificado a presença de isoformas na melitina. Sciani conseguiram separar cromatograficamente a isoforma, sequenciar e realizar ensaios biológicos. Seu estudo foi capaz de detectar diferenças significativas no ensaio biológico e atribui essas diferenças a uma estrutura

3D avaliada por dicroísmo circular. Já Park, D. *et al.*³⁵ detectou as isoforma em nível de nucleotídeos no gene de melitina, tanto em *A. mellifera* como em *A. cerana*, e sintetizou estes peptídeos (Melitina-N e Melitina-S). A região codificadora continha nove polimorfismos, um dos quais causou uma substituição de serina (Ser) por asparagina (Asp), a Melitina-N, que pode afetar as atividades biológicas da melitina. O outro peptideo sintetizado (Melitina-S) mostrou ter mais efeito citotóxico contra *E.coli* do que a Melitina-N.

A autora Sciani, J. M. *et al.*³⁶ também relata que para que um soro antiveneno de *A. mellifera* seja eficaz e proporcione tratamento eficiente às vítimas, é necessária a imunização de animais com um *pool* representativo de venenos de abelhas de condições ambientais diferentes, com estágios de desenvolvimento, época de coleta e dieta a que o inseto pode ser exposto. Desta forma torna-se crucial estar ciente da existência e variação dos componentes menores, pois em um ataque de 500-1000 picadas, cerca de 0,5 g de veneno pode ser injetado e nesta fase as isoformas começam a desempenhar funções importantes.

6. Conclusões

- 1) Um método eficiente de separação de isoformas foi desenvolvido. Em duas etapas: 1ª no CEVAP – separação semipreparativa e 2ª Butantan – separação analítica;
- 2) Foram encontradas bioquimicamente por HPLC detecção UV, 27 isoformas, por LC-MS, 56 isoformas, por sequenciamento ‘de novo’, 33 sequências e por proteômica, 72 sequências de isoformas;
- 3) A análise com o Peaks, apresentou os novos N-terminais e C-terminais observados nos espectros de massas do “shotgun”, apontando a correlação entre esses dois métodos;
- 4) A proposta para o padrão de substituição de aminoácidos para a melitina, resultantes dos alinhamentos das 72 sequências peptídicas obtidas do Peaks, também corroboram com as variações indicadas no “shotgun”.

7. Etapas futuras

- Reanalisar manualmente os espectros do sequenciamento 'de novo' com base nas interpretações proteômicas, a fim de validar as substituições identificadas;
- Isolar cromatograficamente algumas das isoformas e realizar o sequenciamento químico por degradação de Edman (e/ou a análise de aminoácidos), a fim de demonstrar bioquimicamente a existência destas isoformas;
- Realizar testes biológicos (como hemólise, por exemplo) para comparar a potência dos efeitos biológicos das isoformas em relação a melitina padrão;
- Avaliar, por dicroísmo circular, as porcentagens de estruturas secundárias das isoformas isoladas;
- Modelar as isoformas identificadas.

8. REFERÊNCIAS

Normas Vancouver:

<https://www.btu.unesp.br/Home/sobre/biblioteca/assessoriaemtrabalhosepublicacoes/elaboracao-de-referencias-estilo-vancouver---2018.pdf>

Normas para elaboração da dissertação:

<https://www.fmb.unesp.br/Home/ensino/Pos-Graduacao/mestradoacademicoedoutorado/orientacoes-gerais-.pdf>

1. Santos CS. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. Revista Verde (Mossoró - RN - Brasil). 2009;4(3):1-6.
2. Pereira, FM.; et al Produção de mel. Embrapa. 2002. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa>>.
3. Embrapa. Criação de abelhas: apicultura. Edição 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2007. 113p.
4. De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RF. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. Mol Ecol. 2001;10(7):1733-42.
5. Ilyasov RA, Lee MI, Takahashi JI, Kwon HW, Nikolenko AG. A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. Saudi Journal of Biological Sciences. 2020; 27(12):3615-21. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.001.
6. Ferreira RS Jr, Almeida RA, Barraviera SR, Barraviera B. Historical perspective and human consequences of Africanized bee stings in the Americas. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2012;15(2):97-108.
7. Cruz DO, Campos LAO. Polinização por abelhas em cultivos protegidos. R. Bras. Agrociência. 2009;15(1-4):5-10.

8. Maleszka R. Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics*. 2008;3(4):188-92.
9. Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, et al. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*. 2014;46(10):10p. doi: 10.1038/ng.3077
10. Martinez OA, Soares AEE. Melhoramento genético na apicultura comerciam para produção da propólis. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. 2012;13(4):982-90.
11. Guzmán-Novoa E, Montañó LGE, Benítez AC, Novoa GG. Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. *Vet Méx*. 2011;42(2):30p.
12. Ferreira Junior RS, Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Junior A, Orsi RO, Barraviera B, et al. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*. 2010;56:355-362.
13. Pegoraro A, Ferraz MM, de Moura MEK, Nunes TMD, Nienow VV, Polak L. Aspectos práticos e técnicos da apicultura no sul do Brasil. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2017;282p.
14. Arruda VM, Alves Jr VV, Moraes MMB, Netto JC Suárez YR. Análise Morfológica da Glândula de Veneno de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em Populações de Mato Grosso do Sul. *Neotropical Entomology*. 2007;36(2):203-9.
15. Silveira DC, Maracajá PB, Silva RA, Sousa RM, Soto-Blanco B. Variações diurna e sazonal da defensividade das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*. 2015;16(4):925-34.
16. Dantas CG, Nunes TLGM, Gomes MZ, Gramacho KP. Apitoxina: coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*. 2013;4(2):24p.
17. Silvado AD, da Silva KF, Frade RI, Ribeiro MOA. Uso da apitoxina como recurso terapêutico para a artrite reumatoide: uma revisão integrativa. *Revista NBC - Belo horizonte*. 2020;10(19):18p.
18. Aufschneider A, Kohler V, Khalifa S, El-Wahed AA, Du M, El-Seedi H, et al. Apitoxin and Its Components against Cancer, Neurodegeneration and Rheumatoid Arthritis: Limitations and Possibilities. *Toxins*. 2020;12(66):15p. doi: 10.3390/toxins12020066.
19. Brito JCM, Carvalho E, Bastos EMAF, Heneine LGD, Figueiredo K. fracionamento do veneno da *Apis Mellifera* (abelha) utilizando membranas de ultrafiltração de celulose regenerada de 10 kda. *Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química Campinas: Galoá*; 2018. Disponível em: <https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/fracionamento-do-veneno-da-apis-mellifera-%28abelha%29-utilizando-membranas-de-ultrafiltracao-de-celulose-regenerada-de-10-k>.
20. Leandro LF, Mendes CA, Casemiro LA, Vinholis AHC, Cunha WR, de Almeida R, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87(1):10p. doi: 10.1590/0001-3765201520130511.
21. Oliveira MEC, Nunes LA, Silveira TA, Marchini LC, Silva JWP. Manejo da agressividade de abelhas africanizadas. Piracicaba: ESALQ, Divisão de Biblioteca; 2012.
22. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Malaque CMSA and Haddad Jr V. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. p. 260-1.
23. Figuera, RA, Souza TM and Barros, CSL. Acidente provocado por picada de abelhas como causa de morte de cães. *Cienc. Rural*. 2007;37(2):590-593.

- 24 Nascimento W. Estudo eletrofisiológico dos canais iônicos das células-tronco mesenquimais da geléia de wharton do cordão umbilical humano [dissertação]. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; 2011.
- 25 Briganti LEB. Estrutura e função de peptídeos policatiônicos de *Apis mellifera* [monografia]. Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2010.
- 26 Lazdunski M, Fosset M, Hughes M, Mourre C, Romey G and Schmid- Antomarchi H. The apamin-sensitive Ca^{2+} dependent K^{+} channel molecular properties, differentiation and endogenous ligands in mammalian brain. *Biochem Soc Symp.* 1985;50:31-42.
- 27 Kunitz AG. Melitina proveniente do veneno de abelha: Processo de purificação, aplicação e avaliação econômica [dissertação] Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.
28. Lee G, Bae H. Anti-Inflammatory Application of Melittin, a Major Component of Bee Venom: Detailed Mechanism of Action and Adverse Effects. *Molecules.* 2016;21(616):10p. doi:10.3390/molecules21050616
29. Picoli T. Prospecção de atividades biológicas da apamina e melitina [tese]. Pelotas: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; 2016.
30. Pereira AV, de Barros G, Pinto EG, Tempone AG, Orsi RO, Dos Santos LD et al. Melittin induces in vitro death of *Leishmania (Leishmania) infantum* by triggering the cellular innate immune response. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2016;22:1.
31. Strömstedt AA, Wessman P, Ringstad L, Edwards K, Malmsten M. Effect of lipid headgroup composition on the interaction between melittin and lipid bilayers *J Colloid Interface Sci.* 2007;311(1):59-69.
32. Zarrinnahad H, Mahmoodzadeh A, Hamidi M P, Mahdavi M, Moradi A et al. Apoptotic effect of melittin purified from Iranian honey bee venom on human cervical cancer HeLa cell line. *Int J Pept Res Ther.* 2018;24(4):563-570.
33. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2017;402:16-31.
34. Adade CM, Chagas GS, Souto-Padron T. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 2012;139(11):1444-61.
35. Park D, Jung JW, Lee MO, Lee SY, Kim B, Jin HJ. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Peptides.* 2014;53:185-93.
36. Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Junior A, Orsi Rde O, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Pimenta DC. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. *Peptides.* 2010;31(8):1473-9.
37. Localização [Internet]. Prefeitura de Botucatu - SP. [citado em 30 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.botucatu.sp.gov.br/portal/servicos/1058/localizacao>.
38. Unesp [Internet]. Unesp.br. 2022. Available from: <https://www.fca.unesp.br/#>.
39. Ma B, Zhang K, Henrique C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, et al. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(20):2337-42.

ANEXOS

1. Aprovação pelo CEUA/FMVZ



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS ISOFORMAS DE MELITINA NO VENENO DE *Apis mellifera*." **Protocolo CEUA 0199/2021**, a ser conduzido por Leticia Murback, responsável/orientador Daniel Carvalho Pimenta, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/11/2021 a 14/03/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Apiário FMVZ - Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 20/10/2021

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br