VIRGÍNIA MARIA FERREIRA RESENDE

**Análise proteômica de venenos de *Apis mellifera*
baseada em espectrometria de massas:
abordagem quantitativa *label-free* e identificação de fosforilação**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Resende, Virgínia Maria Ferreira

Análise proteômica de venenos de *Apis mellifera* baseada em espectrometria de massas : abordagem quantitativa *label-free* e identificação de fosforilação / Virginia Maria Ferreira Resende. -- São Paulo, 2013.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Mario Sergio Palma.

Descritores: 1.Abelhas 2.Venenos de abelha 3.Proteoma 4.Melitina
5.Espectrometria de massas

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto Max Planck de Biologia Celular Molecular e Genética, localizado em Dresden, Alemanha; no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração, localizado em São Paulo, Brasil; e, no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, em Rio Claro, Brasil. Contou com o apoio financeiro do Instituto de Investigação em Imunologia (iii-INCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Serviço de Intercâmbio Acadêmico Alemão (DAAD).

Aos meus pais, que me trouxeram à vida, que me ensinaram que estudar é importante, que me deram o melhor estudo e, principalmente, me educaram baseando-se na escola da vida.

Aos meus irmãos, Gabi, Juninho e Fran, que estiveram sempre ao meu lado, respeitando minhas escolhas, torcendo pelo meu sucesso e me ajudando a escrever minha história de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aquele em quem eu mais confio, em quem eu busco força para enfrentar as dificuldades, em quem eu encontro segurança para fazer as minhas escolhas e aquele que eu acredito ter feito o plano de vida certo para mim.

Agradeço aos meus pais, por terem feito o seu melhor em meu favor sempre, mesmo quando não parecia ser. Por terem me proporcionado uma criação baseada no amor, na união, na honestidade, na justiça e na verdade. Por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, principalmente os ruins, me ajudando a erguer a minha cabeça e seguir em diante confiante e esperançosa. Acima de tudo, por terem dedicado um amor incondicional.

Agradeço aos meus irmãos, que por terem personalidades tão diferentes, me ensinaram a respeitar o próximo, assim como o diferente, e fizeram parte do meu crescimento como um ser humano que pratica o bem. Por serem amigos, companheiros e fiéis em todos os momentos. Por compartilharem minha felicidade e dividirem o sofrimento. Por tornarem a minha vida mais cheia e completa. Em especial, a Gabi, que com toda sua lucidez, me ajudou a enxergar soluções em momentos em que tudo parecia estar perdido.

Agradeço à pequena Beatriz, que chegou no momento mais turbulento do curso de doutorado, e me deu muita alegria e esperança.

Agradeço a toda a minha grande família, que sempre torce pelo meu sucesso.

Agradeço à avó Margarida por todo o carinho que ela sempre tem para dar, por representar uma vitoriosa em quem eu me espelho, por me mostrar que não é preciso muito para ter alegria de viver.

Agradeço à avó Geralda, que de onde quer que ela esteja agora, está sempre me olhando com aqueles olhos cheios de afeto e ternura. Ela me ensinou a ser bondosa sem ser tola, me ensinou a ser paciente e acima de tudo me ensinou a lutar e nunca desistir de algo quando eu realmente desejo.

Agradeço à tia Vânia, que desde pequenina me fez ter prazer pela leitura e pela escrita, me ajudou a desenvolver a criatividade, me motivou a amar, respeitar e cuidar da natureza. Agradeço a ela por ter ajudado no desenvolvimento do meu espírito de cientista, na construção das minhas ideologias e por ter dado bastante incentivo para trilhar o caminho da educação e acreditar que é possível fazer um mundo melhor.

Agradeço à tia Vanira, que foi muito mais do que uma tia, muitas e muitas vezes me cuidando como uma filha. Agradeço a ela por muitos ensinamentos, entre todos, principalmente, o de ser generosa e ajudar o próximo sempre que possível.

Agradeço a todos os meus amigos, por terem proporcionado momentos de alegria e por terem se prestado a me ouvir nos momentos em que senti necessidade. Em especial às minhas amigas Adriana e Jacqueline, com quem eu divido de forma mais íntima

momentos e acontecimentos particulares, que me fizeram companhia em momentos de solidão, querem me ver feliz.

Agradeço aos amigos que fiz na Alemanha, Camila, Raffael, Vinicius, Laura e Marcelo, por terem sido tão companheiros em um momento em que eu estava sozinha, por terem me ajudado a começar uma nova e completamente diferente vida, por terem me mostrado que pessoas boas não são raridade nesse mundo ainda.

Agradeço a minha amiga e parceira de laboratório Keity, por toda a orientação dada ao longo do desenvolvimento da minha tese, por ter contribuído para o meu crescimento profissional, por ter sido um ombro amigo em momentos de desânimo e por ter dado força para continuar.

Agradeço ao amigo e colega de laboratório Carlo, por todo o auxílio dado para realizar experimentos, por toda a discussão científica desencadeada nos momentos do cafezinho e por ser companhia de bandeirão quase todos os dias durante meu período no Incor.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Imunologia do Incor (FMUSP), por qualquer ajuda que tenham dado durante o período em que estive lá realizando parte do doutorado e por terem proporcionado frutíferas discussões durante as reuniões de pós-graduandos.

Agradeço ao Serviço de Alergia e Imunologia.

Agradeço ao Dr. Fabio Castro, por toda a atenção despendida, por todos os esforços gastos em meu favor e por torcer sempre pelo meu sucesso.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Kalil, por todo o tempo dedicado a me ouvir, me aconselhar, me mostrar direções. Por ter sido interessado e preocupado com o bom andamento do projeto. Por ter escrito uma carta de recomendação quando me candidatei e uma bolsa de estudos para realizar parte da pesquisa na Alemanha. Por ter sido pessoa importante na solução de entraves.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, por todo o auxílio dado durante o tempo em que estive lá.

Agradeço ao meu orientador Prof. Mario Palma, por ter me dado a chance de iniciar minha carreira científica em seu laboratório, através do desenvolvimento de projeto de pesquisa como aluna de iniciação científica, acreditando no meu potencial. Por ter permanecido meu orientador se credenciando a outra instituição, quando ingressei no doutorado direto. Por ter sido paciente em momentos de imaturidade e por ter acreditado que eu era capaz.

Agradeço ao meu grande amigo e companheiro Andrej, por ter me recebido de braços abertos quando cheguei no laboratório do instituto de pesquisa na Alemanha. Por ter sido tão solícito em todos os momentos em que pedi ajuda no trabalho. Por ter se disponibilizado de imediato a me ajudar com os experimentos, análises, problemas com computadores e a escrita. Por ter sido fundamental no desenvolvimento de habilidades

diferenciadas. Por ter compartilhado minhas aflições e frustrações relacionadas à vida na Alemanha. Por ter me dado força quando eu quis desistir e jogar tudo para o alto. Por ter dado risadas comigo quando eu estava alegre e por ter chorado e enxugado minhas lágrimas quando eu estava triste. Por ter mudado o meu jeito de encarar a vida e os problemas. Por me mostrar um jeito mais leve de viver a vida. Por ter mudado de país e sua própria vida para estar ao meu lado.

Agradeço a todo o pessoal do Instituto Max Planck de Biologia Celular Molecular e Genética (Dresden, Alemanha) por abrirem as portas de seus laboratórios e estarem prontos a colaborar. Por terem contribuído de forma significativa para o meu crescimento profissional. Em especial à Carolyn do Escritório Internacional, pela prontidão em resolver todos os assuntos relacionados à regularização da minha situação como estrangeira.

Agradeço a todo o pessoal do laboratório de espectrometria de massas do Instituto Max Planck, por todo o suporte fornecido durante o desenvolvimento do doutorado sanduiche e pelas discussões científicas geradas nas reuniões semanais de grupo. Especialmente, à Andrea Knust e Anna Shevchenko, por terem auxiliado no treinamento técnico e meu desenvolvimento científico. E, à secretária Janine, por sua eficiência e rapidez no desenrolamento de entraves burocráticos e por se mostrar sempre disposta.

Agradeço ao Dr. Andrej Shevchenko, por ter me permitido apresentar um pedido de colaboração, por ter acreditado no sucesso da colaboração, por ter me recebido em seu

laboratório fornecendo todo e qualquer suporte necessário para o bom desenvolvimento do trabalho. Por ter me ensinado tantas coisas novas em tão curto período de tempo, que eu levaria anos para aprender no Brasil.

Agradeço às agências financiadoras, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (iii-INCT).

Agradeço a todos que não estão nomeados aqui, mas que de alguma forma me ajudaram durante essa jornada.

Por fim, agradeço especialmente a todas as abelhas que foram sacrificadas em prol do conhecimento e desenvolvimento da ciência.

Nem tudo é fácil

“É difícil fazer alguém feliz, assim como é fácil fazer triste.

É difícil dizer eu te amo, assim como é fácil não dizer nada

É difícil valorizar um amor, assim como é fácil perdê-lo para sempre.

É difícil agradecer pelo dia de hoje, assim como é fácil viver mais um dia.

É difícil enxergar o que a vida traz de bom, assim como é fácil fechar os olhos e atravessar a rua.

É difícil se convencer de que se é feliz, assim como é fácil achar que sempre falta algo.

É difícil fazer alguém sorrir, assim como é fácil fazer chorar.

É difícil colocar-se no lugar de alguém, assim como é fácil olhar para o próprio umbigo.

Se você errou, peça desculpas...

É difícil pedir perdão? Mas quem disse que é fácil ser perdoado?

Se alguém errou com você, perdoa-o...

É difícil perdoar? Mas quem disse que é fácil se arrepender?

Se você sente algo, diga...

É difícil se abrir? Mas quem disse que é fácil encontrar alguém que queira escutar?

Se alguém reclama de você, ouça...

É difícil ouvir certas coisas? Mas quem disse que é fácil ouvir você?

Se alguém te ama, ame-o...

É difícil entregar-se? Mas quem disse que é fácil ser feliz?

Nem tudo é fácil na vida...Mas, com certeza, nada é impossível.

Precisamos acreditar, ter fé e lutar para que não apenas sonhemos,

Mas também tornemos todos esses desejos, realidade”

Cecília Meireles

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO.....	1
1. <i>Apis mellifera</i> africanizada.....	4
1.1 História.....	4
1.2 História natural dos acidentes.....	6
1.3 Composição dos venenos de abelhas do gênero <i>Apis</i> e seus mecanismos de ação.....	8
1.4 Aspectos clínicos e tratamentos de ferroadas de abelhas.....	11
2. Proteômica baseada em espectrometria de massas.....	14
2.1 Análise proteômica de venenos de abelhas.....	14
2.2 Espectrometria de massas.....	16
2.2.1 Preparação de amostra previamente à análise por espectrometria de massa.....	16
2.2.2 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.....	19
2.2.3 Espectrometria de massas de peptídeos.....	23
2.2.4 Espectrômetro de massas Orbitrap.....	23
2.2.5 Aquisição dependente de dados.....	25
2.2.6 Fragmentação de peptídeos.....	27
2.2.7 Identificação do peptídeo a partir do espectro de fragmentação.....	28
3. Proteômica quantitativa.....	30

3.1 Técnicas quantitativas para espectrometria de massas.....	30
3.2 Quantificação livre de marcação (<i>Label-free quantification</i>).....	38
3.3 Quantificação <i>label-free</i> de venenos de abelhas.....	42
3.4 SuperHirn.....	43
3.5 Procedimentos estatísticos.....	47
3.5.1 “ <i>False Discovery Rate</i> ” da identificação de peptídeos	47
3.5.2 Normalização dos dados	49
3.5.3 Avaliação das diferenças quantitativas a nível de proteína	52
4. Modificações Pós-Traducionais.....	54
4.1 Fosfoproteômica.....	56
4.1.1 Fosforilação	56
4.1.2 Técnicas analíticas aplicadas à fosfoproteômica	58
OBJETIVOS.....	65
MÉTODOS.....	67
1. Coleta da Amostra.....	67
2. Preparação da Amostra.....	67
3. Análise LC-MS/MS.....	68
4. Processamento dos dados.....	69
5. Análise quantitativa <i>label-free</i>	70
6. Síntese do fosopeptídeo e controle de qualidade.....	71
7. Ensaio Biológicos.....	72
7.1 Atividade hemolítica.....	72
7.2 Atividade de desgranulação de mastócitos.....	73
7.3 Efeito citolítico/citotóxico.....	74
7.4 Atividade quimiotática.....	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
1. Perfil proteômico dos venenos de abelhas.....	78
1.1 Identificação de proteínas baseada na abordagem <i>Shotgun</i> LC-MS/MS.....	78
2. Diferenças quantitativas a nível protéico entre os venenos	94

3. Identificação de fosforilações em toxinas dos venenos.....	102
4. Relação entre fosforilação e a atividade biológica da toxina.....	119
4.1 Controle de qualidade da síntese de melitina fosforilada.....	120
4.2 Efeito da fosforilação identificada em melitina nas suas atividades biológicas.....	125
4.2.1 Atividade hemolítica.....	125
4.2.2 Atividade de desgranulação de mastócitos	128
4.2.3 Efeito citotóxico/citolítico em mastócitos	130
4.2.4 Atividade Quimiotáctica	131
CONCLUSÃO.....	137
ANEXOS.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188

LISTA DE SIGLAS

	Inglês	Português
AHBV	Africanized Honeybee Venom	Veneno de Abelha Africanizada
ANOVA	Analysis of Variance	Análise de Variância
AQUA	Absolute Quantification	Quantificação Absoluta
BCA	Bicinchoninic Acid Assay	Ácido Bicinconínico
C13	Carbon-13	Carbono 13
CEIS	Study Center of Social Insects	Centro de Estudos de Insetos Sociais
CID	Collision Induced Dissociation	Colisão Induzida por Dissociação
CIP	Alkaline Phosphatase Calf Intestinal	Fosfatase Alcalina Intestinal Bovina
Da	Dalton	Dalton
DDA	Data dependent acquisition	Aquisição Dependente de Dados
DTT	Dithithreitol	
ECD	<i>Electron capture dissociation</i>	Dissociação por Captura de Elétrons
ESI	Electrospray Ionization	Ionização por Eletrospray
EST	Expressed Sequence Tag	Marcador de Sequência Expressa
ETD	Electron Transfer Dissociation	Dissociação por Transferência de Elétrons
FDR	False Discovery Rate	Taxa de Descoberta Falsa
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron resonance	Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier
FWHM	Full Width at Half Maximum	
HBV	Honeybee Venom	Veneno de Abelha
HC	Clinics Hospital	Hospital das Clínicas
HCD	Higher-Energy Collision Dissociation	Dissociação Induzida por Alta Energia de Colisão
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantification	Marcador Isobárico para Quantificação Relativa e Absoluta
IAA	Iodoacetamide	Iodoacetamida
IBRC	Bioscience Institute of Rio Claro	Instituto de Biociências de Rio Claro

ICAT	Isotope-coded affinity tags	Marcador de Afinidade Enriquecido Isotopicamente
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography	Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados
INCOR	Heart Institute	Instituto do Coração
IUIS	International Union of Immunological Societies	União Internacional da Sociedade de Imunologia
LC	Liquid Chromatography	Cromatografia Líquida
LDH	Dehidrogenase Lactate	Lactato Desidrogenase
LTQ-FT	Linear Trap Quadrupole Fourier Transform	Quadrupolo Armadilha de Íons Linear com Transformada de Fourier
MALDI	Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization ionization	Ionização a Laser Assitida por Matriz
MCD	Mast Cell Degranulating	Peptídeo Desgranulador de Mastócitos
MOAC	Metal Oxide Affinity Chromatography	Cromatografia de Afinidade por Óxidos Imobilizados
MS	Mass Spectrometry	Espectrometria de Massas
MS1	Precursor Ion Scan	Espectro de Massas do Íon Precursor
MS2	Fragment Ion Scan	Espectro de Massas do Íon Fragmento
N15	Nitrogen-15	Nitrogênio 15
PLA2	Phospholipase A2	Fosfolipase A2
PTMs	Post-Translational Modification	Modificações Pós-Traducionais
QCAT	Concatenated Quantitative Peptides	Peptídeos quantitativos concatenados
Quad	Quadrupole	Quadrupolo
SAX	Strong Anion Exchange	Troca aniônica
SDS-	Sodium Dodecyl Sulfate-	Dodecilsulfato sódico-Gel de Acrilamida
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	para Eletroforese
SILAC	Stableisotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture	Análise da razão de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células
SINAN	-	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS	-	Secretaria de Vigilância em Saúde
TiO2	Titanium dioxide	Dióxido de titânio
TOF	Time of Flight	Tempo de Voo
UNESP	State University of São Paulo	Universidade Estadual Paulista
XIC	Extracted-Ion Chromatogram	Cromatograma de íon extraído
XML	Extensible Markup Language	Linguagem de marcação

LISTA DE SÍMBOLOS

	Inglês	Português
%	Percent	Porcento
Δ	Delta	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius degree	Graus Celsius
μg	Micrograms	Microgramas
μL	Microliters	Microlitros
μm	Micrometers	Micrômetros
$\text{\AA}$	Angstroms	Ângstroms
CaCl_2	Calcium chloride	Cloreto de cálcio
Cm	Centimeters	Centímetros
h	Hours	Horas
H_3PO_4	Phosphoric Acid	Ácido Fosfórico
L	Liters	Litros
M	Molar	Molar
m/z	Mass/Charge	Massa/Carga
mM	Milimolar	Milimolar
mm	Milimeters	Milímetros
ms	Miliseconds	Milisegundos
nm	Nanometers	Nanômetros
PO_3^-	Fosfato	Phosphate
ppm	Parts per million	Partes por milhão
Ser	Serine	Serina
Thr	Threonine	Treonina
Tyr	Tyrosine	Tirosina
U	Unit	Unidades
V	Volume	Volume
Λ	Lamda	Lamda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático da troca de válvulas do cromatógrafo líquido.....	22
Figura 2	Esquema do Orbitrap.....	24
Figura 3	Visão de um corte transversal do analisador de massas Orbitrap.....	24
Figura 4	Aquisição dependente de dados.....	27
Figura 5	Padrão de fragmentação do peptídeo.....	28
Figura 6	Quantificação baseada em peptídeos marcados com isótopos estáveis.....	32
Figura 7	Componentes dos marcadores isobáricos usados em iTRAQ.	33
Figura 8	Esquema de quantificação por iTRAQ.....	34
Figura 9	Esquema da análise proteômica quantitativa baseada em marcação versus sem marcação.....	37
Figura 10	Distribuição isotópica característica de um peptídeo em MS ¹ ..	39
Figura 11	<i>Extracted-ion chromatogram</i> de um peptídeo vindo de duas aquisições individuais.....	40
Figura 12	Comparação do teste <i>t</i> e ANOVA para obter a significância estatística.....	52
Figura 13	Esquema representativo da regulação da fosforilação de uma proteína.....	56
Figura 14	Esquema das diferentes estratégias aplicadas para a facilitação das análises de fosforilação.....	58
Figura 15	SDS-PAGE das três amostras de veneno.....	78
Figura 16	Gradiente curto de separação de peptídeos dos três venenos de abelha.....	80
Figura 17	Gradiente longo de separação de peptídeos dos três venenos de abelha.....	81

Figura 18	Efeito da extensão do gradiente de separação na cobertura da amostra.....	83
Figura 19	Diagrama de Venn dos perfis proteicos dos venenos investigados em gradiente de separação cromatográfica de 2h.....	86
Figura 20	Diagrama de Venn dos perfis proteicos dos venenos investigados em gradiente de separação cromatográfica de 6h.....	87
Figura 21	Fluxograma da análise proteômica quantitativa dos venenos de abelha.....	97
Figura 22	Toxinas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e <i>A.m.carnica</i>	100
Figura 23	Toxinas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e <i>A.m. ligustica</i>	101
Figura 24	Identificação de fosfopeptídeos em todas amostras de veneno.....	105
Figura 25	XIC dos peptídeos de melitina candidatos a fosfopeptídeos....	116
Figura 26	Espectro MS/MS do peptídeo tríptico derivado de melitina, fosforilado em serina.....	117
Figura 27	spectro MS/MS do peptídeo tríptico derivado de melitina, fosforilado em treonina.....	118
Figura 28	Espectro MS/MS do peptídeo tríptico derivado de icarapina, fosforilado em serina.....	120
Figura 29	Espectro MS/MS do fosfopeptídeo tríptico derivado de melitina sintética após digestão com trispina.....	123
Figura 30	Espectro MS1 de melitina sintética não tratada com fosfatase.....	125
Figura 31	Espectro MS1 obtido para melitina sintética após tratamento com fosfatase alcalina.....	126
Figura 32	Efeito de melitina não modificada e melitina fosforilada na atividade hemolítica em eritrócitos humanos.....	129

Figura 33	Efeito de melitina não modificada e fosforilada na liberação da enzima β -hexosaminidase de mastócitos.....	131
Figura 34	Efeito citotóxico de melitina não modificada e fosforilada em mastócitos.....	133
Figura 35	Efeito de melitina não modificada e fosforilada na migração de células polimorfo nucleares.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados epidemiológicos de acidentes com abelhas no Brasil.....	7
Tabela 2	Dados epidemiológicos de acidentes com abelhas no Estado de São Paulo.....	7
Tabela 3	Parâmetros usados em SuperHirn.....	70
Tabela 4	Parâmetros usados em DanteR.....	70
Tabela 5	Lista de proteínas identificadas nos venenos das abelhas europeias e africanizada.....	89
Tabela 6	Proteínas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e <i>A.m.carnica</i>	99
Tabela 7	Proteínas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e <i>A.m.ligustica</i>	101
Tabela 8	Fosfopeptídeos identificados no veneno da abelha africanizada.....	105
Tabela 9	Fosfopeptídeos identificados no veneno de <i>A.m.carnica</i>	108
Tabela 10	Fosfopeptídeos identificados no veneno de <i>A. m. ligustica</i>	109
Tabela 11	Fosfopeptídeos identificadas em duas proteínas dos venenos das abelhas africanizada e europeias	112
Tabela 12	Sequências do peptídeo derivado de melitina.....	114

RESUMO

Resende VMF. *Análise proteômica de venenos de Apis mellifera baseada em espectrometria de massas: abordagem quantitativa e identificação de fosforilação em toxinas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Há muito tempo os venenos de abelhas se tornaram objeto de interesse de muitos cientistas, principalmente os venenos daquelas linhagens do gênero *Apis*, chamadas abelhas europeias e as conhecidas abelhas africanizadas. O foco no desenvolvimento de terapias eficazes que pudessem prevenir ou frear as reações desencadeadas pelas toxinas dos venenos desses insetos foi o principal estimulador do surgimento dessa grande área da pesquisa, uma vez que esses animais causam um grande número de acidentes em animais e seres humanos e os acidentes podem desencadear graves consequências, inclusive óbito. Sendo assim, desenvolvemos o presente trabalho baseado na caracterização da composição proteica dos venenos de abelhas europeias e africanizadas, na análise quantitativa diferencial entre os venenos e, na investigação de fosforilações e a possível relação das mesmas com as funções biológicas. Reunindo todos os elementos que estavam ao nosso alcance para compor o melhor conjunto de etapas para a realização do estudo proteômico de venenos de abelhas, nós atingimos todos os objetivos propostos. Utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massas, consistindo de

análise *shotgun* seguida de LC-MS/MS realizada em um dos mais modernos espectrômetros de massas, nós fomos capazes de obter resultados extremamente confiáveis e interessantes. Comparando-se o efeito da extensão do gradiente de separação na cromatografia líquida, nós fomos capazes de atingir uma maior cobertura da amostra, uma vez que identificamos um maior número de proteínas após a utilização do gradiente mais longo. A identificação de fosforilações foi favorecida pela combinação de fragmentação por “Colisão Induzida por Dissociação” e medidas de massa de alta acurácia realizadas no instrumento LTQ-Orbitrap-Velos. Enquanto apenas 29 proteínas foram identificadas após 120 minutos de separação cromatográfica, um total de 51 proteínas foram identificadas aplicando-se gradiente mais longo. Dentre as 51 proteínas totais, 42 são comuns aos venenos das três abelhas. A comparação em pares mostrou que os venenos das abelhas europeias compartilham 44 proteínas e os venenos das abelhas africanizadas compartilham 43 proteínas tanto com o veneno de *A. m. carnica* quanto com o de *A. m. ligustica*. Além disso, nós revelamos que existem diferenças quantitativas entre algumas das proteínas dos venenos, sendo muitas dessas proteínas diferenciais toxinas com funções conhecidamente relevantes. A investigação de fosforilação mostrou que duas toxinas apresentam-se na forma fosforilada: melitina e icarapina. Melitina é considerada a principal toxina de venenos de abelhas, sendo bem conhecida por sua ação altamente tóxica e alergenicidade. Este peptídeo foi identificado com fosforilação ocorrendo no sítio Ser¹⁸ em todas as amostras de venenos, enquanto somente no veneno da abelha africanizada foi também identificado com sítio de fosforilação no resíduo de Thr¹⁰. Icarapina,

também já descrita como um alérgeno do veneno, apresentou sítio de fosforilação no resíduo Ser²⁰⁵. Por fim, nós demonstramos o efeito da fosforilação presente em melitina (Ser¹⁸) realizando ensaios de atividade biológica do peptídeo fosforilado e nativo, como: hemólise, lise celular e desgranulação de mastócitos e atividade quimiotáctica. Foi observado que a toxicidade do peptídeo fosforilado é reduzida em comparação ao do peptídeo nativo. Sendo assim, nós podemos concluir que a combinação de metodologias eficientes e a utilização de moderna instrumentação nos levou a resultados surpreendentes, os quais se somam a todo o conhecimento já existente acerca de venenos de abelhas.

Descritores: veneno de abelha; proteoma; LC-MS/MS, fosforilação; melitina

SUMMARY

Resende VMF. Mass Spectrometry-based proteomic analysis of honeybee venoms: label-free quantification and phosphorylation identification [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2013.

Honeybee venom toxins disturb the activity of critical cellular processes, triggering immunological, physiological, and neurological responses within victims. Studies on venom toxins have provided invaluable knowledge towards elucidating the molecular and functional details of their biological targets, yet there has been no report of a full proteome/phosphoproteome profile of honeybee venom. In this study, we focused on *Apis mellifera* honeybee venom characterization, including proteins identification, label-free quantitative analysis and phosphorylation identification. Making use of a MS-based proteomic approach, consisting on *in-solution* digestion followed by LC-MS/MS analysis, we were able to compare the effect of the liquid chromatography gradient length on the sample coverage, consequently, to identify a higher number of proteins using longer separation gradient of the tryptic peptides. Favorable identification of phosphorylations was achieved by the application of a long separation gradient combined with CID fragmentation and high accuracy mass measurement using an LTQ Orbitrap Velos. Here we report on the comparative shotgun proteomics study of the venoms of two *Apis mellifera* subspecies, *A. m. carnica* and *A. m. ligustica*, and the hybrid known as Africanized honey bee

(AHB). We identified 51 proteins in total, with 42 of them being common among the three venoms, including many previously unidentified entries. Performing label-free quantification, we observed that few proteins were found with different relative amounts. Additionally, we revealed the phosphorylation of two proteins in all the samples, with two of them being HBV toxins/allergens: melittin and icarapin. Icarapin was identified as phosphorylated at ²⁰⁵Ser. Melittin was identified as phosphorylated at the ¹⁸Ser and ¹⁰Thr positions in all venoms, as well. Given these novel findings, we then chose to compare the toxicity of the phosphorylated/unphosphorylated forms of the major venom toxin, melittin, considering the most prominent phosphorylation event, the phosphorylated ¹⁸Ser position. We showed that the toxicity is in fact decreased when the peptide is phosphorylated. Based on a combination of efficient methodology and state-of-the-art instrumentation, delineated by our Shotgun-NanoESI-Long Gradient-LTQ Orbitrap Velos analysis, we achieved proteomic coverage far surpassing any previous report. Together, these discoveries pave the way for future phosphovenomic studies.

Descriptors: honeybee venom; label-free quantification, LC-MS/MS, phosphorylation, melittin

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A investigação de sistemas vivos ao nível protéico tem contribuído para importantes descobertas a respeito de diversos processos biológicos. A identificação e quantificação de proteínas expressas em células, fluidos celulares, tecidos ou até mesmo organismos inteiros tornaram-se o maior desafio após a era genômica. Proteômica baseada em espectrometria de massas modificou fundamentalmente o modo como os sistemas biológicos são interrogados, devido a sua habilidade de analisar milhares de proteínas, incluindo suas modificações pós-traducionais (PTMs). Há cerca de cinco anos, a maioria dos estudos proteômicos apenas enumerava as proteínas constitutivas de um sistema biológico. Contudo, o desenvolvimento da espectrometria de massas foi responsável pela mudança desses estudos, sendo que análises quantitativas e de PTMs compõem a maioria dos estudos proteômicos executados atualmente. O conjunto de etapas de trabalho de um estudo proteômico, dividido em preparação da amostra, separação das proteínas e peptídeos, análise por espectrometria de massas (MS) e, análise dos dados, permite aos cientistas reunirem elementos específicos que se encaixam melhor na tarefa tida em mãos. Do mesmo modo, neste trabalho nós reunimos os elementos que estavam ao nosso alcance para compor o melhor conjunto de etapas que executassem a tarefa de analisar o conteúdo protéico dos venenos de três subespécies de *Apis mellifera*, buscando não somente a elaboração de uma lista de proteínas, mas também a análise quantitativa

comparativa, assim como a análise de modificações pós-tradicionais destas proteínas.

Os venenos de abelhas do gênero *Apis*, principalmente daquelas linhagens europeias e africanizadas, despertam um grande interesse em cientistas em virtude do grande número de acidentes causados por esses animais e de suas consequências. Isso fez surgir uma grande área de pesquisa, com escopo no desenvolvimento de terapias eficazes que possam conter ou prevenir as reações desencadeadas pelas toxinas dos venenos desses insetos. Além disso, outro interesse intimamente relacionado ao primeiro é entender o mecanismo pelo qual esses venenos agem de forma tão precisa para desempenhar eficientemente sua função de proteger as colônias de abelhas contra possíveis predadores e agressores. É intrigante a forma pela qual o curso da evolução atribuiu tamanha funcionalidade a essas toxinas constituintes dos venenos, as quais são peptídeos, proteínas ou compostos de baixa massa molecular. A enorme riqueza em compostos biologicamente ativos desperta uma grande curiosidade porque são moléculas capazes de desencadear graves reações fisiopatológicas, uma vez introduzidas em um animal ou ser humano, podendo levá-los a óbito. Sendo assim, desenvolvemos o presente trabalho baseado na caracterização da composição protéica dos venenos de abelhas europeias e africanizadas, na análise quantitativa diferencial entre os venenos e, na investigação de modificações pós-traducionais e a possível relação das mesmas com as funções biológicas.

1. *Apis mellifera* africanizada

1.1 História

A abelha africanizada, chamada popularmente *killer bee*, resultou de um cruzamento experimental entre abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) e espécimes de abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera iberica*). Em 1956, abelhas africanas foram transportadas da África (Tanzânia) para o Brasil com o intuito de aumentar a produção de mel. As abelhas africanas produziram menores quantidades de mel que as abelhas europeias, porém toleraram melhor o clima quente. Diante dessa constatação, foi considerada a tentativa de fazer o cruzamento das abelhas africanas com as europeias criadas no Brasil naquela época, no intuito de que os descendentes desses cruzamentos pudessem se adaptar bem ao clima tropical da América do Sul e produzir quantidades maiores de mel. Em 1957, 26 colônias da abelha africana escaparam acidentalmente do apiário do laboratório de apicultura em Rio Claro, São Paulo.⁽¹⁾ O cruzamento inter-espécies bem difundido com populações locais das abelhas europeias anteriormente introduzidas no local foi muito bem sucedido e resultou na predominância de descendentes agressivos, os quais adquiriram fortemente os traços genéticos da abelha africana. Inicialmente, pensou-se que a hibridização poderia ocorrer, mas ao longo do tempo

observou-se que as características das abelhas africanizadas substituíram as das europeias. (2)

Após o estabelecimento das abelhas africanizadas no Brasil, elas iniciaram um processo migratório graças a dois fatores: primeiro, a habilidade de voar longas distâncias e segundo, devido ao comportamento incomum de enxamear. O enxameamento das abelhas africanizadas ocorre a uma taxa mais acelerada que a das demais abelhas; enquanto as últimas enxameiam de 2 a 3 vezes por ano, as africanizadas enxameiam de 6 a 12 vezes por ano, estabelecendo novas colônias muito rapidamente.(3, 4) As abelhas africanizadas espalharam-se através da América Latina avançando, em média, entre 250 e 300 Km por ano, até que em 1985 atingiram o México e em 1990 chegaram ao Texas, Estados Unidos. A taxa de migração através dos Estados Unidos foi ligeiramente reduzida, mas ainda assim as abelhas alastraram-se pelo Arizona e Novo México em 1993 e pela Califórnia por volta de 1994.(5) Atualmente elas já são encontradas em Arizona, Nevada, Oklahoma e provavelmente se tornarão endêmicas no Sul, incluindo Louisiana, Mississippi, Alabama, Florida e partes da Georgia.(6) Em todos os lugares onde as abelhas africanizadas estabeleceram-se, elas tornaram-se um grave problema de saúde pública e para a agricultura, devido a sua agressividade. Embora os apicultores enfrentem dificuldades de manejo, as abelhas africanizadas não podem ser aniquiladas porque são extremamente relevantes para a polinização e conseqüentemente para a produção agrícola. Por isso, a medida inicialmente tomada foi o aprendizado da convivência com as abelhas, todavia com a

adoção de iniciativas para reduzir e evitar os potenciais prejuízos causados pelas mesmas sempre que possível.

1.2 História natural dos acidentes

Desde o estabelecimento das abelhas africanizadas em quase toda a América, um crescente número de acidentes tem sido relatado. Pelo menos 350 mortes causadas pelas abelhas africanizadas foram relatadas na América Latina nos primeiros 28 anos após a introdução das mesmas. Porém, há indicações de que o número real seria um total de 700 a 1000 mortes.(7) Na Venezuela, 70 mortes foram relatadas entre 1978 e 1981, e no México, entre cerca de 300 ataques ocorridos entre 1986 e 1992, 49 resultaram em morte.(8) No Hospital Vital Brasil, São Paulo, Brasil, uma média de 3 acidentes por ano ocorriam antes de 1957, sendo que após esse ano o número cresceu para 100, dentre os quais óbitos foram registrados.(5) Desde o primeiro ataque fatal ocorrido no Texas em 1993, outros acidentes seguidos de morte têm sido relatados nos Estados Unidos.(9) Dados mais recentes coletados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan-Net) do Ministério da Saúde mostram a incidência de acidentes e óbitos causados por acidentes com abelhas no Brasil (Tabela 1) e no Estado de São Paulo (Tabela 2).

Tabela 1 – Dados epidemiológicos de acidentes com abelhas no Brasil.

Ano	Número de casos	Óbitos
2007	5344	19
2008	5725	11
2009	6761	31
2010	7381	28
2011	8338	28

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sinan Net

*Dados de 2011 atualizados em 07/02/2012, dados parciais.

Tabela 2 – Dados epidemiológicos de acidentes com abelhas no Estado de São Paulo.

Ano	Número de casos	Óbitos
2007	1381	1
2008	1527	1
2009	1558	3
2010	1853	4
2011	1745	5

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sinan Net

*Dados de 2011 atualizados em 07/02/2012, dados parciais.

O grande número de acidentes é reflexo direto do comportamento da abelha africanizada, que parece ser geneticamente modulado.(10) Vários componentes chamados ferormônios foram isolados e relacionados à característica da agressividade.(11) Embora os acidentes com abelhas europeias também sejam preocupantes, as abelhas africanizadas têm provocado acidentes mais sérios porque são mais agressivas que aquelas. As abelhas africanizadas podem seguir as vítimas por até quatrocentos

metros,(12) além de usualmente atacarem em massa. Além da agressividade, outro motivo que também justifica esse comportamento de ataque em massa deve-se ao fato de que as abelhas respondem a estímulos químicos voláteis liberados pelas glândulas de veneno de outras abelhas no momento da ferroadada.(13, 14) As ferroadas são perigosas para aqueles indivíduos que apresentam risco de anafilaxia, a qual é desencadeada por hipersensibilidade mediada por IgE. Os efeitos são também extremamente danosos quando o indivíduo sofre um ataque em massa, durante o qual a vítima pode receber centenas ou até milhares de ferroadas. Neste caso, uma reação tóxica é desencadeada, podendo levar o indivíduo a óbito.

1.3 Composição dos venenos de abelhas do gênero *Apis* e seus mecanismos de ação

A investigação de venenos de abelhas tem sido realizada há bastante tempo, agregando diversas informações acerca do conhecimento a respeito de venenos. No mesmo sentido, recentes estudos têm progredido de forma significativa na identificação e caracterização de componentes de venenos de abelhas, principalmente aqueles de baixa abundância. Atualmente já se sabe que entre todos os componentes conhecidos, doze deles são caracterizados como alérgenos, os quais podem ser encontrados na lista de alérgenos do Sub-Comitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional da Sociedade de Imunologia (IUIS).(15) Entre os alérgenos estão as toxinas mais conhecidas do veneno, melitina e fosfolipase A2 (PLA₂). Além de

desencadearem resposta alérgica nas vítimas, tais componentes também apresentam efeito tóxico, especialmente o peptídeo melitina, por representar cerca de 50% do peso seco do veneno, de acordo com Habermann *et al.*(16) Melitina é um peptídeo anfifílico, com 26 resíduos de aminoácidos, conhecido por exercer efeito perturbador em membranas celulares, sendo assim hemolítico e antibiótico.(17) Ademais, a melitina induz alterações estruturais de membranas, como formação de poros e vesículas.(18-20) As alterações morfológicas de membranas causadas pela melitina acarretam em secreção de hormônios, agregação de proteínas de membrana e alteração do potencial de membrana. Todos esses efeitos fazem da melitina um importante modificador de funções celulares.(21, 22)

Além de todos os efeitos apresentados pela melitina, esse peptídeo também foi descrito como ativador de PLA₂,(21, 22) que é considerada outra proteína tóxica muito importante identificada no veneno de abelhas europeias. Além da função alergênica, essa proteína de 134 resíduos de aminoácidos ainda é responsável por catalizar a hidrólise de glicerofosfolípidos e já foi descrita em diversas fontes, tais como venenos de insetos e répteis, suco pancreático, fluido sinovial, desempenhando diferentes funções.(23) Além da melitina, o veneno de abelhas contém muitos outros peptídeos, tais como apamina e peptídeo desgranulador de mastócitos (MCD – *Mast Cell Degranulating*). Em contraste à melitina, a apamina possui um modo de ação altamente específico; possui apenas 18 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 2 KDa de peso molecular, sendo o menor peptídeo neurotóxico conhecido. A apamina não é lítica, mas exerce influência sobre as

membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico.(24) O peptídeo MCD, por sua vez, é constituído de 22 resíduos de aminoácidos, diferindo da melitina por apresentar duas pontes dissulfídicas, assemelhando-se estruturalmente à apamina. Segundo Dotimas & Hider *et al*, (25) o peptídeo MCD é capaz de desgranular mastócitos, mesmo quando presente em baixas concentrações.

A descoberta de novos componentes de venenos de abelhas tem sido contínua, em razão do desenvolvimento de instrumentos e estratégias analíticos. Apesar disso, não está disponível ainda na literatura o estudo do perfil protéico do veneno da abelha africanizada, a qual é predominante no Brasil e acarreta graves problemas de saúde pública em razão dos acidentes que ela causa frequentemente, como discutido na seção anterior. Adicionalmente ao estudo do comportamento dessas abelhas, o qual é relevante na proposição de métodos de prevenção de acidentes, merece destaque a investigação do comportamento bioquímico das toxinas responsáveis por causar tantos danos. Estudar a composição química do veneno, o que inclui caracterizar funcionalmente os seus componentes e entender a relação entre o modo de ação das toxinas no organismo da vítima e os sintomas apresentados após a ferroada, é pré-requisito extremamente necessário para o estabelecimento de tratamentos eficientes que promovam o bem-estar da vítima. Os sintomas pós-ferroada e tratamentos já disponíveis são tópicos abordados na seção seguinte.

1.4 Aspectos clínicos e tratamentos de ferroadas de abelhas

As reações aos venenos desses himenópteros apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde pequenas reações locais até reações generalizadas fatais. As manifestações clínicas resultantes do contato entre abelhas e humanos que despertam o maior interesse são as alérgicas e as tóxicas. As reações alérgicas, as quais estão ligadas à hipersensibilidade do indivíduo, podem ser desencadeadas por uma única ferroadada. Estudos retrospectivos têm sugerido que a prevalência de reações alérgicas a ferroadas de Hymenoptera em populações não-atópicas é de cerca de 0,4% a 3,3%.(26) As reações alérgicas geralmente são tratadas com anti-histamínicos, corticosteróides, broncodilatadores e vasodilatadores.(27) No entanto, a vítima pode sofrer um choque anafilático, que poderá levá-la à morte. Embora reações adversas possam ocorrer ao longo do tratamento, a imunoterapia específica tem se mostrado muito eficiente, com eficácia variando entre 90 e 100%.(28)

Ferroadas causadas por um grande número de abelhas causam intoxicação independente da hipersensibilidade. Admite-se que a quantidade de veneno seco por abelha varie entre 0,2 e 0,5 mg e que uma abelha africanizada seja capaz de injetar cerca de 94 µg de veneno em menos de um minuto e, no caso de um acidente grave, com mais de 100 ferroadas, os níveis de veneno na circulação sanguínea podem chegar até 3,8 µg/mL.(29) As reações tóxicas incluem hipotensão, sudorese, náuseas, hipotermia e taquicardia. Os danos provocados por toxicidade sistêmica se manifestam

apenas algumas horas após o ataque, com a maioria das mortes ocorrendo 22 horas depois do acidente.⁽⁵⁾ O tratamento mais indicado para as reações tóxicas é a utilização de um antiveneno específico e, apesar do alto índice de notificações de acidentes envolvendo ferroadas de abelhas, não está disponível ainda o soro antiveneno específico de abelhas. O desenvolvimento de um antiveneno vem sendo tentado em vários países do mundo para o tratamento das vítimas de ataques em massa por abelhas africanizadas. Alguns trabalhos já foram realizados na tentativa de produzir um soro antiveneno de abelhas, entretanto, pouco eficientes em termos de neutralização. Schumacher *et al* testaram anticorpos produzidos em coelhos imunizados com o veneno total, ou apenas com a melitina, e estes foram ineficientes na neutralização do veneno total.⁽³⁰⁾ Jones *et al* produziram um antiveneno F(ab) em ovelhas, o qual mostrou apenas o efeito positivo da neutralização da atividade fosfolipásica, sendo a produção de anticorpos específicos para a melitina. Além disso, os ensaios clínicos não seguiram adiante para comprovar sua eficácia.⁽³¹⁾

Frente à necessidade deste soro, uma iniciativa foi tomada para a produção deste produto no Brasil. A partir de uma colaboração entre o Instituto Butantan, o CEIS/IBRC-UNESP e o HC/INCOR iniciou-se o projeto “Anticorpos monoclonais e policlonais como ferramentas imunoterapêuticas: produção em larga escala e uso clínico”, que apresenta um sub-projeto intitulado: “Produção de Soro Antiveneno de Abelhas Melíferas”. Dentro desse sub-projeto foi produzido um soro hiperimune em eqüinos, antiveneno de abelhas, uma vez que o cavalo é o animal utilizado no Brasil para a produção de soros

antiofídicos, em função do seu manejo, boa resposta imunológica, excelente volume de plasma, longevidade e, principalmente, por ser um animal no qual ainda não foi identificada a presença de príons. O esquema de imunização consistiu em utilizar doses sub-letais em que os fenômenos fisiopatológicos do veneno não fossem observados. Cada ciclo de imunização consistiu de uma imunização com adjuvante e três imunizações, em presença de adjuvante ou não.(32)

O antiveneno produzido contra o veneno de *A. mellifera* africanizada serviu de instrumento de estudo de Santos, K. S. Pela primeira vez, neste trabalho foi demonstrada a soroneutralização das principais ações tóxicas do veneno total da abelha africanizada,(32) o que teve grande importância do ponto de vista social, tecnológico e científico para o país. Diante da eficácia do soro antiveneno, foi dado início à produção em larga escala para que os testes clínicos pudessem ser feitos. Apesar dos resultados positivos quanto à soroneutralização *in-vitro*, podemos considerar que o sucesso será completo somente quando for realizada a avaliação da eficácia do soro *in vivo*, a qual ocorre em ensaios clínicos que devem ser desenvolvidos por uma equipe médica capaz de atender a vítima em caso de qualquer complicação. Além de ensaios clínicos que antecedem a liberação do uso do antiveneno, esse produto pode ser alvo de outras investigações, tais como a avaliação da neutralização da ação tóxica de venenos de subespécies de *Apis mellifera* pelo soro antiveneno especificamente produzido para a abelha africanizada. Caso fosse demonstrada a neutralização desses venenos pelo soro produzido no

Brasil, nosso país poderia tornar-se um exportador do produto para diversas regiões do mundo onde acidentes com abelhas são frequentes.

2. Proteômica baseada em espectrometria de massas

2.1 Análise proteômica de venenos de abelha

Veneno de abelha tem sido utilizado há algum tempo em diversos estudos científicos por várias razões, entre elas: o interesse em conhecer melhor a composição bioquímica e, conseqüentemente, o mecanismo de ação das toxinas; a investigação de moléculas com potencial para utilização terapêutica; o interesse em encontrar tratamentos mais eficazes e específicos para acidentes que desencadeiem reações alérgicas tóxicas.

Algo já se sabe a respeito da composição dos venenos de abelhas como foi mencionado anteriormente na seção 1.3 deste trabalho. Entretanto, o proteoma de venenos animais, assim como qualquer outro proteoma em foco de investigação, tem sido facilitado cada vez mais devido ao surgimento de novos métodos analíticos e instrumentos altamente tecnológicos, com princípios específicos voltados para análises de interesse. Atualmente a abordagem proteômica está fortemente aliada à espectrometria de massas (MS), a qual consiste em uma estratégia analítica altamente específica e sensível.

O primeiro proteoma de veneno de abelha utilizando espectrometria de massas foi realizado por Peiren *et al* em 2005,(33) o qual combinou a eletroforese bidimensional e análise por espectrometria de massas em um equipamento do tipo MALDI-TOF/TOF. Este estudo identificou nove proteínas do veneno de abelhas europeias, sendo que seis dessas proteínas haviam sido descritas anteriormente,(34, 35) enquanto três foram identificadas pela primeira vez. Desde então, outros estudos focaram na identificação de novos componentes, principalmente moléculas pouco abundantes e, também, na caracterização estrutural e funcional das mesmas. Atualmente, doze proteínas do veneno de *Apis mellifera* são conhecidamente alergênicas, as quais pertencem à lista de alérgenos do Sub-Comitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional da Sociedade de Imunologia.(15)

Embora muitas pesquisas tenham contribuído para a caracterização do conteúdo de venenos de abelha, ainda não há nenhum trabalho científico disponível na literatura que tenha relatado o estudo do perfil protéico do veneno da abelha africanizada. Levando-se em conta a importância dessa subespécie de *Apis mellifera*, principalmente no Brasil e nas Américas, considerada a maior causadora de acidentes e prejuízos à saúde pública, este trabalho visou à caracterização do perfil protéico do veneno da abelha africanizada, além da comparação entre os venenos da abelha africanizada e de duas abelhas europeias (*Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera carnica*) através de uma análise quantitativa dos mesmos, a qual está mostrada adiante. Com o foco em identificar amplamente as proteínas do veneno, considerando prováveis novos componentes, e caracterizar propriedades físico-químicas desses, uma

abordagem proteômica baseada em espectrometria de massas foi aplicada, fazendo uso da mais moderna tecnologia disponível atualmente.

2.2 Espectrometria de massas

2.2.1 Preparação de amostra previamente à análise por espectrometria de massa

GeLC-MS/MS

A convencional análise de proteínas baseada em espectrometria de massas envolve digestão de extratos de proteínas em peptídeos passíveis de análise MS. Quando analisadas amostras biológicas altamente complexas, as quais podem conter de centenas a milhares de proteínas, o procedimento de pré-fracionamento pode ajudar significativamente a aumentar a profundidade da análise quando a mesma é realizada através de espectrometria de massas. Isto é devido ao fato de que a complexidade da amostra é minimizada através de várias aquisições LC-MS/MS. A estratégia frequentemente aplicada, conhecida como GeLC-MS/MS, consiste na separação de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de digestão das proteínas aprisionadas no gel com tripsina, extração dos peptídeos e análise dos mesmos através de LC-MS/MS.(36) É importante ressaltar que existe uma troca entre a extensão do fracionamento desejado e a duração do experimento. Quanto mais fragmentos

são obtidos, menor número de proteínas estará contido em cada um deles, e menor a complexidade da análise, permitindo maior sensibilidade e uma análise LC-MS/MS mais detalhada. Entretanto, cada pedaço de gel é analisado em aquisições independentes, acarretando em tempo de “uso de máquina” maior para analisar todos os fragmentos. Um dos benefícios do uso de SDS-PAGE é o tratamento imparcial de proteínas hidrofóbicas, as quais são perdidas na eletroforese bidimensional. Além disso, fornece um passo de limpeza, significando que diferentes reagentes químicos podem ser utilizados previamente no passo de preparação da amostra, não apresentando efeitos adversos na coluna de separação por fase reversa ou no poder de ionização dos peptídeos.(37)

Análise Shotgun

Em que pese a estratégia GeLC-MS/MS apresentar vantagens, como discutido anteriormente, a recuperação de um grande número de peptídeos originados da proteólise é dificultada uma vez que eles podem ficar presos na matriz do gel, podendo resultar em uma pobre cobertura de sequência.(38) Isto é crucial quando se deseja uma ampla caracterização da amostra e quando há procura de modificações pós-traducionais, em que a cobertura da sequência é extremamente necessária. *Shotgun* é o termo denominado para o método de análise de uma mistura protéica complexa sem uma separação prévia. Para amostras contendo nenhum detergente e de baixa a média complexidade,

digestão em solução pode ser a melhor escolha devido à elevada cobertura da amostra.(39) Esse método foi escolhido no presente trabalho por dois principais motivos: primeiramente, porque o objetivo do trabalho foi abranger o maior número possível de identificações de proteínas, conferindo uma completa caracterização do perfil protéico dos venenos de abelhas; segundo, porque outro objetivo foi buscar modificações pós-traducionais, as quais não foram identificadas em toxinas de venenos de abelhas até o presente momento.

Recentemente, com os avanços tecnológicos, esse tipo de abordagem tem substituído gradualmente a separação de proteínas em gel. A mistura de proteínas é submetida à digestão proteolítica em solução, a qual é diretamente injetada no cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas, onde ocorre uma separação dos peptídeos por fase reversa. Em seguida, os peptídeos são ionizados e sujeitos a sequenciamento MS/MS. Esse método recente tem sido facilitado pelo desenvolvimento de espectrômetros de massas capazes de adquirir milhares de espectros MS/MS ao longo de uma única análise LC-MS/MS; além de que muitas ferramentas têm sido desenvolvidas para ajudar na validação da identificação dos peptídeos e proteínas.(40) A confiança na identificação dos peptídeos pôde ser aumentada graças às medidas de massa de altíssima acurácia permitidas pelos atuais instrumentos, tais como FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*). (41) Instrumentos FT-ICR fornecem a maior acurácia na medida de massas, porém seu uso é restringido quando usado acoplado a técnicas de separação e aplicado a experimentos de larga escala. Alguns dos desafios eram o longo tempo na aquisição de dados MS/MS, assim como a alta variabilidade na produção de

íons através da separação cromatográfica. Estas dificuldades foram minimizadas com o desenvolvimento de um instrumento híbrido, LTQ FT, o qual apresenta um sistema “*ion-trap* linear” acoplado ao Orbitrap, que, por sua vez, permite a utilização do algoritmo “transformada de Fourier”, combinando medidas de alta acurácia com um desempenho de alta velocidade na aquisição de MS/MS.(42)

A análise *shotgun* de venenos de abelhas não foi realizada até os dias de hoje, porque a amostra sempre foi considerada complexa levando-se em conta a indisponibilidade de instrumentos para tal finalidade. Entretanto, a disponibilidade do Orbitrap Velos para a execução das análises deste trabalho favoreceu a escolha do método e a obtenção de resultados de alta qualidade e extremamente confiáveis. Orbitrap Velos é considerado atualmente um dos instrumentos mais sofisticados na área de espectrometria de massas, que está demonstrado adiante.

2.2.2 Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de massas

Apesar de a cromatografia líquida (LC) ser uma tecnologia que está disponível há muitas décadas, dois principais avanços mudaram sua aplicabilidade na proteômica. O primeiro foi a introdução do *electrospray* (ESI).(43) O princípio desta tecnologia consiste na formação de um *spray*, o qual deixa o cromatógrafo na fase líquida e entra no espectrômetro de massas na fase gasosa, graças à combinação de um nebulizador e uma voltagem

aplicada ao fim do capilar por onde atravessam os peptídeos. Deste modo, a carga elétrica de pequenas gotas do solvente supera a tensão superficial das gotas levando a consecutivas “explosões coulombicas” das mesmas em gotículas cada vez menores, liberando os analitos em fase gasosa como espécies carregadas. Esta tecnologia permitiu que uma grande variedade de moléculas fosse transferida para a fase gasosa sem fragmentação, incluindo moléculas extremamente grandes, tais como proteínas. O segundo principal avanço veio com a miniaturização do emissor ESI, o qual permitiu fluxos muito menores no LC assim como as quantidades de amostras, conferindo notável aumento na sensibilidade.(44, 45) Esta versão do ESI tornou-se mais tarde conhecida como nano-ESI e permanece atualmente como a base para análise proteômica LC-MS.

Seguramente, o tipo de experimento de proteômica mais popular é realizado pela abordagem chamada *bottom-up*, através da qual, inicialmente, uma amostra protéica é enzimaticamente digerida em peptídeos com o uso de uma protease, comumente a tripsina.(46) Deste modo, a complexidade da amostra é aumentada sendo que cada proteína gera múltiplos peptídeos. Apesar disso, é uma abordagem favorável uma vez que reduz a unidade analítica de proteína a peptídeo, o qual é mais passível à introdução à fase gasosa, apresenta relação massa/carga (m/z) melhor adequada às habilidades dos espectrômetros de massas, tem distribuição isotópica mais simplificada, levando a um bom espectro de fragmentação. Este, por sua vez, pode levar à identificação da proteína com maior facilidade, além de que a massa molecular de alta acurácia é um indicador de identidade mais confiável. Entretanto, o

aumento da complexidade introduzida por essa abordagem requer outro nível de separação, independente de um fracionamento a nível protéico previamente aplicado, antes que uma análise aprofundada possa ser realizada pelo espectrômetro de massas. Por essa razão, peptídeos são tipicamente separados por cromatografia de fase reversa.

A cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC), ao contrário da fase normal, é definida pelo uso de eluente hidrofílico combinado à fase estacionária hidrofóbica. Normalmente, cadeias longas de grupos metilênicos (C18) ligados a esferas de sílica são os materiais utilizados para o empacotamento da coluna (fase estacionária), enquanto água ou acetonitrila geralmente são os solventes utilizados (fase móvel). RP-HPLC separa peptídeos individuais de amostras complexas de acordo com a hidrofobicidade. A extensão da separação pode ser influenciada por muitos fatores, como a dimensão e a temperatura da coluna, o material de empacotamento da coluna, o tamanho da partícula do material, a composição do solvente, o fluxo do solvente, entre outros. As propriedades de hidrofobicidade do solvente são também ajustadas durante cada corrida variando-se o gradiente, o qual se refere ao aumento da concentração de um solvente *versus* o outro durante o curso de aquisição.(47)

Frequentemente, além da coluna principal, sistemas LC também fazem uso de pré-colunas. Neste caso, o analito é inicialmente retido na pré-coluna por alguns minutos para desalinização e limpeza antes do carregamento na coluna principal. Fisicamente, esse fenômeno ocorre devido à troca de válvulas, as quais redirecionam o fluxo do solvente de um injetor de amostra

através da pré-coluna até o descarte no primeiro caso (válvulas 1-2), e do nano-fluxo de solvente da pré-coluna até a coluna principal no segundo caso (válvulas 10-1), como mostrado na figura 1. Este passo resulta no aumento do tempo de vida da coluna principal de separação e aumenta o desempenho em termos de sensibilidade, devido à redução de contaminantes residentes da coluna e, em termos de resolução, sendo que o acúmulo de contaminantes e também analitos normais na coluna pode alterar suas propriedades físicas.

Figura 1 – Desenho esquemático da troca de válvulas do cromatógrafo líquido. O motor da válvula troca entre a conexão dos canais 1-2 e 10-1. As conexões vermelhas representam os canais das válvulas. As conexões amarelas representam a tubulação plástica dos capilares. Nano-fluxo é o principal gradiente de separação, o qual conecta diretamente o *electrospray* e a saída do MS quando a válvula se encontra na posição 1-2. O fluxo de carregamento é o alto fluxo da fase móvel que bombeia os analitos do injetor de amostra para o interior da pré-coluna quando a válvula está na posição 1-2. Quando a válvula troca para 10-1, o fluxo de carregamento segue em direção ao descarte, enquanto o nano-fluxo segue através da pré-coluna e da coluna principal em direção ao MS.

2.2.3 Espectrometria de massas de peptídeos

Os íons em fase gasosa que chegam diretamente da fonte *electrospray* acoplada ao cromatógrafo líquido são introduzidos no interior do espectrômetro de massas, o qual, essencialmente, mede o número de íons da razão massa-carga (m/z) de um analito, dentro de uma certa resolução, a qual é a mesma para todos os valores de m/z dentro de um limite funcional do instrumento utilizado. Este trabalho, assim como uma grande porção dos modernos estudos proteômicos, foi realizado usando um espectrômetro de massas Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Os princípios operacionais desta máquina, assim como a sua influência na análise de peptídeos, estão discutidos nas seções seguintes.

2.2.4 Espectrômetro de massas Orbitrap

O instrumento chamado Orbitrap é na verdade um híbrido de dois analisadores de massas. Os íons introduzidos a partir da fonte ESI, já em fase gasosa, são afunilados dentro do equipamento e conduzidos até um *ion trap* linear, que, por sua vez, transporta os íons através do *c-trap*. Deste, os íons passam para o real analisador de massas orbitrap, como mostrado pelo diagrama esquemático do instrumento apresentado na figura 2, obtida de Olsen *et al.*(42)

Figura 2 – Esquema do Orbitrap. Pacotes de íons introduzidos através da fonte ESI são armazenados pelo *ion trap* e enviados ao orbitrap para escaneamento dos precursores em alta resolução. Enquanto isso, novos pacotes de íons são novamente armazenados pelo *ion trap*, fragmentados em modo de aquisição dependente de dados baseado no escaneamento do íon precursor e medido por escaneamento MS/MS. Figura obtida de Olsen *et al.*(42)

Figura 3 – Visão de um corte transversal do analisador de massas Orbitrap. a) eletrodo central. b) eletrodo externo. c) anel de cerâmica separando o eletrodo externo em duas seções. Íons são representados pela trajetória vermelha onde eles giram ao redor do eletrodo central devido a força eletrostática atrativa e a força centrífuga inicial. Figura obtida de Scigelova e Makarov.(48)

A figura 3, obtida de Scigelova e Makarov,(48) representa o esquema do analisador de massas orbitrap. A energia inicial com a qual os íons são introduzidos no orbitrap gera uma força centrífuga que é balanceada pela força eletrostática atraindo os íons para o eletrodo central fazendo-os girar em trajetória espiral. O movimento axial dos íons ao longo do eletrodo central é dependente da sua razão massa-carga e as oscilações observadas entre as duas laterais do orbitrap, as quais são separadas entre si por um anel de cerâmica, são detectadas e Fourier transformadas, resultando em medida de m/z acurada.

2.2.5 Aquisição dependente de dados

Existem muitos modos operacionais disponíveis, porém o mais comum aplicado à proteômica é o uso do *ion trap* para fragmentação induzida por colisão dissociada (CID – *Collision Induced Dissociation*) e medida de vários MS/MS (MS a nível 2) de baixa resolução, enquanto a medida de alta resolução de apenas um íon precursor é simultaneamente realizado dentro do orbitrap. Os *scans* MS/MS são adquiridos usando-se a chamada “aquisição dependente de dados” (DDA – *Data-Dependent Acquisition*), pela qual x íons precursores mais intensos, vindos do *scan* de íon precursor prévio, são isolados, fragmentados e seus fragmentos medidos no *ion trap*. Um precursor é determinado baseado em sua distribuição isotópica, a qual permite a determinação do estado de carga do íon. Tipicamente, apenas íons

duplamente carregados ou carregados com mais cargas são escolhidos para fragmentação. Este processo é apresentado na figura 4, onde os íons precursores dos quatro peptídeos mais intensos são fragmentados. Uma vez fragmentados, valores de m/z são colocados em uma lista de exclusão dinâmica (*dynamic exclusion list*) por certo período de tempo para que eles não sejam analisados novamente e para que permita a fragmentação de íons precursores de baixa abundância no ciclo sucessivo de DDA.

A aquisição simultânea de ambos MS e MS/MS oferecem uma significativa vantagem na velocidade, sendo que mais *scans* de ambos os níveis podem ser adquiridos durante o gradiente LC. Mais *scans* MS/MS naturalmente resultarão em mais peptídeos identificados e mais *scans* MS resultarão em mais sensibilidade, conseqüentemente, mais perfis peptídicos quantitativos confiáveis. Outra vantagem relevante do sistema Orbitrap é sua incrível alta resolução m/z , a qual é extremamente importante quando gera informação quantitativa para muitos peptídeos que podem estar simultaneamente presentes em um dado tempo durante o gradiente LC.

Figura 4 – Aquisição dependente de dados. Neste esquema, os dois íons precursores mais intensos de dois peptídeos (destacados nos círculos azul e verde) do *scan MS¹* são visualizados como dois espectros de fragmentação MS/MS, enquanto as caixas em forma de seta representam a seleção dos quatro íons precursores mais intensos a serem fragmentados.

2.2.6 Fragmentação de peptídeos

Quando um íon de um peptídeo é isolado e fragmentado, os fragmentos resultantes do *scan MS/MS* são usados como base para a identificação deste peptídeo. Existem diversas técnicas de fragmentação de peptídeos que podem ser utilizadas na moderna espectrometria de massas, tais como *collision induced dissociation* (CID), *higher-energy collision dissociation* (HCD) e, *electron transfer dissociation* (ETD), para citar algumas, cada uma delas produzindo diferentes fragmentos. Além disso, a sequência primária e o estado de carga do peptídeo podem influenciar os tipos de fragmentos gerados. A

figura 5 mostra os principais modos pelos quais um peptídeo pode ser fragmentado.(49) A técnica mais comumente usada para fragmentar cadeias polipeptídicas, especialmente em conjunto com instrumentos Orbitrap, é CID, a qual foi utilizada neste trabalho. Através de CID, os peptídeos geralmente são fragmentados em íons das séries *-a*, *-b* e *-y*, os quais podem adicionalmente perder amônia ou água.(50)

Figura 5 – Padrão de fragmentação do peptídeo. Durante experimentos MS/MS, peptídeos podem ser fragmentados em diferentes partes para produzir diferentes séries de íons. Figura obtida de página da internet Matrix Science.(49)

2.2.7 Identificação do peptídeo a partir do espectro de fragmentação

A identificação de peptídeos é um passo de processamento de dados fundamental exigida pela proteômica baseada em espectrometria de massas.(51) Existem muitas estratégias para interpretação de espectros MS/MS e a assinatura de sequências para íons precursores de peptídeos. A primeira delas é conhecida como interpretação *denovo*, pela qual não se faz

uso de nenhuma informação, a não ser aquela vinda do espectro MS/MS. Neste caso, o algoritmo combina a distância entre picos com a massa dos aminoácidos em uma tentativa de reconstruir a série de íons. A partir disso, toda ou parte da sequência pode ser obtida dependendo da qualidade do espectro inicial. A segunda abordagem, referida como a comparação de dados com os espectros do banco de dados, envolve a confrontação de espectros MS/MS experimentais com aqueles espectros experimentais anteriormente coletados e anotados e depositados em um banco de dados. Por fim, a outra estratégia refere-se à confrontação de sequências de bancos de dados, que é muito similar à abordagem anterior. Porém, ao invés de usar espectros coletados anteriormente, o algoritmo se baseia no conhecimento do padrão de fragmentação peptídica e simula espectros baseados em bancos de dados com as sequências das proteínas.

A estratégia utilizada neste trabalho, cujo uso é o mais comum, é a última citada, de confrontação de sequências com o banco de dados. Para isso existem diversos programas disponíveis, os quais desempenham essa etapa do processamento: Mascot (Matrix Science, London, UK); Protein Pilot (AB Sciex, Foster city, California), Sequest,⁽⁵²⁾ OMSSA,⁽⁵³⁾ e Andromeda,⁽⁵⁴⁾ para citar alguns. Cada um difere na consideração dos detalhes da clivagem enzimática da proteína, fragmentação do peptídeo, técnica de fragmentação (CID, HCD, etc) e escores estatísticos, porém todos eles compartilham a mesma estratégia. Essencialmente, o algoritmo realiza a digestão enzimática da proteína *in silico* para gerar todos os possíveis peptídeos de todas as proteínas fornecidas pelo banco de dados e, baseado nos padrões de

fragmentação mais conhecidos, ele gera um espectro de fragmentação teórico para cada peptídeo contendo todos os possíveis fragmentos. Dado que a massa do precursor experimental reconhece a massa teórica do peptídeo dentro de certa tolerância, o algoritmo procede ao reconhecimento dos picos experimentais a partir da comparação com os fragmentos peptídicos teóricos e, por fim, gera um escore para avaliar o número e a qualidade de confrontações reconhecidas.

3. Proteômica quantitativa

3.1 Técnicas Quantitativas para Espectrometria de Massas

De acordo com Pandey e Mann *et al*(55), a proteômica é definida como o estudo em larga escala de proteínas, significando que muitas proteínas são analisadas simultaneamente. Um estudo de proteoma pode envolver não apenas a análise de proteínas em larga escala, mas também análise de modificações pós-traducionais e estudo de interações proteína-proteína. Porém, o recente foco da proteômica tem sido a análise quantitativa de proteínas comparando-se diferentes grupos ou estados de sistemas biológicos. Por exemplo, um estudo pode focar na análise quantitativa de um organismo do tipo selvagem comparado ao mutante, a fim de determinar mudanças a nível protéico que podem ocorrer como resultado da mutação. Isto poderia então

gerar informação para a elucidação de funções de proteínas que mudam dentro de um sistema biológico.

Até recentemente, a proteômica era sinônimo de gel de eletroforese bidimensional,(55) que permitiu a separação de centenas de proteínas e a diferenciação quantitativa através da análise de *spots*. Entretanto, era bastante trabalhosa a identificação de *spots* no gel e sua quantificação, devido a problemas intrínsecos às técnicas disponíveis. Os avanços na instrumentação de espectrometria de massas, combinados com a recente disponibilidade de genomas sequenciados e a descoberta de técnicas de ionização mais suaves, tais como MALDI(56, 57) e ESI(58), culminaram em uma nova geração de pesquisa proteômica. Usando a espectrometria de massas, agora é possível identificar e quantificar milhares de proteínas dentro de um único experimento.

A espectrometria de massas oferece uma grande variedade de técnicas de quantificação de proteínas, sendo quase todas aplicáveis com base na quantificação de peptídeos provenientes de digestão com tripsina.(59, 60) Para quantificar peptídeos, sequências homólogas marcadas com isótopos estáveis são usadas como padrão interno em técnicas como *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC)(61) e Super-SILAC(62), *Isobaric tag for relative and absolute quantification* (iTRAQ)(63), *Isotope-coded affinity tags* (ICAT)(64) e *Absolute quantification* (AQUA)(65), nas quais os sinais dos peptídeos são diretamente comparados dentro de uma mesma aquisição LC-MS/MS. O efeito resultante é mostrado na figura 6, onde o padrão isotópico de um peptídeo identificado como STGPTAATGSNR é visto duas vezes dentro do mesmo espectro MS¹, obtido de Gevaert *et al*(66). Uma das duas amostras

comparadas foi marcada com arginina pesada. Este espectro mostra o sinal isotópico do peptídeo, o qual apresenta a massa deslocada de 3 Da entre o sinal vindo da primeira amostra e o sinal vindo da segunda, a qual é a amostra marcada com o isótopo estável. Dado que as intensidades dos sinais dos dois peptídeos são as mesmas, a razão quantitativa resultante deveria ser grosseiramente um, indicando que não há diferença entre ambos.

Figura 6 – Quantificação baseada em peptídeos marcados com isótopos estáveis. O eixo y indica a intensidade normalizada. O espectro foi obtido de Gevaert *et al.*(66)

Para esclarecer o princípio de quantificação baseada em marcação isobárica da amostra com isótopos estáveis, uma das estratégias citadas acima está mostrada adiante. A técnica iTRAQ, primeiramente relatada por Ross *et al.*, (63) envolve a modificação de peptídeos usando reagentes de marcação química. A técnica é baseada na ligação covalente de marcadores com diferentes pesos moleculares à porção N-terminal e grupos amina de cadeias

laterais de peptídeos, os quais são provenientes de digestão protéica. A figura 7 ilustra a estrutura química do marcador com os componentes que podem variar, possibilitando seu uso como quatro diferentes marcadores. Os componentes da molécula são o grupo reativo, o qual se liga à cadeia peptídica covalentemente; o grupo descritor, o qual pode ter os átomos de C e N substituídos pelos isótopos C^{13} e N^{15} ; e o grupo de balanço, o qual pode ter os átomos de C e O substituídos pelos isótopos C^{13} e O^{18} . As massas dos grupos descritor e de balanço variam individualmente, de 114 a 117 Da e de 31 a 28 Da, respectivamente, porém totalizam a massa final de 145. A constância da massa caracteriza tal marcação, além de isotópica, isobárica.

Figura 7 – Componentes dos marcadores isobáricos usados em iTRAQ. A molécula completa consiste de um grupo descritor, um grupo de balanço e um grupo reativo, o qual se liga à cadeia peptídica. A massa total do marcador é mantida constante, caracterizando-o como marcador isobárico, através do uso dos átomos isótopos C^{13} , N^{15} e O^{18} . O grupo descritor varia em m/z de 114,1 a 117,1 enquanto o grupo de balanço varia a massa de 31 a 28 Da, fazendo com que a massa das quatro combinações permaneça constante (145,1Da).

Além da coeluição dos peptídeos, a principal vantagem do iTRAQ é a mistura de várias amostras, as quais podem ser marcadas prévia e juntamente com diferentes marcadores, como mostrado na figura 8, a qual foi adaptada da página de internet de Broad Institute.(67)

Figura 8 – Esquema de quantificação por iTRAQ. Amostras são enzimaticamente digeridas, marcadas com reagentes iTRAQ e combinadas anteriormente às análises LC-MS/MS. A quantificação dos peptídeos resulta da comparação das intensidades dos íons descritores (vistos como os picos coloridos no espectro MS/MS) enquanto a identificação dos peptídeos resulta das séries de íons das cadeias de peptídeos fragmentos (vistos como picos pretos no espectro MS/MS).

A análise de todas as amostras ao mesmo tempo, em uma mesma aquisição LC-MS/MS, poupa horas de uso de máquina. Apesar dessa grande vantagem, o método também apresenta desvantagens, como a variabilidade na extensão da reação química, a qual pode criar vieses na quantificação, assim como a incompatibilidade dos marcadores com outros reagentes químicos usados na preparação da amostra.(68)

As estratégias de marcação isotópica têm sido tradicionalmente escolhidas porque são menos afetadas por fatores comuns ao LC-MS, como variação do tempo de retenção, supressão iônica, estabilidade do *spray*, entre outras. Com AQUA ou QCAT é ainda possível estimar a quantidade absoluta de proteínas, uma vez que as quantidades molares de peptídeos sintéticos (AQUA) e as quantidades de proteína recombinante (*Concatenated quantitative peptides* - QCAT) são conhecidas.

Embora essas técnicas estejam razoavelmente bem estabelecidas, existem diversas razões que as tornam não muito valorosas. Em geral, todas essas razões confrontam a relação custo-benefício e a flexibilidade do experimento. Por isso, a abordagem da quantificação livre de marcação tem se tornado cada vez mais popular e aplicável a diferentes tipos de análises e experimentos. No caso deste trabalho, tanto pelas vantagens que a técnica oferece, quanto pelo fato de que o proteoma em estudo trata-se de um fluido e não célula ou tecido, a quantificação livre de marcação foi a técnica escolhida.

A abordagem de quantificação livre de marcação baseada em *Extracted Ion Chromatogram* (XIC), possibilitada pelo recente avanço de algoritmos e melhoria na instrumentação da espectrometria de massas, substituiu

trabalhosas e custosas etapas bioquímicas por procedimentos de bioinformática.(69-71) Nesta abordagem, cada amostra é medida em aquisições LC-MS/MS independentes e as intensidades de cada distribuição isotópica característica de um peptídeo são integradas ao longo do tempo de eluição cromatográfica e consideradas como “*features*” quantitativos. Os “*features*”, aqui chamados fatores, são alinhados entre diferentes aquisições a partir do uso das massas acuradas considerando-se o possível deslocamento de massa. O resultado é um mapa mestre com todos os fatores referentes às intensidades reportadas ao longo de um número teórico ilimitado de aquisições. A abundância desses fatores comparados entre corridas cromatográficas revela diferenças relativas entre quantidades de peptídeos. As sequências de peptídeos obtidos do espectro MS/MS vindos do banco de dados são cruzadas com o mapa mestre.

Misturas de proteínas de qualquer origem são diretamente analisadas de modo tecnicamente idêntico, o que torna o método atrativo para quantificar o proteoma de tecidos individuais ou organismos inteiros.(72, 73) Programas tais como SuperHirn,(74) OpenMS(75), MaxQuant(76), Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) e Elucidator (Rosetta Biosoftware, Cambridge, MA), entre outros, são capazes de executar as etapas essenciais de processamento de dados. A figura 9, obtida e modificada de Zhu *et al*,(77) destaca as diferenças gerais entre as abordagens de quantificação livre de marcação e baseada em marcação. A figura 9 (a) mostra o fluxo de trabalho geral quando usado isótopos marcados e 9 (b) mostra o fluxo de trabalho quando usada a abordagem livre de marcação.

Figura 9 – Esquema da análise proteômica quantitativa baseada em marcação *versus* sem marcação. (a) Fluxo de trabalho quando usada a abordagem baseada em marcação com isótopos estáveis. (b) Fluxo de trabalho quando usada a abordagem livre de marcação, a qual também pode estar relacionada a contagem de espectros como uma estratégia de análise quantitativa. Figura modificada de Zhu *et al.*(77)

3.2 Quantificação livre de marcação (*Label-free quantification*)

De um modo geral, todas as estratégias de marcação com isótopos conflitam com eficiência ou flexibilidade em termos do que pode ser analisado. Por outro lado, a recente abordagem desenvolvida de quantificação *label-free* baseada em XIC possibilita análises acuradas de amostras de qualquer

origem.(69-71) Neste aspecto, essa abordagem não se diferencia muito das estratégias baseadas em marcação, nas quais a diferença relativa constatada de certa proteína vem de uma comparação da intensidade do sinal MS¹ entre os peptídeos correspondentes. A fundamental diferença é que através da abordagem *label-free*, cada amostra é analisada em aquisições LC-MS/MS individuais e a abundância dos peptídeos deve ser alinhada entre as diferentes corridas para considerar as discrepâncias cromatográficas do tempo de retenção, as quais são devidas ao fato de que um mesmo peptídeo não está presente em um mesmo *scan* MS¹.

O termo “*feature*” frequentemente aplica-se a um contexto de quantificação protéica baseada em espectrometria de massas, especialmente quando abordada a estratégia *label-free*. Em virtude da dificuldade em encontrar a exata palavra que represente o termo, “*feature*” será chamado neste trabalho “fator”, o qual é um potencial sinal de um peptídeo integrado ao longo de todos os seus tempos de retenção durante a cromatografia em cada aquisição LC-MS/MS e alinhado em todas as aquisições. Algoritmos de processamento de dados de quantificação *label-free* trabalham através de várias etapas para gerar um mapa de fatores, no qual estão listados todos os fatores detectados. Primeiro, considerando cada aquisição, independentemente, distribuições isotópicas de peptídeos são detectadas dentro de cada *scan* MS¹. Um esquema representativo de uma distribuição isotópica é dado na figura 10. Os sinais mostrados em vermelho seguem um nítido padrão isotópico que é característico de peptídeos, dependendo da sua sequência de aminoácidos. Sinais experimentais de cada *scan* MS¹ são

juntamente arranjados em grupos de isótopos potenciais e, então, comparados à distribuição isotópica teoricamente gerada ou à distribuição medida de peptídeos puros dentro de certo intervalo de m/z . Uma vez estabelecidas as distribuições, o algoritmo irá basicamente continuar com apenas a massa monoisotópica de cada distribuição. Este pode ser tanto o primeiro sinal do padrão, como a soma de todos os sinais. Essas massas monoisotópicas são então juntamente arranjadas entre os *scans* MS^1 de cada aquisição em um fator preliminar. A versão madura (processada) desse fator é estabelecida na medida em que as massas monoisotópicas são integradas ao longo do tempo de retenção cromatográfico num valor de área. Esta tarefa é realizada para cada aquisição independentemente até que uma lista de fatores com as áreas integradas é gerada.

Figura 10 – Distribuição isotópica característica de um peptídeo em MS^1 . Podem existir muitos sinais de peptídeos ao longo do intervalo de m/z de um *scan* MS^1 qualquer. Este esquema exemplifica uma distribuição isotópica de um peptídeo (mostrada em vermelho). Os sinais mostrados em preto (ruído, espécies carregadas com uma carga) não representam distribuições isotópicas de peptídeos.

Os fatores maduros de cada aquisição são então alinhados com cada um dos outros de acordo com a massa, tempo de retenção e número do *scan*, assumindo-se o possível deslocamento do tempo de retenção. Isto pode ser visto na figura 11, a qual representa um esquema de XIC.

Figura 11 – *Extracted-ion chromatogram* (XIC) de um peptídeo vindo de duas aquisições individuais. Os pontos vermelhos representam a intensidade dos sinais monoisotópicos de uma distribuição isotópica detectada em um *scan* MS¹ individual.

Na representação do XIC está mostrada a massa monoisotópica de um peptídeo seguido ao longo do tempo de retenção de uma aquisição inteira e alinhada entre duas aquisições diferentes. Isso resulta em um mapa mestre de fatores finais, cada um dos quais abrangendo uma massa média, um tempo de retenção centralizado, uma carga e uma área, reportados para cada aquisição na qual o fator foi encontrado e um valor de zero para as aquisições nas quais o fator não foi encontrado.

3.3 Quantificação *label-free* de venenos de abelha

Levando-se em conta o fato de que nenhuma análise quantitativa baseada em espectrometria de massas foi realizada com venenos de abelhas, decidimos fazê-la uma vez que as informações obtidas podem contribuir para o entendimento das semelhanças e diferenças apresentadas pelos venenos de diferentes subespécies de *A. mellifera*. O trabalho foi realizado em várias etapas, sendo a etapa de processamento de dados muito importante, primando-se por obter a diferença quantitativa estatisticamente significativa. Essa etapa de processamento de dados foi realizada com auxílio dos programas SuperHirn(74), Trans Proteomic Pipeline(78) e DanteR.(79) SuperHirn tem sido bastante utilizado em estudos quantitativos e está discutido em maiores detalhes na seção 3.4. Trans Proteomic Pipeline também tem o uso bastante popularizado e, por fim, DanteR é um programa de análise estatística diretamente voltado a análises proteômicas.

Considerando que venenos de abelha são substâncias secretadas da glândula produtora de veneno, a abordagem de quantificação *label-free* é a opção mais apropriada. A principal vantagem consiste no fato de que a etapa de preparação da amostra é muito mais simplificada e os custos são muito menores, especialmente quando comparado aos tipos de quantificação baseados em marcação, os quais exigem etapas de eliminação de quaisquer metabólitos e preparação bioquímica da amostra, além de serem mais custosos.

3.4 SuperHirn

As quantificações realizadas neste trabalho foram baseadas no uso do programa SuperHirn. Este programa tem sido bastante utilizado em estudos de quantificação protéica, sendo um dos primeiros elaborados especificamente para instrumentos de alta resolução. A versão original foi desenvolvida em linguagem de programação C++ e compilada para Linux e Max OS X. O programa usa um arquivo texto para os parâmetros customizados, incluindo localização da pasta de armazenamento dos dados de aquisição requeridos, tais como mzXML e dados de identificação pep.xml. O programa é conhecido por nomear os comandos “FE” para *feature extraction*, “BT” para *build similarity tree* e, “CM” para *create master map*. O programa disponibiliza também vários outros comandos, incluindo normalização das intensidades e arranjo dos perfis de fatores, sendo que esses não se aplicam ao presente trabalho.

A primeira etapa do processamento envolveu a extração dos fatores de cada aquisição LC-MS/MS carregadas. Isso envolve a detecção de padrões isotópicos de cada potencial peptídeo, o arranjo dos padrões isotópicos em fatores, a integração da área dos fatores, a determinação de outras propriedades como tempo de retenção inicial e final e o mapa pep.xml formatado com dados de identificação MS² para os fatores MS¹. Toda essa informação é estocada em arquivos XML para uso futuro.

Usando os fatores extraídos de cada aquisição individual, atribui-se um escore de similaridade a todos os pares vindos das diferentes aquisições, a fim de indicar a ordem pelas quais as aquisições devem ser alinhadas. O escore de similaridade é gerado pela realização de um alinhamento prévio de cada par de aquisições; em seguida, aplica-se uma fórmula baseada no número de fatores compartilhados e suas intensidades ordenadas. Usando os escores, SuperHirn constrói uma árvore de similaridade na qual as aquisições mais semelhantes são alinhadas juntamente em modo sucessivo, o que consiste essencialmente no arranjo hierárquico das aquisições. Cada par de aquisições é combinado e transformado em uma nova aquisição temporária durante o alinhamento; valores de m/z são obtidos a partir da média dos fatores adquiridos, assim como os tempos de retenção de cada estágio. Por isso, o procedimento de alinhamento acurado é possível a partir das aquisições mais similares. Uma vez completo o alinhamento, todos os fatores são armazenados num arquivo texto conhecido como mapa mestre, o qual fornece os valores de m/z , tempo de retenção, carga, sequência do peptídeo, probabilidade de

identificação do peptídeo e intensidades através da aquisição alinhada para cada fator.

Um dos principais destaques de SuperHirn é sua capacidade de desempenhar a extração dos fatores e alinhamento das aquisições somente baseado na informação de MS¹. Isto separa a quantificação de peptídeos da identificação, o que permite enormemente a flexibilidade do experimento e possibilita novas estratégias, tais como:

- **Quantificação sem fragmentação.** Uma estratégia raramente usada, porém possível. Caracteriza-se pelo uso da abordagem de combinação de sequências do banco de dados para construir um banco de dados da massa acurada e tempo de retenção dos fragmentos de cada peptídeo identificado. Deste modo, experimentos futuros necessitam apenas da confrontação dos fragmentos de cada fator quantitativo proveniente do SuperHirn com os fatores armazenados no banco de dados construído previamente.

- **Compartilhamento de identificações de peptídeos através dos fatores alinhados.** Uma vez que o fator é alinhado através de todas as aquisições, a melhor identificação baseada em MS², vinda de qualquer uma das aquisições, é usada como uma informação de anotação da sequência do peptídeo para esse fator. Devido às limitações técnicas da instrumentação utilizada, à fragmentação preferencial dos íons precursores abundantes durante experimentos de aquisições dependente de dados e à baixa qualidade de fragmentação de determinados peptídeos, existe uma consistente sub-

amostragem de peptídeos vindos de misturas complexas, levando a baixas taxas de identificação. Por causa disso, é bastante comum que um peptídeo que esteja presente de fato em todas as aquisições seja identificado em apenas uma aquisição. Entretanto, o compartilhamento da informação desta identificação possibilita futuras considerações a respeito desse peptídeo, as quais poderiam, pelo contrário, ser desconsideradas.

- **Experimentos de fragmentação abrangente.** Novamente, devido à natureza da plataforma tecnológica, cerca de apenas 10% dos fatores quantitativos extraídos das aquisições são anotados com informação de sequência,⁽⁷⁴⁾ significando que 90% de sinais parecidos com peptídeos, multiplamente carregados, permanecem não identificados. No entanto, se uma identificação abrangente de todos os sinais de peptídeos é desejada, é possível simplesmente copiar valores de m/z e tempo de retenção de todos os fatores não identificados do mapa mestre vindo do SuperHirn na lista de inclusão do Orbitrap de fragmentação dirigida em aquisições sucessivas de uma mesma amostra.

- **Direcionando para modificações pós-traducionais.** Relacionado ao ponto anterior, é possível calcular as massas teóricas de peptídeos pós-traducionalmente modificados e buscá-los dentro das massas de fatores não identificados. Isto permite a geração de uma lista de inclusão de peptídeos potencialmente modificados para aquisições subsequentes de uma mesma amostra.

A versão original de SuperHirn não está livre de limitações. A utilização é muito limitada pelo fato de que não se aplica a plataformas da Microsoft Windows, especialmente porque o software de espectrometria de massas da Thermo Fisher Scientific é apenas aplicável a esta plataforma. Outra limitação é a falta de uma interface gráfica com o usuário, o que possibilitaria a utilização por usuários casuais. Além disso, existem ainda muitas outras variáveis que podem ser questionáveis quanto ao desempenho do software, mas nem por isso invalidam a utilização do mesmo, uma vez que todos os softwares disponíveis apresentam limitações.

3.5 Procedimentos Estatísticos

3.5.1 “*False Discovery Rate*” da identificação de peptídeos

Cada experimento LC-MS/MS pode gerar centenas de espectros MS/MS, sendo todos eles conflitados com bancos de dados contendo dezenas de milhares de proteínas. Devido à magnitude do espaço de busca, um número potencialmente alto de identificações de peptídeos pode ser falso-positivo. Este problema tornou-se uma área de pesquisa independente, com muitas soluções propostas, tais como nos trabalhos de Elias e Gygi,(80) Spirin *et al*,(81) e Nesvizhskii *et al*,(82) para citar alguns. O crescente foco em padrões de qualidade dentro da área de proteômica fez crescer a importância do chamado

“*false discovery rate*” (FDR) da identificação em todas as novas publicações em proteômica.(83)

Mascot, o algoritmo usado neste trabalho para a identificação dos peptídeos, fornece um FDR estimado baseado no uso da função “*decoy*” do banco de dados. Essa abordagem envolve a confrontação de espectros MS/MS experimentais com o banco de dados sem sentido e equivalente em tamanho ao banco de dados de sequências de proteínas usado. Na prática, esse banco de dados falso ou sem sentido (*decoy*) é usualmente o reverso do banco de dados usado originalmente. Qualquer correspondência para o banco de dados *decoy* deve ocorrer puramente por chance, sendo então o número de correspondências usado para calcular o FDR do experimento. Mascot define o FDR como um número de correspondências falsas acima do limiar de identificação dividido pelo número de correspondências reais acima do limiar de identificação.

É possível ajustar o FDR para qualquer valor desejado alterando o parâmetro de limiar de significância fornecido pelo Mascot. Isso gera um limiar de identificação para cada peptídeo, o qual é usado como um corte de *ion score*. Peptídeos que apresentem *ion score* maiores do que o limiar de identificação são considerados significantes dentro do âmbito do FDR desejado pelo usuário, o qual tipicamente é 1% ou 5%. Como descrito na seção intitulada “Métodos”, o FDR utilizado neste trabalho consistiu de 5%.

3.5.2 Normalização dos dados

A normalização dos dados é de especial importância para quantificação *label-free*, na qual as amostras são processadas de modo completamente independente, o que potencialmente gera bastante variação técnica quando comparada com estratégias baseadas em marcação. No último caso, peptídeos idênticos são coeluídos e estão sempre presentes no mesmo *scan* MS¹. Isto quer dizer que quaisquer variabilidades técnicas, como supressão iônica de amostras, instabilidade do eletrospray, sob ou sobre enchimento de íons no orbitrap, entre outros, afetam igualmente as sequências idênticas de peptídeos, preservando então sua razão quantitativa. Esta conduta customizada para quantificação *label-free* desenvolvida neste trabalho envolve dois estágios de normalização de dados no nível de peptídeos, cada um dos quais compensando diferentes efeitos.

- **Transformação logarítmica.** Estatística inferencial é usada para avaliar hipóteses baseadas na estimativa de parâmetros modelo dos dados experimentais. Estatística paramétrica representa uma variedade de estatísticas inferenciais, as quais assumem, *a priori*, certo modelo, enquanto estatísticas não paramétricas são aquelas que não assumem nenhum modelo. Estatísticas inferenciais paramétricas são geralmente consideradas mais poderosas do que as correspondentes não paramétricas, dado que as suposições permitindo o uso de estatísticas paramétricas podem ser totalmente cumpridas.⁽⁸⁴⁾ A fim de fazer os testes estatísticos paramétricos, tais como

teste *t* ou análise de variância (ANOVA), deve-se assegurar a normalidade do conjunto de dados. Para dados que não convergem naturalmente para uma distribuição normal, é possível atingi-la através da aplicação da função de transformação. Para intensidades de peptídeos *label-free*, a transformação logarítmica na base 2 é capaz de estruturar perfeitamente a distribuição dentro de uma distribuição Gaussiana.

• **Normalização baseada na somatória da intensidade total.** Para quantificação de proteínas, a preparação da amostra deve ser iniciada com uma quantidade igual de proteína para cada amostra, o que pode ser facilmente estabelecido pela utilização de métodos de quantificação como BCA(85) ou Bradford.(86) No entanto, devido à variabilidade dessas medidas, a potencial perda de proteínas intrínseca e as variabilidades inerentes à plataforma tecnológica, a quantidade total de proteína de cada amostra “vista” pela espectrometria de massas pode variar. Para corrigir tais variações no carregamento de proteínas totais existem vários procedimentos de normalização a serem escolhidos, tais como subtração da média, regressão linear, regressão não-linear.(87, 88)

Como o desempenho de cada procedimento de normalização depende da natureza da amostra e da variabilidade entre os dados medidos para cada amostra, não há escolha certa. Os experimentos deste trabalho lidaram com amostras originadas de venenos de abelhas eletricamente coletados e posteriormente armazenados e amostras quantificadas por BCA; por isso escolhemos a normalização baseada na somatória da intensidade dos íons

totais. Primeiro foi feita a divisão da intensidade total dos íons de cada amostra pela intensidade total dos íons de todas as amostras, gerando um fator de correção a ser usado no próximo passo. Em seguida, cada valor de intensidade de todos os íons-fragmentos identificando um peptídeo foi dividido pelo fator de correção obtido da divisão anterior. Essa escolha foi tomada visando transparência e simplicidade.

3.5.3 Avaliação das diferenças quantitativas no nível de proteína

Variabilidade é um componente inevitável de cada experimento e um conceito central para análises estatísticas. Espécimes biológicos têm variabilidade genética e ambiental natural. Métodos de preparação da amostra e aquisição de dados variam de acordo com a acurácia instrumental e ambiental e a manipulação humana. Análises estatísticas inferenciais de dados experimentais objetivam a determinação da factibilidade das diferenças observadas ocorrerem por chance, considerando a variabilidade dos dados baseados em uma suposição *a priori* de certo modelo, no caso de estatística paramétrica, ou sem nenhuma suposição do modelo, no caso de estatística não paramétrica.

Para ter acesso à significância da alteração na quantidade de uma proteína medida, a análise estatística deve ser procedida. Isto é comumente realizado obtendo-se a média dos sinais de peptídeos agrupados para representar cada proteína e subsequentemente aplicando-se o teste *t*. Este

procedimento compara a média da intensidade de uma proteína de duas replicatas entre duas amostras, ao mesmo tempo em que considera a variabilidade entre as replicatas. No entanto, aplicar um simples teste t não é a solução ideal por duas razões: se existem mais do que duas amostras sendo comparadas, o teste t deve ser aplicado individualmente para cada combinação de amostras, na medida em que, obtendo-se a média dos sinais dos peptídeos para representar a abundância da proteína, a variabilidade dos sinais dos peptídeos é perdida. Por essas razões, nós aplicamos o modelo de análise de variância (ANOVA), como descrito em trabalhos tais como Clough *et al*(89) e Karpievitch *et al*(90) e como implementado em DanteR.

O teste ANOVA é um procedimento estatístico paramétrico que permite a comparação de qualquer número de amostras dentro de um grupo em um único teste e, ainda, é capaz de incorporar a variabilidade de qualquer número de fatores incluindo replicatas técnicas, replicatas biológicas, e até mesmo sinais de peptídeos múltiplos que constituem cada proteína. Isto pode ser visto no esquema apresentado pela figura 12, onde o teste t (12a) é mostrado considerando a variabilidade de medidas duplicadas entre duas amostras, enquanto em 12b, ANOVA é mostrada considerando a variabilidade entre as duplicatas e três sinais de peptídeos.

(a) Teste t aplicado para uma proteína

(b) ANOVA aplicada para uma proteína

Figura 12 – Comparação do teste t e ANOVA para obter a significância estatística. Os esquemas mostram como o modelo ANOVA (b) é capaz de fatoriar a variância vinda das intensidades medidas dos peptídeos assim como a variabilidade das duplicatas, enquanto o teste t (a) usa o valor médio dos peptídeos como um dado de entrada e apenas considera a variabilidade entre as duplicatas.

A habilidade de considerar a variabilidade de muitos fatores leva a um grande poder estatístico quando analisada a quantidade diferencial. Simplificando, diferenças sutis na quantidade de proteína entre uma proteína medida em duas amostras podem ser detectadas usando ANOVA. Esta vantagem pode ser explicada intuitivamente: no caso em que uma proteína cujos peptídeos constituintes apresentam a mesma quantidade diferencial entre duas amostras, isso resulta em maior confiança estatística; no caso de uma proteína cujos peptídeos constituintes apresentam quantidade diferencial completamente distinta, isso expressa o grau de influência da variabilidade de cada fator.

Realizar o teste estatístico para cada proteína pode levar a centenas ou milhares de testes dependendo da complexidade da amostra analisada. Se usado o comumente aceitável limiar de significância de 5%, isto levará a um enorme número de falsos-positivos. Este efeito pode ser sanado através do procedimento de correção de teste múltiplo. Talvez o mais famoso deles seja a correção Bonferroni.(91) De acordo com esse procedimento, o limiar de significância é dividido pelo número de testes realizados, resultando em um corte extremamente restritivo. Isto pode ainda ser aplicado a situações onde é fortemente importante para evitar qualquer resultado falso-positivo, mas na maioria dos casos ele tem sido substituído por procedimentos menos restritivos.

Neste trabalho, nós aplicamos esse procedimento introduzido por Benjamin e Hochberg,(92) os quais derrubaram o balanço entre o controle de falsos-positivos e a eliminação de verdadeiros-positivos.

4. Modificações Pós-Traducionais

Um substancial progresso tem sido alcançado no que se refere à investigação de modificações pós-traducionais, conhecidas como PTMs (*Post Translational Modifications*). PTMs são definidas como uma série de reações químicas por meio das quais uma cadeia polipeptídica recém-sintetizada é convertida em uma proteína funcional.(93, 94) Até o presente, mais de 100 tipos diferentes de PTMs já são conhecidas e muitas outras estão próximas de serem

descobertas.⁽⁹⁵⁾ Por causa disso, existem muito mais proteínas no proteoma do que genes no genoma, tornando a proteômica a ferramenta mais poderosa capaz de ampliar o entendimento acerca de proteínas e suas modificações. Embora as PTMs estejam sendo estudadas há várias décadas, o desenvolvimento da tecnologia aplicada na recente proteômica, baseada em espectrometria de massas, tem permitido um avanço muito rápido das pesquisas nesta área. A maioria das PTMs, tais como fosforilação, acetilação, glicosilação, processamento proteolítico, ubiquitinação, entre outras, são criadas quando a proteína já está enovelada. Tais modificações alteram, portanto, a estrutura da proteína, sua função, suas atividades enzimáticas, a interação proteína-proteína, a formação de complexos, sua localização, sua degradação e, ainda, eventualmente, controlam o fenótipo de um organismo.

Passada a era proteômica, em que os pesquisadores focaram na simples identificação de proteínas, conseqüentemente, gerando estudos descritivos do proteoma, o foco da proteômica atual tem sido a análise quantitativa, como foi discutido na seção anterior. Além disso, é surpreendente o crescimento pelo interesse em análises de estrutura e função de um grupo de proteínas originadas seja de células, tecidos ou até mesmo de um organismo inteiro. Tem sido exigido, cada vez mais, um maior volume de informações para tornar os resultados mais completos e consistentes. Neste sentido, o estudo de fosforilações, uma das modificações mais comumente presentes nas proteínas, tem recebido especial atenção da comunidade científica. Por esse motivo, o referido estudo recebeu especial atenção neste trabalho e será discutido na próxima seção mais detalhadamente.

4.1 Fosfoproteômica

4.1.1 Fosforilação

Desde o isolamento da fosfoserina, em 1932, por Phoebus A. Levene e Fritz A. Lipmann, a fosforilação em proteínas tornou-se uma das modificações pós-traducionais mais relevantes biologicamente.(96) Apenas em 1968 a descoberta de uma proteína quinase dependente de AMP-cíclico levou ao entendimento de que a fosforilação da proteína pudesse ser realizada por estímulo extracelular, sendo neste caso, o estímulo do mensageiro secundário AMP-cíclico gerado em resposta a hormônios como adrenalina.(97) O principal evento de fosforilação, o qual é reversível, ocorre quando um grupo O-fosfato é adicionado covalentemente a principalmente três resíduos de aminoácido: serina, tirosina e treonina. A participação das proteínas quinase e fosfatase é crucial e altamente dinâmica, regulando intensivamente a adição do grupo fosfato, dada pela quinase, ou remoção do mesmo, dada pela fosfatase, em ciclos alternados que podem ocorrer em intervalo de tempo muito curto. O esquema apresentado na figura 13 demonstra a regulação enzimática da fosforilação de certa proteína.

Figura 13 – Esquema representativo da regulação da fosforilação de uma proteína. A proteína quinase mostrada é responsável pela adição do grupo fosfato à proteína, enquanto a proteína fosfatase é responsável pela remoção do mesmo.

Desde que se tornou conhecida a importância da fosforilação em processos vitais de organismos eucarióticos, os estudos sobre esse evento têm revelado inúmeras informações, tais como o seu envolvimento nos processos de crescimento celular, controle do ciclo celular, diferenciação e movimento celular, conformação tridimensional da proteína, transcrição gênica, transmissão sináptica, entre outras.(98-101) Estima-se que um terço das proteínas eucarióticas sejam fosforiladas em dado tempo.(102) Apesar de todo o conhecimento já obtido, a análise do fosfoproteoma não é uma tarefa simples por várias razões. Primeiro, a estequiometria da fosforilação é geralmente muito baixa, porque apenas uma pequena fração do *pool* de proteínas é fosforilada em certo tempo como resultado de algum estímulo. Segundo, os sítios de fosforilação nas proteínas podem variar, implicando na heterogeneidade da proteína, ou seja, a proteína pode existir em diferentes formas fosforiladas. Terceiro, muitas moléculas sinalizadoras estão presentes em baixas concentrações, tornando necessário o enriquecimento antes da

análise. Quarto, a maioria das técnicas analíticas usadas para o estudo de fosforilação tem uma limitação, sendo que ao mesmo tempo em que sítios de fosforilação podem ser localizados facilmente, também pode ser difícil de identificá-los. Por último, fosfatases podem desfosforilar os resíduos a menos que precauções sejam tomadas para inibir sua atividade durante as etapas de preparação e purificação da amostra.(103) Devido à grande dificuldade que pode ser encontrada nesse tipo de estudo, métodos de isolamento, detecção e quantificação de fosfoproteínas altamente sensíveis são exigidos.

4.1.2 Técnicas analíticas aplicadas à fosfoproteômica

Existem várias técnicas analíticas para detecção e identificação de fosforilações. Diversos trabalhos mostram comparações entre a abordagem baseada em espectrometria de massas e outros métodos como sequenciamento de Edman e mapeamento de fosforilação através de marcação com P^{32} , já tendo ficado claro que a espectrometria de massas fornece mais vantagens.(103) Sendo assim, além de ter se tornado a ferramenta mais poderosa para rápido e eficientemente identificar proteínas em amostras biológicas, a espectrometria de massas também se tornou a alternativa mais viável para identificar e quantificar fosfoproteínas.(104)

Apesar da alta tecnologia acoplada aos instrumentos analíticos, a análise pode ainda sofrer com limitações, como a sub-representação de fosfopeptídeos contidos em amostra com alta concentração do mesmo peptídeo não

fosforilado, acarretando no efeito de supressão iônica. Além disso, há também a dificuldade da especificidade da clivagem proteolítica pelas PTMs e a instabilidade da ligação do grupo fosfoéster durante a análise MS.(105) Por isso, várias estratégias para a otimização da análise têm sido usadas previamente à espectrometria de massas, assim como durante a análise MS. O esquema apresentado na figura 14, adaptada de Zahedi *et al.*,(106) mostra algumas dessas diversas estratégias.

Figura 14 – Esquema das diferentes estratégias aplicadas para a facilitação das análises de fosforilação. A figura modificada foi obtida de Zahedi *et al.*(106)

Como mencionado, apenas uma fração das proteínas de um proteoma é fosforilado em dado tempo. Devido à quantidade limitante, vários métodos para enriquecer fosfoproteínas e fosopeptídeos podem ser empregados, sendo os mais utilizados:

- anticorpos fosfoespecíficos: anticorpos específicos para resíduos de aminoácidos fosforilados, como tirosina, serina e treonina, que já estão disponíveis comercialmente, ligam-se às fosfoproteínas, as quais podem ser enriquecidas através da imunoprecipitação.(107)

- cromatografia: diversos métodos de cromatografia podem ser aplicados, porém a escolha está diretamente ligada à característica da amostra. Uma das mais populares é a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, conhecida como IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*), além da cromatografia de afinidade por óxidos imobilizados, conhecida como MOAC (*Metal Oxide Affinity Chromatography*), sendo TiO_2 (dióxido de titânio) preferencialmente usado.(108) Ainda existem outras alternativas como cromatografia bidimensional, com as possíveis combinações *Strong Anion Exchange- MOAC (SAX-MOAC)*(109), *Strong Anion Exchange- IMAC (SAX-IMAC)*(110), *IMAC-Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (IMAC-HILIC)*(111) ou *IMAC-IMAC*,(112) sendo preferidas na identificação de fosfopeptídeos de misturas protéicas complexas.

Além dos métodos de enriquecimento ou quaisquer outras estratégias que se aplicam previamente à análise MS, ainda existem alternativas para favorecer a fragmentação, identificação ou quantificação de fosfopeptídeos durante a análise MS. Referindo-se ao reconhecimento de fosfopeptídeos, os quais podem estar misturados a peptídeos não fosforilados, no caso de nenhuma técnica de enriquecimento ter sido usada, a técnica de mapeamento de peptídeos totais e posterior tratamento da amostra com fosfatase permite o reconhecimento dos fosfopeptídeos fazendo-se análise comparativa de

espectros.(113) Além dessa, há a estratégia de varredura do íon precursor, o qual pode apresentar um sinal fosfato-específico,(114) com o valor de m/z 79 (PO_3^-), assim como a varredura da perda neutra de H_3PO_4 (98Da).(115)

Muitos trabalhos têm mostrado a influência do tipo de instrumentação utilizada nas análises, sendo que instrumentos híbridos com quadrupolo e analisadores *time-of-flight* ou dois tipos diferentes de *íon-traps* se popularizaram nas últimas décadas. Em particular, a combinação de “*high*” acurácia de massa para o íon precursor e “*low*” acurácia de massa para íons-fragmentos vindos de instrumentos *íon-trap* linear Orbitrap (LTQ Orbitrap) é a configuração instrumental mais amplamente empregada. O uso dessa estratégia “*high-low*” em estudos de fosfoproteoma em larga escala levou à identificação e quantificação de vários milhares de fosfossítios.(116) Técnicas de fragmentação também podem afetar a identificação da fosforilação e até mesmo a localização da mesma, o que denomina o fosfossítio. Dissociação colisional de alta energia [*Higher energy collisional dissociation* (HCD)],(117, 118) dissociação induzida por colisão [*Collision induced dissociation* (CID)], dissociação por captura de elétron [*Electron capture dissociation* (ECD)](119) e dissociação por transferência de elétron [*Electron transfer dissociation* (ETD)](120) são as diversas opções que podem ser aplicadas, cada uma das quais apresentando prós e contras. Os dois últimos são processos que levam à fragmentação da ligação N- C_α , gerando íons *c* e *z*. Por isso, PTMs instáveis sobre condições CID permanecem intactas durante os processos ECD/ETD facilitando muito a identificação do sítio de fosforilação. Entretanto, nos processos ECD/ETD, a alternativa de uso da protease Lys-C é recomendada

para otimizar a identificação do peptídeo.(121) Por outro lado, a velocidade superior, a eficiência de identificação e a alta sensibilidade de CID, comparada às técnicas ECD/ETD, ainda faz com que a fragmentação baseada em CID seja o método de escolha quando as amostras são muito complexas ou estão em quantidades limitadas de proteínas.(106) Já a técnica HCD, também bastante utilizada, conduz os íons injetados do *ion trap* para a célula de colisão no lado distante do *C-trap*. Os íons-fragmentos são então transferidos de volta para o *c-trap* e analisados em alta resolução dentro do orbitrap. A fragmentação HCD é similar à fragmentação no triplo-quadrupolo ou em instrumentos TOF e supera o problema do corte de baixas massas da fragmentação no *íon-trap*. Além disso, a acurácia “*high*” de íons precursores e íons-fragmentos faz com que essa estratégia “*high-high*” seja bastante desejada, uma vez que pode aumentar dramaticamente a qualidade do espectro de fragmentação. Embora HCD seja aplicada em estudos de fosfoproteoma, já apresentou restrições em aplicações devido a baixa sensibilidade comparada a CID, resultando em tempos de injeção estendidos e ciclos mais lentos.(122, 123)

Visto que existe uma grande diversidade de técnicas compondo estratégias analíticas aplicadas a estudos fosfoproteômicos, cabe ao pesquisador decidir qual a melhor abordagem a ser escolhida para o estudo de interesse. Neste trabalho, para a identificação de fosforilações em toxinas de abelhas, nós optamos pela combinação das seguintes técnicas: digestão do *pool* de proteínas em solução, sem prévia separação eletroforética; enriquecimento de fosopeptídeos através de cromatografia de afinidade por

dióxido de titânio imobilizado (TiO_2); separação mais eficiente dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em gradiente longo em LC acoplado ao espectrômetro de massas; fragmentação CID; aquisição dependente de dados, sendo os 7 íons precursores mais intensos detectados com alta sensibilidade no sistema *ion-trap* e direcionados para o analisador orbitrap para MS/MS com alta resolução. Embora o enriquecimento de fosfopeptídeos não tivesse apresentado nenhuma diferença no resultado final, a combinação de todas essas técnicas gerou um grupo de resultados com alta confiabilidade, os quais estão apresentados adiante.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consistiu na ampla caracterização do perfil protéico dos venenos de três subespécies de *Apis mellifera*, sendo a abelha africanizada predominante no Brasil e Estados Unidos e *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera ligustica* predominantes na Europa. O estudo proteômico baseou-se em uma moderna estratégia, combinando análise *Shotgun*, separação cromatográfica da amostra através de gradiente longo, análise LC/MS-MS utilizando-se fragmentação de peptídeos por CID, análise dependente de dados sendo MS¹ realizado no orbitrap e MS² no *ion-trap*. A caracterização completa do proteoma efetivou-se por:

- Identificação do conteúdo protéico de todos os venenos;
- Análise quantitativa *label-free* das proteínas dos venenos;
- Identificação de fosforilações como modificações pós-traducionais de toxinas.

Adicionalmente, nós também objetivamos a investigação do possível efeito que as fosforilações identificadas em toxinas poderiam exercer nas atividades biológicas das mesmas, entre as quais:

- Atividade hemolítica;
- Atividade de desgranulação de mastócitos;
- Atividade citolítica;
- Atividade quimiotáctica.

MÉTODOS

MÉTODOS

1. Coleta da Amostra

Abelhas africanizadas foram coletadas do apiário da Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro, São Paulo, e imobilizadas através de rápido congelamento a -20°C . Amostras de veneno foram obtidas por extração manual com auxílio de pinças. Cada indivíduo foi dissecado e o aparelho de ferroar e a glândula de veneno foram removidos. As glândulas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C . Amostras de veneno da abelha europeia *A. m. ligustica* foram adquiridos da Sigma, Estados Unidos, na forma liofilizada. A outra amostra de veneno da abelha europeia, *A. m. carnica*, foi coletado eletricamente em um apiário localizado na Bulgária, região dos cáucacos, liofilizada e armazenada a -20°C .

2. Preparação da Amostra

As amostras de veneno liofilizado foram solubilizadas em bicarbonato de amônia (Sigma # A-6141) pH 8,0, contendo inibidor de fosfatase. Os tabletes de coquetel de inibidor de fosfatase foram comprados da Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha (# 04906845001) e usados de acordo com

instruções do fabricante. O conteúdo protéico das amostras foi quantificado usando o kit BCA.⁽⁸⁵⁾ As pontes dissulfeto das proteínas foram reduzidas pela adição de DTT 10 mM (Sigma # D-5545), seguindo-se incubação de 30 min a 56°C. As proteínas foram alquiladas com IAA 55 mM (Sigma # I-1149), a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A digestão protéica foi realizada utilizando-se tripsina (Promega #V5111), na proporção 1:20, a 37°C, durante 18 h. Colunas C 18 (Harvard Apparatus) foram utilizadas para a limpeza e desalinização da amostra. Os digestos peptídicos foram liofilizados e armazenados a -20°C até as análises LC-MS/MS.

3. Análise LC-MS/MS

Os digestos peptídicos foram redissolvidos em 18 µL de ácido fórmico 5% (v/v) e 5 µL foram injetados no sistema nano-HPLC Dionex Ultimate3000. O sistema foi equipado com uma coluna trap de 350 µm de diâmetro e 5 mm de tamanho e uma coluna analítica de 75 µm x 15 cm (Acclaim PepMap100 C18, 5µm/100A e 3µm/100A, respectivamente, de Dionex, Idstein, Alemanha). O solvente A consistiu de acetonitrila 2% (v/v) em água, acrescida de ácido fórmico 0,1% (v/v). O solvente B consistiu de acetonitrila 60% (v/v) em água, acrescida de ácido fórmico 0,1% (v/v). Para todos os experimentos, foi usado gradiente linear de 6% a 58% de solvente B. As amostras foram analisadas em duas diferentes durações de gradiente, sendo 120 minutos e 360 minutos. Os espectros foram adquiridos em um LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher

Scientific, Bremen, Alemanha). O *scan* FT do íon precursor foi adquirido na faixa de m/z 380 a 1200 com a resolução da massa alvo a 60000 (Full Width at Half Maximum, FWHM) a m/z 400. A contagem de íons alvo de controle de ganho automático foi ajustada para 1×10^6 íons para todo *scan* FTMS e o máximo tempo de preenchimento de 500 ms. Os espectros de fragmentação dos peptídeos foram adquiridos no *ion trap* usando a energia de colisão normalizada de 35%, tempo de exclusão dinâmica de 25 segundos, janela de isolamento de m/z 3,0. O ciclo de aquisição dependente de dados (DDA) consistiu de 6 LTQ CID MS/MS para cada *scan* FT do íon precursor com o limite de fragmentação de 2000 íons, sendo que íons precursores não carregados ou carga +1 foram excluídos da fragmentação. Massa perdida (*lock mass*) foi setada para o íon dodecametilciclohexasiloxano carga +1 ($(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$; $m/z = 445.120025$). (124)

4. Processamento dos dados

O software Trans-Proteomic Pipeline (TPP) versão 4.3.1(78) foi usado para converter arquivos de formato da Thermo Fisher Scientific (.raw) em formatos exigidos para a análise de dados. Todos os parâmetros para TPP foram aqueles fornecidos pela interface inicial do software, exceto a probabilidade de corte que foi removida para que todas as identificações permanecessem no arquivo de saída. Mascot versão 2.2.2 (Matrix Science, Londres, Inglaterra) foi usado para identificações de peptídeos usando apenas

as entradas de *Apis mellifera* do banco de dados NCBI (lançada em 23 de Fevereiro, 2012), incluindo sequências de queratinas e peptídeos de tripsina suína. As configurações da busca incluíram tolerância de 5 ppm para o íon precursor, tolerância de 0,6 Da para o íon fragmento, carbamidometilação (C) como modificação fixa, acetilação do N-terminal de proteínas (*protein N-terminus*), oxidação (M), fosforilação (Ser,Thr,Tyr) como modificações variáveis e 2 clivagens perdidas. As identificações dos peptídeos foram filtradas a 5% de *false discovery rate* (FDR) e identificações de proteínas foram aceitas com o mínimo de 2 sequências peptídicas únicas e probabilidade de identificação superior a 95%, calculada por TPP. Para validação das identificações de fosforilações, as anotações dos íons-fragmentos foram verificadas manualmente para cada espectro MS/MS identificando fosfopeptídeos. A quantificação de peptídeos originados de melitina, assim como os fosfopeptídeos, foram obtidas através de XIC, sendo as intensidades representadas pela área integrada do pico de eluição de cada peptídeo, e normalizadas pela intensidade de íons totais de peptídeos identificados.

5. Análise quantitativa *Label-free*

Uma versão customizada de SuperHirn (versão 0.03)(74) foi usada para a extração e alinhamento dos fatores. A normalização dos dados foi feita através pela intensidade dos íons totais dos peptídeos identificados. DanteR(79) foi

usado para inferências estatísticas. A lista completa dos parâmetros utilizados nos softwares SuperHirn e DanteR é apresentada nas tabelas 10 e 11.

Tabela 3 – Parâmetros usados em SuperHirn.

Nome do parâmetro	Valor usado
MS1 retention time tolerance (mins)	2,5
MS1 feature CHRG range minimum (charge)	2
RT end elution window (mins)	360
MS1 data centroid data	1
MS ¹ feature signal to noise threshold	3
Create monoisotopic LC prole	1
Peptide Prophet Threshold	0
MS2 PPM m/z tolerance (ppm)	6
MS1-to-MS2 precursor tolerance (ppm)	6
MS1 m/z tolerance (ppm)	6
Relative isotope mass precision (ppm)	6
FT peak detect MS1 m/z tolerance (ppm)	6
Save MS/MS sequenced MS1 monoisotopic peaks	0
Store only best MS2 per feature	1
Store only best MS2 per ALIGNED feature	1
Activation of MS1 feature merging post processing	0

Tabela 4 – Parâmetros usados em DanteR.

Parâmetros ANOVA	Valor usado
Model Type	Linear model (lm)
Do protein-level ANOVA	checked
Order peptides using	Mean
Minimum number of peptides	2
Maximum number of peptides	5
Use weighting	unchecked
FDR settings	Value
Choose method	Benjamini & Hochberg

6. Síntese do fosfopeptídeo e controle de qualidade

A síntese de melitina $\text{NH}_2\text{-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH}_2$, adquirida com 95% de pureza, foi comprada de Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg, Alemanha). A síntese da sequência foi customizada, pois um grupo fosfato foi adicionado ao resíduo de aminoácido serina, localizado na posição 18. Alíquotas do fosfopeptídeos foram tratadas com fosfatases alcalina (*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal* - CIP) (#M0290S, BioLabs, Inglaterra) a fim de remover o grupo fosfato dos resíduos de serina. O processo de desfosforilação consistiu na incubação do fosfopeptídeos com CIP (1 unidade de CIP/ μg de proteína) *overnight* a 37°C . A confirmação da desfosforilação foi conduzida através de medida de massa no equipamento QExactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Além da confirmação da fosforilação e sua perda no peptídeo intacto, nós também realizamos a digestão tríplica do peptídeo e fizemos uma análise LC-MS/MS no LTQ-Orbitrap Velos, apenas para obter a anotação dos íons-fragmentos e, assim, comparar com o fosfopeptídeo tríplico natural. O gradiente em LC foi conduzido em 90 minutos, com os mesmo parâmetros utilizados nas outras análises e a análise MS/MS também foi realizada com os parâmetros descritos na seção 3 de “Métodos”.

7. Ensaio Biológicos

Todos os experimentos envolvendo a utilização de animais foram realizados seguindo orientações de proteção aos animais da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que aprovou o protocolo de pesquisa nº 351/10 em 17/11/2010.

7.1 Atividade hemolítica

Uma suspensão de eritrócitos humanos 1% (v/v) foi preparada com NaCl 0,85% (v/v) e CaCl_2 10 mM. Amostras de suspensão de células vermelhas foram incubadas com os peptídeos em concentrações variando de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 0.000244 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, à temperatura ambiente, por 90 minutos. A lise das células vermelhas foi controlada pela medida da densidade ótica a $\lambda=540$ nm usando um leitor de placas. Os controles negativos empregados consistiram de suspensão de células vermelhas 1% (v/v) e solução salina tamponada com cloreto de cálcio. Os controles positivos empregados consistiram de suspensão de eritrócitos 1% (v/v) e igual volume de solução salina tamponada contendo o detergente não-iônico Triton X-100 1% (v/v) (Sigma–Aldrich). A porcentagem de hemólise foi calculada usando-se a seguinte equação:

$\% \text{ hemólise} = (A - A_0 / A_X - A_0) * 100$, onde “A” é a absorbância a $\lambda=540$ dos peptídeos, “A0” é a absorbância da solução salina tamponada e “AX” é a absorbância da solução salina mais Triton X-100 1% (v/v). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ o desvio padrão da triplicata.

7.2 Atividade de desgranulação de mastócitos

A desgranulação foi determinada pela medida da liberação de uma enzima granular específica, β -hexosaminidase, a qual se localiza com histamina, como descrito previamente por Hide *et al.*(125) A liberação da enzima foi medida utilizando-se células do lavado peritonial de ratos Wistar. Basicamente, células foram adicionadas a placas de 96 poços nas quais estavam contidos os peptídeos cujas concentrações variaram de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para 0.0011 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As células foram estimuladas durante 15 minutos a 37°C. Aliquotas da enzima liberada no sobrenadante foram tratadas com o substrato 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminidina por 6 h a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de solução de Tris 0,2M e a quantidade de enzima liberada no sobrenadante foi medida a partir da mudança da densidade ótica a $\lambda=405$ nm, detectada por um leitor de placas. Os valores foram expressos pela porcentagem total de β -hexosaminidase, a qual foi determinada a partir de mastócitos lisados na presença de Triton X-100 1% (v/v) (Sigma–Aldrich). Os resultados foram mostrados pela média $\pm$ desvio padrão da triplicata.

7.3 Efeito citotóxico/citolítico

A viabilidade celular pode ser avaliada através da medida enzimática da reação, da qual participa a enzima lactato desidrogenase (LDH). A liberação da enzima foi medida usando-se alíquotas do sobrenadante proveniente do experimento da medida de desgranulação de mastócitos. O sobrenadante foi

incubado com o reagente de trabalho fornecido pelo Kit de medida da atividade de LDH (BioTecnica, Brasil) em diferentes intervalos de tempo, variando 1 minuto cada. Seguindo-se a reação $\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-Lactato} + \text{NAD}^+$, a concentração catalítica de LDH foi determinada através da velocidade de consumo de NADH, medida a $\lambda=340$ nm. A média da leitura da absorbância foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $\Delta A/\text{min} = (A_0 - A_3)/3$, onde “A0” e “A3” são leituras de absorbância no primeiro e quarto minutos, respectivamente. A atividade de LDH foi calculada pela multiplicação de $\Delta A/\text{min}$ pelo fator 8095, tendo sido os resultados expressos em U/L.

7.4 Atividade quimiotáctica

A medida da taxa de migração de células polimorfonucleares foi realizada utilizando-se câmaras de quimiotaxia (Neuro Probe). As células foram obtidas a partir de inflamação subcutânea induzida em ratos Wistar. A parte inferior da câmara foi preenchida com solução salina contendo diferentes concentrações dos peptídeos, variando de $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a $0.0011 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Uma membrana de policarbonato contendo poros de $10 \mu\text{m}$ foi colocada entre as partes inferior e superior da câmara. A parte superior da câmara foi preenchida com a suspensão de células ($\sim 2 \times 10^4$ células/mL em solução de NaCl 0.9%). Após incubação de 60 minutos a 37°C , as células que sofreram atração pelos estímulos peptídicos e, conseqüentemente, migraram para a parte inferior da câmara, foram contadas na presença de azul de tripan em câmara de

Neubauer. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão da triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Perfil proteômico dos venenos de abelhas africanizada e europeias

1.1 Identificação de proteínas baseada na abordagem *Shotgun* LC-MS/MS

O veneno da abelha africanizada e os venenos de duas subespécies de abelhas europeias, *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*, foram submetidos à análise proteômica baseada em espectrometria de massas. Diversas técnicas utilizadas neste trabalho estão discutidas acima, assim como seus usos justificados, sendo a primeira delas a preparação da amostra antes da análise por espectrometria de massas. As amostras protéicas de cada veneno, que foram quantificadas através do método BCA (*Bicinchoninic Acid Assay*),⁽⁸⁵⁾ foram solubilizadas em tampão de bicarbonato de amônia (pH 8.0) contendo inibidores de fosfatase, uma vez que a busca por fosforilação foi realizada e o inibidor é indispensável na prevenção de defosforilação da amostra.

A análise proteômica foi realizada utilizando-se três estratégias diferentes, sendo a primeira delas a combinação de eletroforese unidimensional, digestão das proteínas contidas em fragmentos do gel com tripsina e LC-MS/MS; a

segunda delas consistiu em digestão das proteínas totais em solução seguida da análise por LC-MS/MS, sendo a separação dos peptídeos por fase reversa em gradiente de 120 minutos. Por fim, a última estratégia baseou-se na digestão das proteínas totais em solução, separação dos peptídeos em gradiente de 360 minutos, seguida de análise MS/MS.

O perfil proteico unidimensional obtido através de SDS-PAGE para as três amostras de venenos está mostrado na figura 15.

Figura 15 – SDS-PAGE com 12% de acrilamida, corado com coomassie. das três amostras de veneno, sendo as letras A, C e M representativas dos venenos das abelhas africanizada, *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*

Observa-se que as três amostras apresentam um perfil de proteínas muito similar, sendo difícil distinguir quais proteínas ocorrem em uma amostra e não ocorrem nas outras. Entretanto, é possível perceber que a banda mais marcada pelo Coomassie, entre as regiões de 36,5 e 26,6 KDa, provavelmente contendo a proteína fosfolipase A-2 (PLA2), apresenta-se com marcação

consideravelmente mais forte na amostra do veneno da abelha africanizada do que a banda correspondente para os outros venenos. Embora seja arriscado fazer esse tipo de afirmação, a intensidade mais forte da coloração desta banda pode ser um indicativo de que essa proteína apresente concentrações mais elevadas no veneno da abelha africanizada em relação aos demais.

Embora a estratégia GeLC-MS/MS apresente vantagens, como discutido anteriormente, a cobertura de sequência e, conseqüentemente da amostra, é reconhecidamente menor quando comparada à estratégia *shotgun*, uma vez que os peptídeos originados da proteólise podem ficar presos na matriz do gel.(38) Como já esperado, essa estratégia de separação prévia das proteínas em gel conferiu menor cobertura das amostras.

Por isso, nós decidimos utilizar o método *Shotgun*, tendo sido todos os venenos digeridos em solução com tripsina e os digestos peptídicos carregados em colunas C18 ("*spin columns*", Harvard Apparatus) para desalinização e limpeza da amostra. A solução contendo todos os peptídeos originados a partir da digestão proteolítica foi submetida a LC-MS/MS. Para verificar o efeito da extensão do gradiente de separação dos peptídeos na identificação de peptídeos e proteínas, aplicamos gradientes de 120 (a) e 360 minutos (b). Os dados foram adquiridos usando-se um instrumento LTQ-Orbitrap Velos operado em modo de aquisição dependente de dados, com seis scans no sistema *ion trap* para cada *scan MS*¹ realizado no orbitrap, utilizando-se fragmentação CID. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. As figuras 16 e 17 mostram os cromatogramas de base para as três amostras de veneno após 120 e 360 minutos, respectivamente.

Figura 16 – Gradiente curto de separação dos peptídeos dos três venenos de abelha.

Figura 17 – Gradiente longo de separação dos peptídeos dos três venenos de abelha.

Comparando-se os perfis cromatográficos mostrados na figura 16, representativos da separação de peptídeos provenientes da digestão enzimática das três amostras de veneno em gradiente de 120 minutos, observa-se que em determinados tempos de eluição os picos apresentam intensidades semelhantes, principalmente aqueles mais intensos, assim como outros picos apresentam intensidades diferentes. Entretanto, tomando-se o aspecto geral dos cromatogramas de base, a intensidade da maioria dos picos parece diminuir, seguindo-se a ordem Africanizada, *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*.

Ainda, comparando-se os perfis de separação em ambos os gradientes curto e longo, pode-se ver que os cromatogramas de base das três amostras, cujos peptídeos foram separados em 360 minutos, mostraram o aumento da largura dos picos e a diminuição da intensidade, o que não é surpreendente devido à extensão no tempo de separação. Isto se deve a capacidade aumentada dos picos assim como a diminuição da intensidade dos picos em consequência da diminuição da concentração de amostra.(126) Trabalhando-se com gradientes longos, o aumento esperado na largura dos picos e a redução da complexidade da amostra em cada momento durante a separação favorece a chance de fragmentação de peptídeos quando se utiliza o método de aquisição dependente de dados.

Para a identificação das proteínas, um pequeno banco de dados foi criado, contendo todas as entradas de *Apis mellifera* presentes no banco de dados NCBI, juntamente às entradas de contaminantes e queratinas, com o intuito de reduzir o espaço de busca e otimizar o processo de identificação de

proteínas. A busca de identificações foi executada usando-se o servidor Mascot com todos os parâmetros relatados na seção “Métodos”.

O efeito da extensão do gradiente de separação na identificação de peptídeos e proteínas está mostrado na figura 18.

Figura 18 – Efeito da extensão do gradiente de separação na cobertura da amostra. A cobertura da amostra foi altamente influenciada pela utilização dos gradientes de 120 e 360 minutos, sendo que o número de identificação de peptídeos e proteínas das amostras de venenos foi significativamente maior aplicando gradiente de 360 min. A cobertura em ambos os gradientes está mostrada para todas as amostras de venenos (a) *A. m. africanizada*, (b) *A. m. carnica*, e, (c) *A. m. ligustica*. Os peptídeos foram identificados com Mascot (NCBI nr, entradas *Apis mellifera* com FDR de 5%).

Apesar de que a maioria dos estudos de proteoma seja realizada em gradientes de 60 a 90 minutos, já está demonstrado que o número de identificações é superior quando utilizados longos gradientes, favorecendo a cobertura do proteoma.(127, 128) Esse foi o caso do estudo em questão, no qual o número de peptídeos e proteínas das três amostras de veneno de abelha foi superior quando se utilizou um gradiente de 360 minutos comparado com o gradiente de 120 minutos.

Considerando o aumento no tempo de análise, é quase óbvio o aumento no número de eventos de fragmentação, ou seja, eventos MS^2 . Para a amostra de veneno da abelha africanizada, por exemplo, o número de eventos MS^2 nos gradientes curto e longo foram 36197 e 106547, respectivamente. Levando-se em conta todos os peptídeos identificados compreendidos abaixo do limite de 5% para o FDR, observa-se um aumento maior do que três vezes no número de peptídeos totais para todas as amostras de veneno. Comum às três amostras também, em ambos os gradientes, o número de peptídeos únicos é consideravelmente inferior comparado ao número de peptídeos totais, porque ocorre redundância no sequenciamento dos peptídeos em muitos *scans*. Ainda assim, o número de peptídeos únicos é muito superior no gradiente longo. Isso significa que a extensão no tempo de separação reduz a chance de coeluição de peptídeos, reduzindo o efeito chamado de íon-supressão. A redução desse efeito de íon-supressão resulta no aumento da intensidade do pico e na melhora da sensibilidade de detecção, apesar do alargamento dos picos. Essa razão é uma das mais consideradas para a identificação de fosfopeptídeos, por exemplo, a qual é favorecida pela redução do efeito de íon-supressão, uma vez

que fosfopeptídeos são menos abundantes e estão presentes em baixíssimas concentrações.

Para a identificação das proteínas, tomou-se como critério a presença de no mínimo dois peptídeos únicos, cujo escore de identidade estivesse acima do limiar de identificação. Além disso, utilizamos o Software Trans Proteomic Pipeline para calcular a probabilidade de identificação de proteínas e foram aceitas todas as identificações com probabilidade acima de 95%. O número de proteínas identificadas utilizando-se gradiente longo foi consideravelmente superior, quando comparado ao número de proteínas identificadas utilizando-se gradiente curto, já que a separação foi mais eficiente e o efeito íon-supressão foi minimizado, favorecendo a fragmentação e possibilitando o sequenciamento de novos peptídeos. Os diagramas de Venn apresentados nas figuras 19 e 20 mostram o número de proteínas identificadas em todas as amostras, assim como o compartilhamento de proteínas entre os venenos.

Comparando-se o número total de proteínas identificadas em ambos os gradientes, 29 proteínas foram identificadas para todas as amostras de venenos utilizando-se gradiente de 2h (listas de identificações apresentadas nos anexos A, B e C), enquanto 51 foram identificadas após 6h de gradiente de separação na cromatografia líquida (istas de identificações apresentadas nos anexos D, E e F). As 29 proteínas identificadas após utilização de gradiente de 2h também foram identificadas após separação cromatográfica de 6h, ou seja, a identificação de todas as 21 proteínas adicionais provavelmente deve-se à extensão do gradiente de separação dos peptídeos na cromatografia líquida.

Desse total de 29 proteínas identificadas para os três venenos utilizando-se gradiente curto, 21 proteínas são compartilhadas pelas três amostras, como apresentado no diagrama de Venn (figura 19). Nenhuma proteína foi identificada como sendo exclusiva dos venenos da abelha africanizada e *A. m. carnica*, enquanto 2 proteínas foram unicamente encontradas no veneno de *A. m. ligustica*. Apenas 1 proteína é compartilhada pelos venenos da abelha africanizada e *A. m. carnica*; já os venenos das abelhas africanizadas e *A. m. ligustica* não compartilham nenhuma proteína; e, os venenos das abelhas europeias compartilham 5 proteínas.

Figura 19 – Diagrama de Venn dos perfis protéicos dos venenos investigados, quando utilizado gradiente de separação cromatográfica de 2h, previamente às análises MS. No diagrama estão mostrados os números de proteínas identificadas no veneno das três subespécies de abelhas, *A. m. africanizada*; *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*.

Desse total de 51 proteínas diferentes identificadas para todos os venenos após 6h de separação cromatográfica dos peptídeos, 42 são compartilhadas entre os venenos de todas as subespécies de *A. mellifera* (figura 20). Os venenos das abelhas europeias possuem 44 proteínas em comum. O veneno da abelha africanizada compartilha 43 proteínas com o veneno da *A. m. ligustica*, sendo o mesmo número compartilhado entre a abelha africanizada e *A. m. carnica*.

Figura 20 – Diagrama de Venn dos perfis protéicos dos venenos investigados, quando utilizado gradiente de separação cromatográfica de 6h, previamente às análises MS. No diagrama estão mostrados os números de proteínas identificadas no veneno das três subespécies de abelhas, *A. m. africanizada*; *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*.

A lista de todas as proteínas identificadas está mostrada abaixo na tabela 5. Na tabela, estão mostradas as probabilidades de identificação de cada

proteína, calculadas a partir do software Trans Proteomic Pipeline, assim como o número de peptídeos únicos identificados para cada proteína. As proteínas de veneno de abelha podem ser classificadas em 3 diferentes grupos: componentes verdadeiros do veneno, proteínas de função regulatória básica e função não clara e proteínas envolvidas em comunicação química. As proteínas classificadas como proteínas de função regulatória básica, assim como aquelas provenientes de músculos do corpo do inseto, não são consideradas componentes verdadeiros do veneno e, aparentemente, não desempenham nenhuma função no mecanismo de envenenamento ou não tem nenhuma contribuição para o papel biológico desempenhado pelo veneno. O grupo de proteínas do veneno é composto por aquelas cuja função já se conhece e por aquelas com função similar a de toxinas de venenos de outros animais, especialmente insetos sociais da ordem Himenóptera. Neste trabalho, nós identificamos tanto proteínas previamente conhecidas quanto proteínas não descritas até o momento. Algumas dessas proteínas não previamente identificadas podem ser incluídas no grupo de componentes verdadeiros de veneno por apresentarem funções similares a de outras toxinas encontradas em outros venenos animais;(129) elas parecem desempenhar algum papel no processo de envenenamento, assim como proteção do próprio veneno. Entre elas, podem ser citadas as proteínas desintegrina e metaloproteinase, cisteína-protease CG12163, CREG1, MRJPs 1, 2, 3 e 5.

Tabela 5 – Lista de proteínas identificadas nos venenos das abelhas europeias e africanizada. O número de acesso é originado do banco de dados NCBI e a probabilidade de identificação foi calculada pelo Trans Proteomic Pipeline.

Número de Acesso	Proteína	Probabilidade	Número de Peptídeos Únicos Identificados		
			<i>A.m. africanizada</i>	<i>A.m. carnica</i>	<i>A.m. ligustica</i>
5627	phospholipase A-2	100.0%	33	29	27
48101366	venom serine protease 34	99.8%	0	0	5
58585070	major royal jelly protein 8 precursor	100.0%	16	17	16
58585086	transferrin 1 precursor	100.0%	6	1	17
58585098	major royal jelly protein 1	95.3%	6	0	0
58585104	vitellogenin precursor	100.0%	0	0	20
58585108	major royal jelly protein 2 precursor	100.0%	18	2	1
58585116	venom serine protease 34 precursor	100.0%	1	15	19
58585138	major royal jelly protein 5 precursor	100.0%	11	0	0
58585142	major royal jelly protein 3 precursor	100.0%	14	2	1
58585154	melittin precursor	100.0%	6	4	4
58585164	alpha-glucosidase precursor	100.0%	12	0	0
58585166	apamin preproprotein	95.9%	1	1	1
58585180	secapin preproprotein	99.7%	3	3	2
58585182	hyaluronidase precursor	100.0%	33	38	33
60115688	icarapin-like precursor	100.0%	7	7	9
66500170	neutral alpha-glucosidase AB-like isoform 2	100.0%	1	0	5
66507455	venom protease	100.0%	4	5	6
66511507	endochitinase isoform 2	97.3%	3	5	5
66514614	chitinase-like protein Idgf4-like	100.0%	1	4	4
66560290	lysosomal aspartic protease	99.4%	2	3	0
67010041	major royal jelly protein 9 precursor	100.0%	20	24	20
74835477	venom allergen acid phosphatase	100.0%	5	9	21

Continua

					Conclusão
94158822	odorant binding protein 14 precursor	100.0%	5	3	6
94400907	allergen Api m 6 precursor	100.0%	4	3	4
110748908	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3-like	99.9%	3	2	2
110751310	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	100.0%	5	5	10
110756431	hypothetical protein LOC725074	100.0%	3	3	3
110758297	phospholipase A2-like	100.0%	8	10	9
187281543	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	100.0%	4	4	16
187281550	venom carboxylesterase-6 precursor	100.0%	22	19	18
221325614	C1q-like venom protein precursor	100.0%	5	4	3
226533687	venom serine carboxypeptidase precursor	100.0%	6	5	4
229892214	heat shock protein cognate 3	100.0%	4	1	2
328778095	lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like	96.9%	0	1	2
328779578	lysozyme c-1	100.0%	5	7	6
328780886	apolipoporphins-like	100.0%	0	0	6
328781841	mast cell degranulating peptide-like	100.0%	4	4	2
328782499	proactivator polypeptide isoform 1	100.0%	14	21	25
328783352	chymotrypsin inhibitor	99.6%	2	2	2
328783471	hypothetical protein LOC725114 isoform 1	99.9%	2	0	0
328785691	carboxypeptidase D-like	100.0%	0	1	3
328787622	peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase	98.2%	2	1	3
328787755	hypothetical protein LOC100577054	100.0%	4	5	5
328787985	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	100.0%	2	1	0
328788558	putative cysteine proteinase CG12163-like	100.0%	6	9	11
328789222	nucleobindin-2-like	100.0%	2	6	3
328789531	hypothetical protein LOC408666	100.0%	18	20	20
328790510	dnaJ homolog subfamily B member 11-like	100.0%	1	2	1
328790726	venom acid phosphatase Acph-1-like	100.0%	4	8	5
335892796	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	100.0%	8	8	10

Dentre as 42 proteínas compartilhadas por todos os venenos, podem ser encontradas as principais toxinas de venenos, as quais já foram identificadas em trabalhos anteriores, tais como melitina, fosfolipase-A2, hialuronidase, carboxilesterase, api m 6, serina-carboxipeptidase, entre outras.(130-132) As fosfolipases são relativamente comuns em venenos de himenópteros, ocorrendo principalmente as formas –A e –B.(133) Essa enzima cataliza a hidrólise específica de ésteres de 1,2-diacil-3-sn glicerofosfolipídeos nas posições sn-1 e sn-2, liberando ácidos graxos.(134) Por isso, as fosfolipases são capazes de perturbar a estrutura das membranas celulares após rompimento da camada fosfolipídica, levando a danos à membrana como formação de poros, lise celular, inflamação e danos ao tecido.(25) Em venenos de abelhas as fosfolipases são bem conhecidas pela atividade hemolítica e por função alergênica.(135) Outras proteinases também foram detectadas, como serina-carboxipeptidase, protease de veneno, cisteína-protease, dipeptidil-peptidase 4 e desintegrina e metaloproteinase, indicando que os venenos têm capacidade lítica potencialmente alta.

Uma das proteínas identificadas pela primeira vez em venenos de abelha consiste na proteína desintegrina e metaloproteinase, a qual deve estar relacionada à ocorrência de mionecrose, danos da pele, edema, entre outras reações inflamatórias.(136) A degradação da matriz extracelular provocada por essa proteína parece ser o fator resonsável pela ocorrência de hemorragia e edema ao redor do local da ferroadada.(136) Além desses, outros sintomas típicos causados pela ação das desintegrinas e metaloproteinases no processo de envenenamento podem ser choque e alguns tipos de coagulopatias.(137)

Algumas dessas manifestações já tiveram sido relatadas em pacientes que sofreram ataques em massa por abelhas.(138)

A presença da proteína transferrina também foi relatada na presente investigação. Essa proteína já havia sido identificada no veneno de abelhas europeias e vespas.(139, 140) Transferrina é uma glicoproteína ligadora de ferro que controla os níveis de ferro livre nos fluidos biológicos. Por causa disso, pode exercer efeito bactericida, uma vez que íons Fe^{+3} ficam indisponíveis impedindo a sobrevivência dos microorganismos.(141) Sendo assim, a presença dessa proteína nos venenos pode estar relacionada a função antibacteriana(142), o que é importante para a proteção dos ninhos, que podem ser alvos de bactérias. Outra proteína chamada cisteína-protease CG12163 parece um notável candidata para futuras investigações devido à presença da proteína funcionalmente similar, a serina-protease de veneno de abelha, a qual é reconhecida como um alérgeno.(143)

CREG1 é uma outra proteína nova, que já foi relacionada anteriormente a fatores de inibição do crescimento celular e diferenciação.(144) Diferentes tipos de fatores de crescimento já foram identificados nos venenos de abelhas europeias e vespas.(139, 140) Essas proteínas são importantes na preservação do tecido do reservatório do veneno. Considerando a presença de diversas proteases, as quais poderiam lesar o próprio reservatório de veneno, a CREG1 pode desempenhar um papel de controle do crescimento celular, prevenindo a ruptura do tecido que poderia ser causado pelos componentes citolíticos.

A proteína ligada ao odor foi identificada neste trabalho, a qual também foi encontrada no veneno de *S. invicta*. O grupo de proteínas ligadas ao odor identificadas no veneno dessa formiga está relacionado à comunicação química. Essas proteínas são produzidas pelas sensilas quimiosensoras do inseto e secretadas na linfa sensilar, assim como nos venenos de himenópteros.(145) Apesar do papel relacionado à comunicação química, essas proteínas ainda têm função desconhecida nos venenos. Além disso, 6 proteínas conhecidas como Proteínas Principais de Geléia Real (MRJPs) foram identificadas em nosso estudo. Embora elas sejam homólogas a proteínas conhecidas como *yellow-like*, que são comuns em artrópodes, as MRJPs foram unicamente identificadas dentro do gênero *Apis*.(146) Elas constituem 90% das proteínas totais da geléia real,(147) a substância produzida, secretada e utilizada para alimentar as larvas de abelhas em desenvolvimento. Além da expressão dessas proteínas em glândulas hipofaríngeas, MRJP1 e MRJP2 já foram também encontradas no cérebro de abelhas.(148) Recentemente, MRJP8 e MRJP9 foram reconhecidas pela União Internacional da Sociedade de Imunologia (IUIS) como proteínas alergênicas, chamadas Api m 11.(149) Aqui, neste trabalho, MRJPs 1, 2, 3 e 5 foram pela primeira vez encontradas no venenos de abelhas.

Outras proteínas identificadas podem ser relacionadas ao papel de auto-proteção do veneno, tais como: peptidil-prolil cis-trans isomerase, proteína de choque térmico, inibidor de quimiotripsina e dipeptidil-peptidase 4. Aparentemente, elas parecem estar envolvidas na manutenção de toxinas ativas/inativas no veneno enquanto ainda armazenadas no reservatório de

veneno, assim como, na maturação de toxinas secretadas a partir dos seus precursores. A proteína tipo C1q identificada nos três venenos parece ser similar ao primeiro componente da via clássica do sistema complemento, constituindo um importante elo entre a resposta imune inata e adquirida. A presença dessa proteína no veneno pode estar relacionada a ativação do sistema complemento observada durante o processo de envenenamento.(150)

Entre todas as 42 proteínas comuns aos venenos, 11 alérgenos também estão sendo compartilhados, entre os 12 já descritos, sendo a vitelogenina o único alérgeno não compartilhado e encontrado unicamente no veneno da abelha *A. m. ligustica*.

O fato de que as principais toxinas e maioria dos alérgenos de venenos de abelha estão sendo compartilhados por todos os venenos pode ser um indicativo de que os mecanismos de ação destes venenos provavelmente são bastante semelhantes entre si. Essa alta similaridade de composição protéica, poderia, por sua vez, favorecer a neutralização dos venenos pelo soro antiveneno já produzido especificamente para o veneno da abelha africanizada. Apesar de esta possibilidade ser factível, isso é algo que deve ser testado cautelosamente porque existem outros componentes com função desconhecida ou com função ainda não relacionada ao mecanismo de envenenamento ou resposta alérgica, tornando a sutil diferença de composição uma importante barreira na neutralização dos mesmos.

Embora o conhecimento acerca da composição do veneno seja relevante para o entendimento do mecanismo de ação, não é apenas a composição protéica que determina o grau de toxicidade do veneno, ou ainda semelhanças

ou diferenças entre os venenos de subespécies de abelhas. Além da análise de isoformas, que confere uma representação mais próxima da composição protéica do veneno, a análise proteica quantitativa pode acrescentar informações extremamente importantes, uma vez que a concentração das toxinas no veneno também pode consistir em um fator a ser considerado no grau de toxicidade do veneno. Além disso, pensando-se na neutralização do veneno pelo soro antiveneno, este pode ter diferente ação neutralizadora em função da concentração de toxinas em cada veneno. Levando-se em conta o fato de que não há nenhum dado sobre a análise quantitativa de venenos de abelhas na literatura utilizando-se espectrometria de massas, infere-se que a mesma não teve sido realizada até o momento.

Considerando a importância que os dados podem apresentar, contribuindo para o estudo comparativo de venenos e possível inferência sobre a aplicabilidade de terapias eficientes comuns às diferentes subespécies de *Apis mellifera*, foi decidida a realização de análise proteômica quantitativa, a qual está discutida na próxima seção seguinte.

2. Diferenças quantitativas em nível protéico entre os venenos de abelhas europeia e africanizada

Após a etapa de preparação, as amostras de veneno foram submetidas à digestão em solução e limpeza com coluna C18 e, então submetidas ao LC-MS/MS. As análises LC-MS/MS foram realizadas em duplicatas para cada

amostra de veneno. Nós seguimos uma conduta de quantificação *label-free* baseada na utilização do programa bem estabelecido SuperHirn, em combinação com abordagens estatísticas modernas para determinar as diferenças quantitativas do proteoma de venenos de abelhas.

A análise quantitativa seguiu um fluxograma, o qual está mostrado resumidamente na figura 21. Os peptídeos obtidos após digestão com tripsina foram analisados em duas aquisições LC-MS/MS independentes. Os arquivos de dados “brutos” (“*Raw data*”) foram convertidos num formato aberto através do programa Trans Proteomic Pipeline (TPP). As identificações dos peptídeos foram obtidas através do Mascot. Os fatores foram detectados e alinhados pelo SuperHirn. O mapa mestre portando todos os fatores foi normalizado e as análises estatísticas foram realizadas em DanteR.

Figura 21 – Fluxograma da análise proteômica quantitativa dos venenos de abelha. O veneno A representa a amostra da abelha *A. m. africanizada*, o Veneno C e L correspondem às amostras das abelhas europeias, *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*, respectivamente.

Considerando que um maior número de proteínas foram identificadas utilizando-se gradiente de 6h na cromatografia líquida e que nenhuma proteína foi exclusivamente identificada após gradiente de 2h, somente os dados obtidos daquele conjunto de experimentos foram submetidos à análise quantitativa. Os mesmos parâmetros de identificação dos peptídeos inseridos

no Mascot foram utilizados na análise quantitativa e FDR inferior a 5%. Devido ao fato de que a plataforma de análise conta com a vantagem do compartilhamento de identificações de peptídeos através dos fatores alinhados, diversos peptídeos foram quantificados, mesmo não tendo sido identificados em todas as aquisições.

Ambos os venenos de abelhas europeias foram comparados ao veneno da abelha africanizada. Por isso, os valores diferenciais representativos do número de vezes que a proteína está presente em quantidades inferiores apresentam um sinal de negativo (-), ou quando superiores (nenhum sinal), tomando como base o veneno da abelha africanizada. Todas as proteínas consideradas quantitativamente alteradas estão mostradas nas tabelas 6 e 7. Todas essas proteínas mostradas apresentaram significância estatística, sendo o $p\text{ value} < 0,05$. Os asteriscos mostrados lateralmente aos números dos valores diferenciais representam o limiar do $p\text{ value}$ calculado através do teste ANOVA.

Comparando-se os venenos de *A. m. carnica* e africanizada, 10 proteínas foram encontradas com as quantidades alteradas, sendo 3 delas detectadas em quantidades superiores no veneno da abelha europeia em relação ao veneno da africanizada. A tabela 6 mostra todas as proteínas diferencialmente detectadas em ambos os venenos, sendo os valores diferenciais representativos do número de vezes que a proteína está presente em quantidades inferiores ou superiores. Por exemplo, o conhecido alérgeno fosfatase ácida foi detectada em quantidade estatisticamente significativa diferente ($p\text{ value} < 0,01$), sendo 1,8 vezes maior no veneno de *A. m. carnica* em

relação ao veneno da africanizada. Já o peptídeo desgranulador de mastócitos, outro componente tóxico de venenos de abelha, foi encontrado em quantidade também estatisticamente significante diferente ($p\text{ value} < 0,001$), sendo 12,3 vezes menor no veneno da abelha europeia comparado ao veneno da africanizada.

Tabela 6 – Proteínas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e *A.m.carnica*.

Proteína	Valor diferencial (C/A)
mast cell degranulating peptide-like	-12,3***
allergen Api m 6 precursor	-4,0**
endoplasmic reticulum resident protein 29-like	-3,0***
peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase	-2,4**
phospholipase A-2	-1,7***
endochitinase isoform 2	-1,7**
lysozyme c-1	-1,4**
venom allergen acid phosphatase	1,8**
venom serine protease 34 precursor	4,7***
heat shock protein cognate 3	6,5**

*p value<0,5 ** pvalue<0,1 ***pvalue<0,01

Considerando as 43 proteínas identificadas e compartilhadas pelos venenos das abelhas *A. m. carnica* e africanizada, número que pode ser visto no diagrama de Venn apresentado anteriormente na figura 20, nós consideramos um número pequeno 10 proteínas quantitativamente diferenciais. Ainda, outro importante número a ser levado em conta é o número de proteínas com função conhecidamente alergênica ou tóxica. Dentre essas 10 proteínas,

apenas 5 são toxinas ou alérgenos importantes no veneno, os quais são mostrados na figura 22 com os respectivos valores quantitativos diferenciais. Ainda, entre essas 5 proteínas, 2 foram encontradas em quantidades superiores no veneno da abelha europeia (venom serine protease 34, venom allergen acid phosphatase).

Figura 22 – Toxinas e alérgenos quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e *A. m. carnica*.

Comparando-se os venenos das abelhas *A. m. ligustica* e africanizada, apenas 4 proteínas foram encontradas com a quantidade alterada, dados mostrados na tabela 7.

Tabela 7 – Proteínas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e *A.m.ligustica*

Proteína	Valor diferencial (L/A)
mast cell degranulating peptide-like	-34,7**
venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	5,1*
venom serine protease 34 precursor	12,8**
venom allergen acid phosphatase	20**

*p value<0,5 ** pvalue<0,1 ***pvalue<0,01

Dentre essas 4 proteínas, 3 foram encontradas em quantidades maiores no veneno da abelha europeia em relação ao veneno da africanizada (*venom serine protease 34*, *venom allergen acid phosphatase* and *venom dipeptidyl peptidase 4*). Todas essas proteínas apresentam função alergênica ou tóxica conhecida, por isso estão mostradas novamente na figura 23.

Figura 23 – Alérgenos e toxinas quantitativamente diferenciais nos venenos da abelha africanizada e *A.m. ligustica*.

Esses resultados sugerem que a notável diferença na concentração de alérgenos detectada entre todos os venenos poderiam representar uma importante fator a ser considerado quando aplicada imunoterapia em pacientes alérgicos a venenos de abelhas. Neste caso, a utilização de venenos específicos poderia levar a uma melhor proteção dos pacientes alérgicos.

Contrariamente, considerando-se que proteínas diferencialmente expressas foram comuns em ambas as comparações entre o veneno da abelha africanizada e os venenos das abelhas europeias, apenas 11 proteínas dentre 51 foram encontradas em quantidades significativamente diferentes, tendo sido 8 proteínas detectadas em maior abundância no veneno da abelha africanizada. Agregando-se a isso o fato de que melitina, a principal toxina dos venenos de abelhas, não foi detectada em quantidades diferenciais e a segunda toxina mais importante, fosfolipase A-2, foi encontrada em maior abundância no veneno da abelha africanizada, assim como o peptídeo desgranulador de mastócitos, em termos de neutralização dos efeitos tóxicos dos venenos, é possível que um antiveneno produzido especificamente para o veneno da abelha africanizada seja eficiente na neutralização da toxicidade causada pelos venenos das outras subespécies.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram outros estudos, nos quais a comparação da ação tóxica desses venenos mostrou graus de toxicidade similares, sendo os acidentes causados por abelhas africanizadas considerados mais danosos às vítimas devido ao fato de que essas abelhas costumam fazer ataques em massa.(151)

Embora todos esses resultados e prévios trabalhos nos levem a acreditar que um antiveneno produzido especificamente para a abelha africanizada poderia ser amplamente utilizado em acidentes com outras abelhas, é claro que os estudos de venenos de abelhas devem ser cada vez mais aprofundados, pois quanto mais conhecimento acerca dos componentes com função já caracterizada e caracterização de potenciais novos alérgenos e toxinas contribuirá para o estabelecimento de melhores terapias e tratamentos para as vítimas de acidentes com esses animais. Considerando que a neutralização de uma toxina por anticorpos específicos pode ser influenciada pela concentração da toxina, a análise proteômica quantitativa dos venenos permitiu a caracterização molecular mais detalhada dos componentes presentes nos venenos.

3. Identificação de fosforilações em toxinas de venenos de abelha

Seguindo o objetivo de aprofundar os estudos e obter novas informações a respeito dos componentes dos venenos, nós partimos para a análise de possíveis modificações pós-traducionais nas proteínas, uma vez que elas podem alterar significativamente o reconhecimento da toxina pelo anticorpo, assim como a toxicidade da proteína. Sendo assim, nós decidimos investigar a possível presença de fosforilações, uma das modificações pós-traducionais

mais comumente encontradas em proteínas, a fim de agregar novas informações, já que esse tipo de estudo não foi realizado até o momento.

Considerando todos os peptídeos compreendidos pelo limiar de 5% do FDR, como já mostrado e discutido anteriormente, o número de fosopeptídeos identificados nos três diferentes venenos de abelha foi superior quando utilizando-se gradiente de separação de 6h em comparação ao gradiente mais curto, de 2h. A figura 24, apresentada abaixo, mostra os números de fosopeptídeos identificados em ambos os gradientes.

Devido ao fato de que as fosfoproteínas estão presentes em baixas concentrações e representam uma pequena porção da mesma proteína não modificada, o gradiente longo favoreceu a separação dos fosopeptídeos que poderiam ter sido coeluídos com os mesmos peptídeos não fosforilados em gradiente curto. Além da extensão do gradiente reduzir o efeito de coeluição, também diminuiu o efeito de supressão iônica. Isso quer dizer que, enquanto os fosopeptídeos poderiam não ser fragmentados após utilização do gradiente curto, eles tiveram mais chance de serem fragmentados após aplicação do gradiente longo.

Figura 24 – Identificação de fosfopeptídeos em todas as amostras de veneno. Número de fosfopeptídeos identificados após separação por cromatografia líquida utilizando-se gradientes curto (120 min) e longo (360 min).

As tabelas 8, 9 e 10 apresentam todos os peptídeos identificados com pelo menos uma fosforilação, estando essa fosforilação localizada nos resíduos de serina, tirosina ou treonina. Todos os fosfopeptídeos apresentaram escore superior ao limiar de identificação fornecido pelo Mascot.

Tabela 8 – Fosfopeptídeos identificados no veneno da abelha africanizada.

Número de Acesso	Sequência	Carga (+)	Mascot Score
60115688	SVESVEDFDNEIPK	2	55.64
328782876	RFLVEVFTLAELAGK	2	37.89
58585154	VLTTGLPALISWIK	2	36.95
58585154	VLTTGLPALISWIK	2	33.82
66548261	TPDEAAKLAADLKSK	2	31.62
58585154	VLTTGLPALISWIKRK	2	29.89

Continua

Continuação

110749155	LLLSSATER	2	29.79
328778663	KSYVIK	2	26.64
328782876	RFLVEVFTLAELAGK	3	24.16
328783824	SSPAQVLK	2	23.77
328787040	SIASKDKTQNMQSTMK	4	23.09
66519149	TLFDELVTK	2	22.15
328781546	NMCINIFSYWR	3	21.9
328782641	LLLRAGADPTHR	3	21.59
328778335	KHLGPVSKLLR	2	21.04
328786967	NPTRETLTKLK	2	20.91
328786654	LDGNTTSSTRSK	2	20.15
328785779	DLMCSLK	2	20.15
328789717	GARMLIRVANNISK	4	20.07
328786521	VAITLTGCLR	2	19.7
328777816	SEMKIFDK	2	19.68
328784805	NSESAPVLK	2	19.59
328787757	LTMAGNEFRAAAR	2	19.43
328776425	ENGQRKVPGPMLNTTK	4	19.29
328789212	LRASMKNQDEVEVLK	2	19.17
328787114	YIGSTIGRVANKISMGK	4	19.08
328786075	AWGPIISALCRAYDKAPDR	4	19.02
48097668	VPTQALR	2	18.73
328776313	ISSCLTSIIK	3	18.71
328791978	MLGVYIK	2	18.69
66548973	SEFGKIVK	2	18.67
328777241	IGNMGQANYAASKAGVIALTK	4	18.63
328779065	KRAAIGNTVR	3	18.5
328787362	EGANSIGGGLR	2	18.4
339715114	QAFYVQTFLK	3	18.26
328785970	SSTVPLAKRQASLK	4	18.17
66515278	YQEALAYR	2	18.12
328776251	SVGSVSLSTKDQIK	2	17.97

Continua

Conclusão

328782669	SKPDYIK	2	17.88
328791042	KETLQMLKK	2	17.86
328787304	QLISPTK	2	17.86
328793136	NLYGEAAKQLIR	3	17.14
110749872	DEITHAIK	2	17.13
328792885	QAWTGVK	2	17.12
328786869	LLISLVSGPK	2	16.52
48097314	GKMTATTGK	2	16.45
48095908	STSENLSDK	3	16.4
328787695	ALTVIKPSAMK	2	16.29
328776802	LSNTLISRGLLTPK	4	16.08
328787880	DVEVTKIVIHEEIIKK	5	15.79
328787101	LILPYLDIK	3	15.58
328786984	STVINAMLR	2	15.56
328788637	SRPMGNK	2	15.38
328790111	LESLEVAGIGK	3	15.34
328779721	LKPLPKTSSV	3	15.23
48109772	VSQPIDDQSKSYR	4	14.89
328790944	TKPFLK	2	14.21
328786869	LLISLVSGPKK	3	14.15
110777042	HLRTLKLPVKSIDIK	3	13.67
58585154	VLTTGLPALISWIK	2	13.43
48095928	MGLLTVLKKLK	2	13.35
328784395	ETETTPK	2	13.05
328786551	CTHFLK	2	11.97
328792001	IVKKTIIK	2	11.7

Tabela 9 – Fosfopeptídeos identificados no veneno de *A. m. carnica*.

Código de Acesso	Sequência	Carga (+)	Mascot Score
60115688	SVESVEDFDNEIPK	2	55.64
328782876	RFLVEVFTLAELAGK	2	37.89
66548261	TPDEAAKLAADLKSK	2	31.62
58585154	VLTTGLPALISWIKRK	2	29.89
110749155	LLLSSATER	2	29.79
328782876	RFLVEVFTLAELAGK	3	24.16
328783824	SSPAQVLK	2	23.77
328787040	SIASKDKTQNMQSTMK	4	23.09
66519149	TLFDELVTK	2	22.15
328781546	NMCINIFSYWR	3	21.9
328783546	IVENAQLLSQISDK	3	21.52
328778335	KHLGPVSKLLR	2	21.04
328786967	NPTRETLTKLK	2	20.91
328786654	LDGNTTSSTRSK	2	20.15
328785779	DLMCSLK	2	20.15
328789717	GARMLIRVANNISK	4	20.07
328786521	VAITLTGCLR	2	19.7
328777816	SEMKIFDK	2	19.68
328784805	NSESAPVLK	2	19.59
328787757	LTMAGNEFRAAAR	2	19.43
328776425	ENGQRKVPGPMLNTTK	4	19.29
328789212	LRASMKNQDEVEVLK	2	19.17
328786075	AWGPIISALCRAYDKAPDR	4	19.02
48097668	VPTQALR	2	18.73
328791978	MLGVYIK	2	18.69
66548973	SEFGKIVK	2	18.67
328779065	KRAAIGNTVR	3	18.5
328790847	NALYSKDK	2	18.41
328787362	EGANSIGGGLR	2	18.4
339715114	QAFYVQTFLK	3	18.26
328785970	SSTVPLAKRQASLK	4	18.17
66515278	YQEALAYR	2	18.12

Continua

Conclusão

328793136	NLYGEAAKQLIR	3	17.14
110749872	DEITHAIK	2	17.13
328792885	QAWTGVK	2	17.12
110750077	LILNSSMKVLK	3	16.72
328786869	LLISLVSGPK	2	16.52
48095908	STSESNLSDK	3	16.4
328787695	ALTVIKPSAMK	2	16.29
328781373	VNLVALILHSTGSRSPNSKLAETLHRPIR	5	15.99
328787880	DVEVTKIVIHEEIIKK	5	15.79
328787101	LILPYLDIK	3	15.58
328786984	STVINAMLR	2	15.56
328788637	SRPMGNK	2	15.38
328790111	LESLEVAGIGK	3	15.34
328779721	LKPLPKTSSV	3	15.23
48109772	VSQPIDDQSKSYR	4	14.89
328790944	TKPFLK	2	14.21
328786869	LLISLVSGPKK	3	14.15
110777042	HLRTLKLPVKSIDIK	3	13.67
58585154	VLTTGLPALISWIK	2	13.43
48095928	MGLLTVLKKLK	2	13.35
328784395	ETETTPK	2	13.05
328792001	IVKKTIIK	2	11.7

Tabela 10 – Fosfopeptídeos identificados no veneno de *A. m. ligustica*.

Código de Acesso	Sequência	Carga (+)	Mascot Score
60115688	SVESVEDFDNEIPK	2	55.64
328782876	RFLVEVFTLAELAGK	2	37.89
58585154	VLTTGLPALISWIK	2	33.82
66548261	TPDEAAKLAADLKSK	2	31.62
58585154	VLTTGLPALISWIKRK	2	29.89
110749155	LLLSSATER	2	29.79

Continua

Continuação

328783824	SSPAQVLK	2	23.77
328787040	SIASKDKTQNMQSTMK	4	23.09
66519149	TLFDELVTK	2	22.15
328781546	NMCINIFSYWR	3	21.9
328783546	IVENAQLLSQISDK	3	21.52
328778335	KHLGPVSKLLR	2	21.04
328786967	NPTRETTLTKLK	2	20.91
328786654	LDGNTTSSTRSK	2	20.15
328785779	DLMCSLK	2	20.15
328789717	GARMLIRVANNISK	4	20.07
328786521	VAITLTGCLR	2	19.7
328777816	SEMKIFDK	2	19.68
328784805	NSESAPVLK	2	19.59
328776425	ENGQRKVPGPMLNTTK	4	19.29
328789212	LRASMKNQDEVEVLK	2	19.17
328786075	AWGPIISALCRAYDKAPDR	4	19.02
48097668	VPTQALR	2	18.73
328776313	ISSCLTSIIK	3	18.71
328791978	MLGVYIK	2	18.69
66548973	SEFGKIVK	2	18.67
328782884	EKVDDDILSEEASK	3	18.59
110760604	KLPTSIR	2	18.58
328790847	NALYSKDK	2	18.41
328787362	EGANSIGGGLR	2	18.4
339715114	QAFYVQTFLK	3	18.26
328785970	SSTVPLAKRQASLK	4	18.17
66515278	YQEALAYR	2	18.12
328776251	SVGSVSLSTKDQIK	2	17.97
328782669	SKPDYIK	2	17.88
328791042	KETLQMLKK	2	17.86
328787304	QLISPTK	2	17.86
328793136	NLYGEAAKQLIR	3	17.14
110749872	DEITHAIK	2	17.13

Continua

Conclusão

328776161	LQESFSDPESLILPLILQNK	4	17
110750077	LILNSSMKVLK	3	16.72
328786869	LLISLVSGPK	2	16.52
48095908	STSENLSDK	3	16.4
328787695	ALTVIKPSAMK	2	16.29
328788337	ETKKTK	2	16.11
328781373	VNLVALILHSTGSRSPNSKLAETLHRPIR	5	15.99
328787880	DVEVTKIVIHEEIIKK	5	15.79
328786984	STVINAMLR	2	15.56
328788637	SRPMGNK	2	15.38
328790111	LESLLLEVAGIGK	3	15.34
328782814	MTTSNGIK	2	15.26
328780361	LSNDSPAİK	2	15.06
48109772	VSQPIDDQSKSYR	4	14.89
328781339	KKSITIK	2	14.84
328790944	TKPFLK	2	14.21
110777042	HLRTLSLKPVKSIDIK	3	13.67
58585154	VLTTLGLPALISWIK	2	13.43
48095928	MGLLTVLKCLK	2	13.35
328784395	ETETTPK	2	13.05
328792001	IVKKTIIK	2	11.7

Um elevado número de fosfopeptídeos foi identificado. Porém, porque utilizamos como critério de identificação de proteínas o mínimo de dois peptídeos diferentes para cada proteína, além do fato de que existem muitos peptídeos, gerados através da ação de proteases do próprio veneno, que não resultam em identificação de proteínas, apenas 2 proteínas identificadas em todas as amostras apresentaram peptídeos fosforilados. Ambas as proteínas foram previamente identificadas em venenos de abelhas europeias.

O estudo pioneiro na caracterização do fosfoproteoma de venenos de abelhas revelou que uma das fosfoproteínas identificadas consiste na toxina mais importante do veneno, a melitina. Além dessa, icarapina é a outra toxina, previamente identificada no veneno de *A. m. carnica*,⁽¹⁵²⁾ que foi identificada na forma fosforilada no presente trabalho. A tabela 11 mostra as quatro diferentes sequências de fosfopeptídeos identificados em melitina, os quais possuem sequências similares, sendo a diferença resultante de perdas de clivagem pela tripsina, e o único fosfopeptídeo pertencente à icarapina. Todos os fosfopeptídeos foram encontrados em todas as amostras.

Tabela 11 – Fosfopeptídeos identificadas em duas proteínas dos venenos das abelhas africanizada e europeias.

Toxina	Melitina	Icarapina
Fosfopeptídeo	VLT ^p TGLPALISWIK	SVES ^p VEDFDNEIPK
	VLTTGLPALIS ^p WIK	-
	VLTTGLPALIS ^p WIKRK	-

Melitina é o principal componente tóxico do veneno de *Apis mellifera* e tem sido intensivamente estudado. Melitina é um peptídeo, cuja sequência é constituída por 26 resíduos de aminoácidos (NH₂-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH₂), na qual a região amino-terminal (resíduos 1-20) é predominantemente hidrofóbica enquanto a região carboxi-terminal (residues 21-26) é hidrofílica devido à presença de aminoácidos positivamente carregados. O peptídeo ativo é liberado do seu precursor, promelitina, durante sua biosíntese no veneno de abelha.⁽²⁴⁾ Numerosos estudos contribuído para o nosso entendimento sobre as propriedades

químicas e estruturais, atividade celular, e mecanismos de interação lipídeos-proteínas.(18, 22) Entretanto, nenhuma melitina fosforilada havia sido até então identificada.

Além disso, quando investigando a lista de peptídeos constitutivos de melitina, surpreendentemente nós observamos que doze sequências foram identificadas nos venenos das abelhas africanizada e *A. m. carnica* e onze sequências no veneno de *A. m. ligustica*, todas compreendendo a substituição de um resíduo de aminoácido localizado na posição 15 da sequência completa, o qual é o oitavo resíduo do peptídeo originado de digestão com tripsina, como pode ser visto na tabela 12.

Apesar de que melitina não foi detectada em quantidades diferenciais na análise quantitativa dos venenos, nós buscamos por possíveis diferenças relacionadas a abundância das diversas formas polimórficas de melitina. Embora não fosse possível acessar a extensão completa do polimorfismo desse peptídeo, devido ao fato de que o N- e C-terminais são pouco suscetíveis a fragmentação e identificação, nós realizamos a quantificação baseada em XIC dos sinais obtidos para verificar a extensão do polimorfismo do peptídeo tríptico em cada amostra de veneno. A intensidade foi obtida manualmente considerando-se a área integrada do pico presente em cada XIC correspondente aos diferentes peptídeos. Os valores de intensidade foram normalizados pela intensidade de íons totais correspondentes a todos os peptídeos identificados para todas as amostras.

Tabela 12 – Sequências do peptídeo derivado de melitina. Doze sequências do peptídeo originado da digestão triptica da melitina foram identificadas por LC-MS/MS, com a substituição de um resíduo de aminoácido na mesma posição da sequência. Os aminoácidos sublinhados representam as fosforilações identificadas.

Massa Calculada (Da)	<i>m/z</i> Experimental	Sequência ^a	Desvio ppm	Intensidade XIC Normalizada ^b (%)		
				A	C	L
1496,8967	749,4569	VLTTGLPGLISWIK	1.75	4.11E+00	5.97E-03	4.27E-03
1526,9072	764,4594	VLTTGLPSLISWIK	-1.92	7.62E-01	5.52E-01	7.62E-01
1536,9279	769,4714	VLTTGLPPLISWIK	-0.31	1.04E-01	1.07E-01	1.32E-01
1540,9229	771,4675	VLTTGLPTLISWIK	-1.53	1.48E-02	1.29E-02	1.94E-02
1552,9592	777,4858	VLTTGLPILISWIK	-1.44	4.33E-04	2.85E-04	2.32E-04
1553,9181	777,9885	VLTTGLPNLISWIK	2.80	1.23E-01	3.51E-04	1.78E-04
1554,9021	778,4582	VLTTGLPDLISWIK	-0.19	5.11E-02	3.63E-02	3.70E-02
1567,9338	784,9763	VLTTGLPQLISWIK	0.97	6.96E+00	8.25E+00	6.73E+00
1568,9178	785,4689	VLTTGLPELISWIK	3.46	1.75E-02	2.64E-02	1.06E-02
1599,9058	800,9584	VLTTGLPCLISWIK	0.62	5.01E-03	5.22E-03	7.93E-03
1625,9545	813,9816	VLTTGLPWLISWIK	-3.26	1.72E-05	5.63E-05	0.00E+00
1510,9123	756,4638	VLTTGLPALISWIK	0.51	8.79E+01	9.10E+01	9.23E+01
1590,8786	796,4443	VL <u>T</u> TGLPALISWIK	-0.60	4.53E-04	5.71E-05	1.65E-05
1590,8786	796,4461	VLTTGLPALIS <u>W</u> IK	-2.83	8.56E-04	7.63E-05	4.67E-05

A sequência original e previamente conhecida, com um resíduo de alanina na posição variável (Ala¹⁵), é a versão mais abundante na nossa análise para todas as amostras de veneno. Ela é seguida pelos próximos três peptídeos mais abundantes, cujas sequências têm a alanina substituída pelos aminoácidos glutamina, serina e prolina. A abundância das sequências polimórficas comparadas entre si apresentaram-se muito similares para todas as amostras, com exceção de duas, (Gly¹⁵ e Asn¹⁵), as quais apresentaram abundância notavelmente maior no veneno da abelha africanizada.

A ocorrência do polimorfismo nesse resíduo de aminoácido observado pode estar relacionada com o comportamento de cópula da abelha rainha, a

qual coopula com vários zangões durante o vôo nupcial, acumulando pacotes individuais de espermatozóides, que são usados para fertilizar os oócitos resultantes na formação das abelhas operárias.⁽¹⁵³⁾ A variação dos aminoácidos neste peptídeo não foi ainda descrita, por isso o significado biológico ainda deve ser desvendado. Diante do fato de que a natureza das abelhas se encarregou de gerar peptídeos com a mesma sequência trocando apenas um resíduo de aminoácido localizado na mesma posição, provavelmente existe uma consequência a qual deve ser investigada, principalmente por causa da relevância desse peptídeo como uma molécula altamente tóxica e alergênica.

Interessantemente, entre as doze sequências apenas uma delas foi identificada na forma fosforilada, a qual é a mais abundante de todas e previamente caracterizada, com uma alanina na posição variável. O peptídeo não modificado ${}^8\text{VLTG L P A L I S W I K}^{21}$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 756.4638) foi identificado através do Mascot com dois diferentes candidatos a sítio de fosforilação, Thr¹⁰ e Ser¹⁸. Além do íon precursor não modificado, os dois fosfopeptídeos mostraram dois picos de eluição cromatográfica com diferentes tempos de retenção, os quais podem ser vistos no XIC apresentado na figura 25.

Figura 25 – XIC do íons precursores monoisotópicos duplamente carregados correspondentes aos peptídeos derivados de melitina (756.4638 ± 2 ppm), gerados a partir de digestão com tripsina. Os peptídeos mono-fosforilados produzidos a partir de melitina $p\text{-S}^{18}$ e $p\text{-T}^{10}$ possuem diferentes tempos de retenção, mostrados nos dois picos de eluição, sendo $p\text{-S}^{18}$ eluído em 283.23 minutos e $p\text{-T}^{10}$ em 294.21 minutos.

O peptídeo não modificado foi eluído com 232.53 minutos, enquanto ambos os candidatos a fosfopeptídeos, $p\text{-Ser}^{18}$ e $p\text{-Thr}^{10}$ foram eluídos com 283,23 e 294,21 minutos, respectivamente. Esses resultados indicam que melitina contém peptídeos fosforilados tanto em treonina quanto em serina. Considerando o maior escore fornecido pelo Mascot para ambos os candidatos a fosfopeptídeos, o peptídeo identificado com fosfoserina (posição 18) teve Mascot escore 48 enquanto o peptídeo identificado com fosfotreonina (posição 10) teve Mascot escore 37. Embora os escores originados pelo Mascot por si próprios tenham indicado alta probabilidade para os sítios de fosforilação, a

anotação dos espectros dos íons-fragmentos foi realizada manualmente para validação dos fosfossítios. O espectro MS/MS do peptídeo não modificado (não mostrado) apresentou excelente fragmentação, incluindo a série *y* de íons quase completa e a maioria dos íons da série *b*. O resultado não foi diferente para o fosfopeptídeo *p*-Ser¹⁸. A fragmentação desse peptídeo forneceu uma excelente anotação das séries de íons, incluindo os íons com perda neutra. A figura 26 representa o espectro MS/MS anotado manualmente do fosfopeptídeo ⁸VLTTGLPALISpWIK²¹ ([M+2H]²⁺ *m/z* 796.4461).

Figura 26 – Espectro MS/MS do peptídeo proveniente de digestão com tripsina derivado de melitina, fosforilado em serina. O espectro representa o peptídeo ⁸VLTTGLPALISpWIK²¹ ([M+2H]²⁺ *m/z* 796.4461). Nenhum íon fragmento com perda neutra das séries de íons *y* ou *b* estão presentes sem serina em suas sequências peptídicas correspondentes.

A presença do íon mais intenso com perda neutra, representado por *y*₈ *m/z* 1007.56, é a confirmação da fosforilação no resíduo de serina. Além disso, a ausência de íons com perda neutra em todas as possíveis sequências

no resíduo de treonina. Entretanto, a presença de dois resíduos de treonina nas posições 10 e 11 da sequência completa de melitina dificulta a determinação da localização exata da fosforilação. Então, levando-se em conta o Mascot score (37) e a sequência de íons com perda neutra, incluindo o íon b_3 , o qual possui apenas Thr¹⁰ na sua respectiva sequência peptídica, nós assumimos que muito provavelmente o candidato para a fosforilação é a treonina na posição 10.

Como dito anteriormente, melitina não foi a única toxina identificada com fosforilação. Icarapina, outra proteína relevante do veneno de abelha, foi identificada fosforilada. Icarapina foi primeiramente identificada como “*new venom protein 2*” em um estudo proteômico de veneno de abelha europeia.(33) Mais tarde, ela foi testada para o reconhecimento por anticorpos IgE e gerou resultados positivos com o soro de 4 entre 5 pacientes alérgicos a veneno de abelha,(152) sugerindo que ela deve agir como um alérgeno do veneno. A sequência peptídica ²⁰²SVESVEDFDNEIPK²¹⁵, um peptídeo derivado de digestão com tripsina proveniente da proteína contendo 223 resíduos de aminoácidos, foi identificada tanto nas formas não-fosforiladas ($[M+2H]^{2+}$ m/z 804.3756), como nas formas fosforiladas ($[M+2H]^{2+}$ m/z 844.3604). O único fosopeptídeo sugerido pelo Mascot foi Ser²⁰⁵, o qual apresentou score 56. A validação do sítio de fosforilação foi realizada através de análise manual da anotação do íon-fragmento, a qual pode ser vista na figura 28.

Figura 28 – Espectro MS/MS do íon correspondente ao peptídeo obtido a partir de digestão com tripsina derivado de icarapina, fosforilado em serina. A figura representa a anotação do espectro MS/MS do peptídeo, $_{202}\text{SVESVEDFDNEIPK}_{215}$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 844.3604), derivado de icarapina. Todos os íons com perda neutra correspondentes à série de íons *b* incluem serina na sequência peptídica. Também, o íon fragmento y_{13} indica que a fosforilação pertence à serina na posição 205, como sugerida pelo Mascot, o qual mostrou escore 56.

A anotação do íon-fragmento do fosfopeptídeo derivado de icarapina demonstrou que o fosfopeptídeo teve uma razoável fragmentação, incluindo quase todos os íons da série *y*. Além disso, a presença do íon fragmento y_{13} com perda neutra indicou que o fosfgrupo parece ser originado da serina na posição 205. Devido à instabilidade do grupo fosfato sob condições CID, o íon originado da perda neutra do ácido fosfórico pode ser selecionado para futura fragmentação por MS³.⁽¹⁵⁴⁾ Aqui, nós tentamos esse método, o qual fornece

informação adicional de sequência e atribui à serina ou à treonina a específica localização do sítio de fosforilação. Entretanto, o método não foi eficiente por causa da baixa abundância dos íons.

Uma interessante observação foi feita a respeito da localização da fosforilação em icarapina. O sítio de fosforilação identificado está localizado na proximidade do sítio antigênico previamente descrito, o qual consiste no resíduo de serina na posição 198 da sequência completa da proteína.(155) A presença da modificação pós-traducional pode estar influenciando a estrutura tridimensional da proteína, talvez perturbando o sítio antigênico, o que poderia afetar, conseqüentemente, a eficiência da ligação específica antígeno-anticorpo. Por isso, a descoberta e sua possível implicância são eventos a serem investigados futuramente.

4. Relação entre fosforilação e a atividade biológica da principal toxina de venenos de abelhas

A identificação de toxinas fosforiladas, facilitada pela nossa escolha de uma metodologia poderosa e sensível, combinando cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas em *tandem* de alta resolução, levanta a questão do possível envolvimento dessas modificações na imunoreatividade ou função biológica dessas proteínas. Suspeitando do possível efeito da fosforilação encontrada na melitina na sua atividade biológica, nós decidimos verificar a atividade biológica de ambas as formas de melitina, fosforilada e

não-modificada, considerando que essa toxina representa o componente de venenos de abelhas mais importante.

4.1 Controle de qualidade da síntese de melitina fosforilada

A sequência da melitina contendo o peptídeo fosforilado originado de digestão com tripsina, e, aparentemente mais abundante, $^8\text{VLTGTPALISpWIK}^{21}$, foi escolhida para ser sintetizada e testada. O peptídeo sintético foi comprado de Peptide Specialty Laboratories GmbH (Alemanha), tendo sido a fosforilação adicionada à sequência na posição 18, ocupada pelo resíduo de serina. Uma alíquota do peptídeo foi separada e digestão com tripsina foi realizada nas mesmas condições em que foi realizada para as amostras de veneno. O objetivo dessa análise foi demonstrar que o mesmo fosfopeptídeo identificado na amostra de veneno natural, seria originado de melitina sintética após digestão com tripsina, comprovando a veracidade da fosforilação identificada no peptídeo natural. A análise LC-MS/MS foi conduzida nas mesmas condições utilizadas na análise das amostras de veneno, exceto pelo tempo de cromatografia líquida, o qual foi 90 minutos, considerando que a amostra era pura. A figura 29 mostra o espectro MS/MS obtido para o fosfopeptídeo, gerado após digestão com tripsina, derivado de melitina sintética.

Figura 29– Espectro MS/MS do fosfopeptídeo derivado de melitina sintética, originado após digestão com tripsina. O peptídeo $^8\text{VLT TGLPALISpWIKR}^{21}$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 874.4948) foi identificado com perda neutra de uma grupo fosfato, a qual pode ser vista pelo pico do íon-fragmento mais intenso y_9 , cujo m/z é 1065.6568. A perda neutra também pode ser vista pelo pico do íon intacto, cujo m/z é 825.742.

Através da anotação do espectro MS/MS do peptídeo sintético de melitina derivado de digestão com tripsina, pudemos confirmar que a fosforilação foi adicionada corretamente ao resíduo de serina, conforme objetivado. A análise do espectro mostra que a perda neutra ocorreu não somente a partir do íon-fragmento, sendo o mais intenso o íon y_9 de m/z 1065.6568 na forma $[\text{M}+\text{H}]^+$, mas também do íon intacto, o qual não foi fragmentado (m/z 825.742 na forma $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$). Seguramente, a fosforilação está presente no aminoácido serina, porque não há nenhum íon-fragmento da série b de íons que apresente perda

neutra cuja sequência correspondente não contenha o resíduo de serina na posição 18.

Uma vez confirmada a presença da fosforilação no resíduo de aminoácido de interesse, a indução da perda da fosforilação foi promovida a fim de realizar os ensaios biológicos com as duas formas de peptídeos. Duas alíquotas do peptídeo sintético foram separadas, sendo que uma delas foi tratada com fosfatase alcalina intestinal (1.0 unidade/ μ g de peptídeo), a qual promove a completa remoção da fosforilação, resultando no peptídeo não modificado. Assim, nós pudemos comparar a atividade do peptídeo não modificado com o peptídeo fosforilado.

Para controle de qualidade do tratamento com fosfatase alcalina intestinal, fizemos a medida de massa das duas alíquotas de peptídeo para certificar que o peptídeo tratado com fosfatase estava livre da fosforilação. O instrumento QExactive (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para a medida, tendo sido realizada infusão direta da amostra. O método para aquisição MS¹ apresenta diferenças em comparação ao método utilizado no Orbitrap Velos, já que o princípio físico de ambos os instrumentos não é o mesmo. Enquanto Orbitrap consiste de *ion trap* linear combinado ao orbitrap, QExactive combina triplo-quadrupolo e orbitrap. A figura 30 apresenta o espectro MS¹ obtido para o peptídeo inteiro, livre de tratamento com fosfatase alcalina, enquanto a figura 31 apresenta o espectro MS¹ obtido para o peptídeo inteiro após tratamento com fosfatase.

Figura 30 – Espectro MS¹ de melitina sintética não tratada com fosfatase. O pico destacado, ⁺ m/z 976.2418 na forma $[M+3H]^3$, mostra que a fosforilação está mantida.

No espectro MS¹ da melitina sintética livre de tratamento, pode ser visto o pico representativo do íon intacto $[M+3H]^3$ m/z 976.2418, contendo a fosforilação. Já a figura 33 mostra o espectro MS¹ adquirido para melitina tratada com fosfatase alcalina. No espectro pode ser observado o pico representativo do íon intacto $[M+3H]^3$ m/z 949.5859, indicando que a fosforilação foi completamente perdida. Além da perda da fosforilação ser indicada pelos espectros MS¹ de ambos os peptídeos, foi realizada a busca no banco de dados utilizando-se o Mascot. Basicamente, os mesmos parâmetros do Mascot utilizados nas identificações das amostras analisadas no Orbitrap foram utilizados aqui, exceto pelo tipo de instrumento, ESI-QUAD. Os

resultados fornecidos pelo Mascot também mostram que somente o peptídeo fosforilado foi identificado na amostra não tratada e somente o peptídeo livre da fosforilação foi identificado na amostra tratada com fosfatase.

Figura 31 – Espectro MS^1 obtido para melitina sintética após tratamento com fosfatase alcalina. O íon intacto, representando o peptídeo livre da fosforilação ($[M+3H]^{3+}$ m/z 949.5859), está mostrado em destaque.

Realizando o controle de qualidade do tratamento de indução de perda da fosforilação da melitina sintética com enzima específica, atestamos que as amostras estavam adequadas para a realização das medidas das atividades biológicas de ambos os peptídeos, não modificado e fosforilado.

4.2 Efeito da fosforilação identificada em melitina nas suas atividades biológicas

Após certificação da perda da fosforilação, ambos peptídeos, não modificado e fosforilado, foram testados para avaliação da influência da fosforilação em atividades biológicas previamente estudadas de melitina. Os ensaios biológicos, os quais consistiram na medida da atividade hemolítica, atividade desgranuladora e citotóxica de mastócitos e, atividade quimiotática foram realizados em triplicata, sendo os resultados finais expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

4.2.1 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica é a atividade mais característica apresentada por melitina, por isso nós investigamos sua possível atividade modificada em função da presença da fosforilação. A utilização da melitina sintética foi extremamente importante na realização das medidas de suas atividades biológicas, uma vez que o estudo da melitina contida no veneno torna-se dificultada em função da interação com outras proteínas, principalmente PLA2.(156) Sendo que melitina frequentemente está associada com a atividade fosfolipásica, provavelmente pela sua ligação a essa enzima,(18, 157) a contaminação por PLA2 apresenta a principal preocupação quanto à artefatos em experimentos envolvendo melitina com lipídeos, a menos que o peptídeo seja purificado e livre de contaminação pela enzima.

Melittina, assim como outros peptídeos ligantes de membranas, é predominantemente hidrofóbica. Existe uma distribuição assimétrica de aminoácidos polares e apolares, os quais atribuem à melittina a característica anfipática quando o peptídeo está alinhado em conformação de hélice- α .⁽¹⁵⁸⁾ Em solução aquosa, a agregação de melittina é promovida por alta salinidade, alta concentração do peptídeo. Em concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ ($3 \cdot 10^{-7}\text{M}$) ou maiores, melittina se liga rapidamente a eritrócitos e induz a liberação de hemoglobina no meio extracelular. Já foi demonstrado que a ligação de melittina a eritrócitos na forma de monômeros é necessária para a expressão da atividade hemolítica.⁽¹⁵⁹⁾ Quando em solução aquosa, melittina tende a se agregar em forma tetramérica, quando em alta salinidade, alta concentração do peptídeo e alto pH.⁽¹⁶⁰⁾

Realizando a medida da atividade hemolítica de ambos os peptídeos, melittina não modificada e melittina fosforilada, foi observado uma redução da atividade em função da presença da fosforilação. A figura 32 mostra as curvas de hemólise para ambos os peptídeos, tendo a concentração dos peptídeos variado de 0.5 a 0.000244 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pode ser visto claramente que a fosforilação torna o peptídeo menos ativo, uma vez que uma maior concentração do peptídeo fosforilado é necessária para atingir o mesmo efeito hemolítico do peptídeo não modificado.

Figura 32 – Efeito de melitina não modificada (▲) e melitina fosforilada (●) na atividade hemolítica em eritrócitos humanos. A atividade (%) foi determinada em relação a 0,1% Triton X-100 como sendo 100% e solução salina como sendo 0% de atividade hemolítica. Os dados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

A concentração necessária para atingir 50% da atividade do peptídeo não modificado é 0.002 µg/µL, enquanto a concentração do peptídeo fosforilado para atingir a mesma atividade é três vezes maior, sendo 0.006 µg/µL. Embora o mecanismo pelo qual melitina interage com membranas celulares já tenha sido bastante estudado, o evento de fosforilação está sendo pela primeira vez aqui descrito. É provável que a atividade esteja sendo afetada pela modificação estrutural introduzida pela fosforilação, que por sua vez provavelmente influencia diretamente a estrutura secundária do peptídeo, e consequentemente sua interação com membranas plasmáticas. Portanto futuros estudos estruturais de interação da melitina fosforilada com membranas

celulares serão necessários para explicar a influência de tal modificação na atividade do peptídeo.

4.2.2 Atividade de desgranulação de mastócitos

A atividade de desgranulação de mastócitos está mais fortemente associada a polipeptídeos chamados mastoparanos, os quais são originados de venenos de vespa.(161-163) Um desses peptídeos, o chamado MCD também é encontrado em venenos de abelhas, assim como visto neste trabalho, o qual identificou esse peptídeo em todas as amostras de veneno de abelhas analisadas. Os mastoparanos induzem a translocação de proteínas $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha i}$ dos chamados “*lipid rafts*” com o aumento da desgranulação e geração de ROS em mastócitos.(164) Os “*lipid rafts*” são micro-domínios no interior da membrana plasmática, altamente dinâmicos, enriquecidos com colesterol, esfingolípídeos e glicolípídeos.(165) Assim como a forte interação de melitina com eritrócitos, melitina também interage com mastócitos, modulando os “*lipid rafts*”, os quais regulam as vias de sinalização através de receptores $Fc\epsilon RI$.(166)

Mastócitos de lavado peritoneal de ratos Wistar foram coletados e ativados com concentrações de peptídeo variando de 0.1 a 0.001 $\mu g/\mu L$. A concentração máxima de peptídeos usada neste experimento consistiu de menor concentração comparada àquela usada na medida da atividade hemolítica, a fim de evitar o efeito altamente tóxico dos peptídeos em

mastócitos. Mesmo a concentrações mais baixas, o efeito citolítico ainda assim pode ocorrer, por isso nós controlamos esse efeito realizando em paralelo a medida da enzima lactato desidrogenase, a qual está mostrada no tópico seguinte. A atividade desgranuladora dos mastócitos se deu através da medida de uma enzima que está localizada no interior dos grânulos, chamada β -hexosaminidase.(167)

A desgranulação ocorreu de forma dose-dependente através do estímulo por ambos os peptídeos. Porém, o mesmo efeito de redução da atividade hemolítica de meltina modificada também foi observada na medida da desgranulação de mastócitos, cujos resultados estão apresentados na figura 33 a seguir. Melitina fosforilada precisou do dobro da concentração (0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para atingir os mesmos 50% de atividade desgranuladora comparada ao peptídeo não modificado, a qual foi 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 33 – Efeito de melitina não modificada (▲) e melitina fosforilada (●) na liberação da enzima β -hexosaminidase de mastócitos. A atividade (%) foi determinada em relação a 0,1% Triton X-100 como sendo 100% e solução tampão como sendo 0% de atividade desgranuladora de mastócitos. Os dados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

4.2.3 Efeito citotóxico/citolítico em mastócitos

Embora o efeito citotóxico/citolítico de melitina sintética tenha sido demonstrado em concentrações acima de 0.4 $\mu\text{g/mL}$, (168) decidimos realizar a medida de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), a qual está situada no citoplasma celular. No caso de algum efeito citolítico ser observado, poderíamos comparar as atividades de ambos peptídeos, melitina fosforilada e não modificada. Além disso, o resultado dessa medida confirmaria a atividade desgranuladora de mastócitos causada exclusivamente por liberação do conteúdo granular e não dano celular, servindo como controle de qualidade do experimento anterior. A mesma curva de concentração de peptídeos utilizada no experimento de medida de β -hexosaminidase, discutido acima, foi utilizada aqui, variando de 0.1 a 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A figura 34 mostra os resultados da medida da quantidade de lactato desidrogenase liberada, após estímulo das células pelos dois peptídeos.

Figura 34 – Efeito citolítico de melitina não modificada ($\blacktriangle$) e melitina fosforilada ($\bullet$) em mastócitos. A medida da atividade de LDH foi expressa pela sua concentração em U/L. Os dados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

Os resultados obtidos não parecem representar efeito citolítico significativo, uma vez que a liberação da enzima LDH foi extremamente baixa. Ainda que pudéssemos considerar efeito citolítico desencadeado pelos peptídeos, não há diferença comparando-se a quantidade de enzima LDH liberada após estímulo das células pelos dois peptídeos.

4.2.4 Atividade Quimiotática

Quiomiotaxia foi o último ensaio biológico realizado a fim de verificar a influência da fosforilação presente na sequência peptídica de melitina na atração de células polimorfonucleares. Leucócitos respondem a diversos

fatores quimiotáticos com variadas estruturas, por isso estudos com esses fatores podem ajudar a entender a ligação aos sítios específicos localizados na superfície celular. O efeito migratório de células foi medido através do uso de células polimorfonucleares periféricas coletadas de processos inflamatórios induzidos em ratos Wistar, afim de verificar o poder atrativo de melitina sobre células inflamatórias. A figura 35 mostra a migração celular observada em câmaras de ensaios quimiotáticos, sob o estímulo atrativo dos peptídeos.

Figura 35– Efeito de melitina não modificada (▲) e fosforilada (●) na migração de células polimorfonucleares. Os dados foram expressos como média da porcentagem de células que migraram entre dois compartimentos da câmara de quimiotaxia $\pm$ desvio padrão.

Os resultados seguiram a mesma tendência apresentada nos outros ensaios biológicos. Sabendo-se que melitina se liga à bicamadas lipídicas tanto de células como de lipossomos,(18) é sugerido que essa ligação, a qual pode ser saturável e não receptor-específica, é um sinal adequado para iniciar processos quimiotáticos. Embora a resposta quimiotática tenha sido induzida

por ambos os peptídeos de melitina, as células responderam diferentemente aos quimioatraentes. A razão entre a ED_{50} dos peptídeos não modificado e fosforilado foi 6, significando que o fosfopeptídeo é menos atraente, quando comparado ao peptídeo não fosforilado. A menor habilidade de atrair células parece estar relacionada à menor ligação do peptídeo à membrana celular, o que por sua vez pode estar sendo influenciado pela presença da fosforilação.

O conjunto de resultados de todas as medidas de atividades biológicas apresentadas por melitina, claramente demonstra que a fosforilação presente no resíduo de serina, localizado na posição 18 da sequência, afetou a atividade dessa molécula. O mecanismo, pelo qual a função da molécula está sendo influenciada, ainda não se sabe. A perturbação da estrutura química é acreditada por ocorrer, assim como da carga do peptídeo, a qual está diretamente relacionado a sua função. Porém, essa investigação estrutural é algo que deverá ser realizada futuramente, assim como o estudo da influência da fosforilação identificada no resíduo de treonina, na posição 10 da sequência completa de melitina, nas mesmas atividades biológicas. Além disso, fica como futuro alvo de investigação a relação entre as fosforilações identificadas tanto em melitina como em icarapina e a ligação a anticorpos IgE específicos, o que demonstrará a influência dessa modificação na propriedade alergênica das toxinas.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O estudo proteômico dos venenos das abelhas africanizadas e europeias *A. m. carnica* e *A. m. ligustica* compreendeu análises descritivas e comparativas de caráter inovador. Utilizando a estratégia *shotgun* seguida de análises LC-MS/MS em um dos mais sofisticados espectrômetros de massa, nós fomos capazes de atingir todos os objetivos propostos para desvendar o perfil proteômico dos venenos, chegando às seguintes conclusões:

1. O perfil proteico do veneno da abelha africanizada, ainda não descrito na literatura, foi descrito no nosso trabalho, tendo sido o total de 48 proteínas identificadas. Além de proteínas anteriormente relatadas em estudos com outros venenos de abelhas, proteínas ainda não descritas nesses venenos foram descritas.

2. A análise dos venenos das abelhas europeias revelou um maior número de proteínas identificadas do que aquele já publicado em jornais da área, demonstrando que o avanço da tecnologia é um dos responsáveis por ampliar e agregar conhecimento. Para os venenos das abelhas *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*, 45 e 46 proteínas foram identificadas, respectivamente. Investindo esforços em uma abordagem comparativa de metodologia baseada no efeito da extensão do gradiente cromatográfico na separação e identificação de peptídeos e proteínas, nós atingimos ampla cobertura da amostra.

3. Apoiados na lista de 51 proteínas totais encontradas para todas as amostras, nós mostramos que 42 delas estão presentes em todos os venenos, o que pode apontar para a semelhança de mecanismo toxinológico exercido pelos venenos das diferentes abelhas quando injetados em suas vítimas após acidente.

4. Além do grau de semelhança observado qualitativamente, os venenos apresentaram pequenas diferenças quantitativas. A análise quantitativa baseada na abordagem *label-free* serviu para comparar relativamente a abundância das proteínas das abelhas africanizadas e europeias. Foi mostrado que 11 proteínas foram encontradas em quantidades diferentes, sendo 10 e 4 proteínas diferencialmente expressas entre, respectivamente, os venenos de *A. m. carnica* e *A. m. ligustica* comparados ao veneno da africanizada. Dentre as 11 proteínas, aquelas que tiveram maior abundância nos venenos de ambas abelhas europeias correspondem a proteínas com função alergênica conhecida. Embora o número seja pequeno, essa diferença observada na concentração de alérgenos poderia implicar na resposta alérgica e/ou no tratamento dos pacientes alérgicos com imunoterapia específica para cada veneno. Por outro lado, por causa do pequeno número de toxinas quantitativamente diferenciais entre os três venenos e o veneno da abelha africanizada apresentou maior abundância dessas toxinas, o desenvolvimento de um antiveneno específico para o veneno da abelha africanizada poderia potencialmente funcionar efetivamente na neutralização dos outros venenos após acidente.

5. A investigação de fosforilações foi bem sucedida e gerou resultados inovadores. Duas proteínas fosforiladas foram encontradas. Melitina, a toxina mais importante dos venenos de abelha, foi identificada com dois sítios de fosforilação, Ser¹⁸ e Thr¹⁰, em todas as amostras de venenos. Além da melitina, outra proteína descrita por sua ação alergênica, icarapina, foi identificada na forma fosforilada, sendo o fosfósíto localizado em Ser²⁰⁵, próximo ao sítio antigênico dessa proteína previamente caracterizado. Visando identificar a possível interferência da fosforilação na função da toxina, nós utilizamos a melitina fosforilada em Ser¹⁸ para testar algumas atividades biológicas dos peptídeos em sua forma nativa e fosforilada. A toxina fosforilada mostrou-se menos ativa do que a toxina na forma nativa, indicando que a fosforilação exerce um efeito na função da molécula, talvez acarretado por alteração estrutural.

Considerando os resultados apresentados no presente trabalho e o conjunto de dados da literatura, concluímos que o estudo proteômico e fosfoproteômico de venenos de abelhas acrescentou informação ao conhecimento já existente e abriu caminhos para futuras investigações, principalmente aquelas relacionadas às modificações pós-traducionais de toxinas. Consideramos as fosforilações a maior contribuição deste trabalho, uma vez que não haviam sido descritas até então e parecem exercer importante papel na função das toxinas. Em síntese, acreditamos que esse trabalho poderá contribuir para que terapias mais eficientes para as vítimas de acidentes de abelhas sejam desenvolvidas em um futuro próximo.

Anexo A

Lista de peptídeos e proteínas identificados para o veneno da abelha africanizada após utilização de gradiente de 2h na separação cromatográfica.

Número de Acesso	Probabilidade da Proteína	Nome da Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de Peptídeos Identificados	Sequências dos peptídeos identificados (MASCOT Íon Escore)
110756431	100%	hypothetical protein LOC725074	8691.24	1	HGDSCVSSDCCPGTWCHTYANR (71.2)
110758297	100%	phospholipase A2-like	21147.65	6	VYFNDIIPK (73.92) KYQWFDLPSF (38.28) HNLWNASLFLR (34.58) KHNLWNASLFLR (39.34) CFELEHPIIGCK (33.54) NYNDLGFNHITDACC (61.82)
187281543	100%	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	88338.11	6	AQLVLYDTK (29.87) VPFNLEETYDQSFR (72.24) TDREILYSDNYVGD (31.37) AGTTNPFVSLVIDLHDPSSK (46.79) QISIWEENR (21.61) DGEIVATWTNR (39.47)
187281550	100%	venom carboxylesterase-6 precursor	63938.35	12	LFNIDFEK (50.29) TIPFNENKLN (31.11) NIVFVAINYR (46.68) SPVWTTYYSYR (28.08) EGLYTAAEFVDNAK (70.88) GISISGVAFCPWAQTK (65.3) INKSPVWTTYYSYR (63.06) RGISISGVAFCPWAQTK (31.95) LYEAYEGIPYAQSPVGK (46.44) KSSVCMQYLMFTTHG (35.64) SDRLYEAYEGIPYAQSPVGK (33.26) SGPINYDKVESIIQMMSDR (33.95)
221325614	100%	C1q-like venom protein precursor	17145.87	2	AVFAETLVDK (51.97) LSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (34.2)

Continua

Continuação

328782499	100%	proactivator polypeptide isoform 1	103056.81 11511.84	12	SIINLIK (22.69) IMGICPTPGK (22.09) YASSIIDITK (50.21) QITLSETEPNV (25.36) LCDPTEHLGPR (31.7) QVCSFLGVCTK (54.12) VCQYLPSNMEHK (23.16) NKVENAVHSVCNHLPK (26.16) VFQANANENLKNDNEELNK (23.45) ETCALCEYILHFIEAITNPTTEEK (29.8) CTILINSYGK (40.55) ADFAPPKQITLSETEPNV (23.39)
328787755	100%	hypothetical protein LOC100577054	24271.94	4	GEVCVPYLGCIK (34.82) DDKDVPEVHVIR (32.39) CIVKDDKDVPEVHVIR (21.03) DTDCTKGEVCVPYLGCIK (28.42)
328787985	100%	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	61891.91	1	AHIAEHMEVPIDTSK (22.61)
328789222	100%	nucleobindin-2-like	37194.82	2	TFEIQDLK (27.2) LENALDSDIR (49.75)
328789531	100%	hypothetical protein LOC408666	22743.57	9	DISFFSSSSR (21.23) MWHPDLCSCFCR (27.66) ETANPALEGGPSGGGIGELAK (66.42) ETQECSTGFYFDQNSCR (78.26) CGGCCTHSLSCQPTATEIR (34.01) IVFPDRGRETANPALEGGPSGGGIGELAK (27.44) NFEILVTILESSGK (27.79) DVPKDISFFSSSSR (21.52) LVKDVPKDISFFSSSSR (30.02)

Continua

Continuação

335892796	100%	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	19044.99	6	IEIGLFGK (28.86) TVENFIELSK (40.63) VISEFMIQGGDFTK (41.58) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSKEDATD (40.84) VISEFM[15.99492]IQGGDFTK (80.48) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSK (57.84)
5627	100%	phospholipase A-2	47325.96	26	SSGPNELGR (27.65) LSCDCDDK (25.88) CLHYTVDK (27.89) VYQWFDLR (24.25) MYFNLIDTK (26.87) M[15.99492]YFNLIDTK (21.78) FKHTDACC (23.59) HGLTNTASHT (53.28) LEHPVTGCGER (31.1) VYQWFDLRK (25.38) NSADTISSYFVGK (57.24) VYQWFDLRKY (26.53) CLHYTVDKSKPK (26.25) SKPKVYQWFDLR (25.37) IIPGTLWCGHGNK (64.53) THDMCPDVMSAGESK (60.73) THDM[15.99492]CPDVMSAGESK (64.45) THDMCPDVM[15.99492]SAGESK (40.93) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESK (22.02) CYKLEHPVTGCGER (38.86) LSCDCDDKFYDCLK (35.9) FYDCLKNSADTISSYFVGK (24.12) THDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHT (39.75) THDM[15.99492]CPDVMSAGESKHGLTNTASHT (52.71) IGDNELEER (55.61) MYFNLIDTKCYK (27.47)
58585070	100%	major royal jelly protein 8 precursor	80033	9	IEIDMCDR (52.9) LTSSTFASDPR (64.34) ILIANVNDLIK (45.71) NKETLQAITGLK (50.23) YIDYDFGSDEKR (45.02) SVCPPQLLVFDLNTSQLLK (71.19) SQYQANNVHYQGKENILWTQASAK (61.06) TFVIIMK (21.69) VIYGFDNDVNFR (25.29)
58585086	100%	transferrin 1 precursor	46399.08	1	LASNAGYNVIEQVR (53.56)

Continua

Continuação

58585116	100%	venom serine protease 34 precursor	7580.02	0	
58585154	100%	melittin precursor	44459.59	4	VLTTGLPALISWIK (72.68) VLTTGLPALISWIKR (37.79) VLTTGLPALISWIKRK (23.9) VLTTGLPALIS[79.96632]WIKRK (33.87)
58585182	100%	hyaluronidase precursor	24830.22	21	VLPYYWYK (28.66) DHLINQIPDK (26.64) EHPFWDDQR (22.9) QNWASLQPYK (41.97) YGILQNWMDK (48.68) YGILQNWM[15.99492]DK (48.67) EYLNNELGPAVK (54.59) QNWASLQPYKK (38.12) KKVLPYYWYK (18.14) EYLNNELGPAVKR (34.5) YGILQNWMDKFR (26.58) EHPFWDDQRVEQEAK (47.77) EFNVYWNVPTFMCHK (51.5) HLQVFRDHLINQIPDK (34.09) EFNVYWNVPTFM[15.99492]CHK (50.3) SFPGVGVIDFESWRPIFR (26.68) KITDLGADGFIIWGSSDDINTK (42.14) DHLINQIPDKSFPGVGVIDFESWRPIFR (31.36) YGQLFM[15.99492]EETLK (49.44) YGILQNWM[15.99492]DKFR (23.3) MSWLFESDVLPSVYLR (42.33)
60115688	100%	icarapin-like precursor	48942.65	5	NVDTVLVLPSIER (47.4) KNVDTVLVLPSIER (62.98) SVESVEDFDNEIPK (62.32) SVESVEDFDNEIPKNQGDVLTA (30.77) EQMAGILSR (25.12)
67010041	100%	major royal jelly protein 9 precursor	44105.54	10	LTSSTFVYDPR (29.87) YFDYNFGSDEK (64.93) NDGVPSSLNVISNK (35.86) QNEIYIIVSNK (26.61)

Continua

Continuação

					IANGDLNFNEVNFR (57.5) TQNLYYSAMSSSHNLNYVNTK (29.37) FQANDIQYQGASDILWTQASAK (48.38) ILNAPVNQLIR (46.44) YTINDESFSLQDGILGMALSHK (43.88) AISETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLK (57.73)
74835477	100%	venom allergen acid phosphatase	10382.27	6	EYQLGQFLR (39.01) IVYYLGIPSEAR (43.14) MREYQLGQFLR (29.82) ELQLPGCEVLCPLYK (76.87) LQQWNEDLNWQPIATK (58.27) YLQLIENVIPSNEELICDKR (41.66)
94400907	100%	allergen Api m 6 precursor	6464.06	4	ICAPGCVCR (24.15) CPSNEIFSR (45.36) FCPNVVPKPLCIK (34.75) GKCPSNEIFSR (22.32)
328781841	99.9%9	mast cell degranulating peptide-like	101571.36	3	IIIPHCWK (22.91) IIIPHM[15.99492]CWK (22.9) IIIPHCWKK (19.03)
328788558	99.9%	putative cysteine proteinase CG12163-like	43093.49	0	
328790726	99.9%	venom acid phosphatase Acph-1-like	53782.57	0	
226533687	99.9%	venom serine carboxypeptidase precursor	8844.77	3	WALDLITR (26.79) TVDSLTEVLVR (41.23) KVWFGNELAGYSK (26.78)
58585180	99.9%	secapin preproprotein	202117.23	2	YIIDVPPR (36.24) YIIDVPPRCPPGSK (42.41)
58585104	99.8%	vitellogenin precursor	27696.61	0	

Continua

Conclusão

110751310	99.6%	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	15589.97	1	VFEETLPEIQR (25.03)
94158822	99.5%	odorant binding protein 14 precursor	18421.27	2	AVMELLIDENSVK (57.57) QLVSDCSTISEENPHLK (42.51)
328779578	98.3%	lysozyme c-1	8691.24	3	TASSYSFGIFQINSAK (93.41) CEDFADDDIRDDIECAKK (23.39) RCEDFADDDIRDDIECAK (25.07)

Anexo B

Lista de peptídeos e proteínas identificados para o veneno da abelha *A. m. carnica* após utilização de gradiente de 2h na separação cromatográfica.

Número de Acesso	Probabilidade da Proteína	Nome da Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de Peptídeos Identificados	Sequências dos peptídeos identificados (MASCOT Íon Escore)
110756431	100%	hypothetical protein LOC725074	8691.24	2	HGDSCVSSDCCPGTWCHTYANR (67.84) ITEEELMK (43.12)
110758297	100%	phospholipase A2-like	21147.65	10	INTIVPSTK (25.48) VYFNDIIPK (55.79) HNLWNASLFLR (52.38) KHNLWNASLFLR (62.64) CFELEHPIIGCK (39.54) CFELEHPIIGCKK (34.71) RKHNWNASLFLR (25.56) NYNDLGFNHITDACC (66.81) AKNYNDLGFNHITDACC (28.66) KYQWFDLPSF (45.94)
187281543	100%	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	88338.11	3	VPFNLEETYDQSFR (96.85) AGTTNPFVSLVIDLHDPSSK (31.78) AQLVLYDTK (38.2)
187281550	100%	venom carboxylesterase-6 precursor	63938.35	13	WVFNNIK (18.98) LFNIDFEK (43.31) TIPFNENKLN (20.78) NIVFVAINYR (55.57) SPVWTTYYSYR (38.45) EGLYTAAEFVDNAK (46.52) GISISGVAFCPWAQTK (37.89) INKSPVWTTYYSYR (25.6) RGISISGVAFCPWAQTK (30.17)

Continua

Continuação

					LYEAYEGIPYAQSPVGK (56.24) SSVCMQYLMFTTHGNR (24.18) SDRLYEAYEGIPYAQSPVGK (40.07) SGPINYDKVESIIQMMSDR (38.03)
221325614	100%	C1q-like venom protein precursor	17145.87 103056.81	2	AVFAETLVDK (49.5) LSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (32.87)
328782499	100%	proactivator polypeptide isoform 1	11511.84	9	SIINLIK (23.57) IMGICPTPGK (48.79) CTILINSYGK (47.1) YASSIIDITK (30.04) DYSAISLENLR (49.49) QVCSFLGVCTK (47.23) HMKVPNDDDSVCTICK (43.06) ADFAPPKQITLSETEPNV (24.61) LCDPTEHLGPR (23.53)
328787755	100%	hypothetical protein LOC100577054	24271.94	5	GEVCVPYLGCIK (21.88) CIVKDDKDVPEVHVIR (24.1) DTDCTKGEVCVPYLGCIK (51.82) KDTDCTKGEVCVPYLGCIK (24.45) DDKDVPEVHVIR (53.88)
328787985	100%	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	61891.91	1	AHIAEHMEVPIDTSK (26.51)
328789222	100%	nucleobindin-2-like	37194.82	3	TFEIQDLK (24.43) LENALDSDIR (51.34) IAEELQFVNR (66.88)

Continua

Continuação

328789531	100%	hypothetical protein LOC408666	22743.57	17	DISFFSSSSR (37.23) NFEILVTILESSGK (49.51) DVPKDISFFSSSSR (21.25) MWHPLCSCFCR (36.9) NFEILVTILESSGKLK (68.73) LVKDVPKDISFFSSSSR (26.67) ETANPALEGGPSGGGIGELAK (73.1) ETQECSTGFYFDQNSCR (84.49) GRETANPALEGGPSGGGIGELAK (69.66) QSYVPEECTCACNNVDEQK (57.2) QSYVPEECTCACNNVDEQKK (32.05) KQSYVPEECTCACNNVDEQK (27.92) IVFPDRGRETANPALEGGPSGGGIGELAK (28.71) IVPIEHTQCTCDCK (33.72) CGGCCTHSLSCQPTATEIR (22.93) KQSYVPEECTCACNNVDEQKK (28.34) SNAERPQNQALCMPELQTVPLLENPSVIYYPTCTR (33.06)
335892796	100%	peptidyl-prolyl cis- trans isomerase B precursor	19044.99	4	IEIGLFGK (18.6) TVENFIELSK (50.2) VISEFMIQGGDFTK (50.5) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFVSKEDATD (51.71)
5627	100%	phospholipase A-2	47325.96	25	SSGPNELGR (24.2) LSCDCDDK (33.14) CLHYTVDK (26.45) IGDNELEER (55.92) VYQWFDLR (36.03) MYFNLIDTK (45.88) M[15.99492]YFNLIDTK (43.09) HGLTNTASHTR (22.5) LEHPVTGCGER (37.67) VYQWFDLRK (21.64) NSADTISSYFVGK

Continua

Continuação

					(74.51) VYQWFDLRKY (21.89) SKPKVYQWFDLR (34.75) MYFNLIDTKCYK (42.24) IIYPGTLWCGHGNK (21.43) THDMCPDVMSAGESK (38.92) THDM[15.99492]CPDVMSAGESK (37.34) THDMCPDVM[15.99492]SAGESK (29.66) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESK (23.52) CYKLEHPVTGCGER (50.97) LSCDCDDKFYDCLK (22.89) FYDCLKNSADTISSYFVGK (30.67) THDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHT (41.07) THDM[15.99492]CPDVMSAGESKHGLTNTASHT (54.94) FKHTDACC (19.49)
58585070	100%	major royal jelly protein 8 precursor	80033	13	TFVIIMK (31.1) IEIDMCDR (53.56) ILIANVNDLIK (42.3) NKETLQAITGLK (36.62) YIDYDFGSDEK (39.98) LWVLDSGLINNVR (53.56) YIDYDFGSDEKR (36.84) VIYGFDFNDVNFR (30.22) ISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (39.62) GISDNGVLFFGLVGDTSLACWNENR (40.74) SQYQANNVHYQGKENILWTQASAK (52.56) LTSSTFASDPR (71.94) SVCPPQLLVFDLNTSQLLK (72.91)
58585086	100%	transferrin 1 precursor	46399.08	0	

Continua

Continuação

58585116	100%	venom serine protease 34 precursor	7580.02	6	MTVILTPPGR (53.37) CTWTITSYHR (22.34) LAIVVGEHDWSSK (22.26) TYEPGMICGATIISK (40.26) YVLTAACIIDENTTK (28.16) RYVLTAACIIDENTTK (39.3)
58585154	100%	melittin precursor	44459.59	4	VLTTGLPALISWIK (60.01) VLTTGLPALISWIKR (35.6) VLTTGLPALISWIKRK (57.75) VLTTGLPALIS[79.96632]WIKRK (33.23)
58585182	100%	hyaluronidase precursor	24830.22	30	LTVDVSDQV (33.42) VLPYYWYK (34.12) QNWASLQPYK (54.46) KVLPPYYWYK (22.45) YGILQNWMDK (45.52) YGILQNWM[15.99492]DK (42.48) EYLNNELGPAVK (56.22) YGQLFMEETLK (61.29) QNWASLQPYKK (32.4) YGQLFM[15.99492]EETLK (48.74) KKVLPYYWYK (49.64) EYLNNELGPAVKR (43.74) YGILQNWMDKFR (27.64) YGILQNWM[15.99492]DKFR (22.58) EHPFWDDQRVEQEAK (22.07) EFNVYWNVPTFMCHK (44.01) HLQVFRDHLINEIPDK (29.14) GEEIAILYDPGMFPALLK (72.58) EFNVYWNVPTFM[15.99492]CHK (22.75) SFPVGVIDFESWRPIFR (20.11) MSWLFESDVLLPSVYLR (68.53) M[15.99492]SWLFESDVLLPSVYLR (78.58)

Continua

Continuação

					ITDLGADGFIIWGSSDDINTK (71.72) KITDLGADGFIIWGSSDDINTK (43.75) GEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (45.21) DHLINQIPDKSFPGVGVDFESWRPIFR (36.29) YGILQNWM[15.99492]DKFRGEEIAILYDPGMFPALLK (27.29) DHLINQIPDK (34.84) EHPFWDDQR (34.73) FRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (65.5)
60115688	100%	icarapin-like precursor	48942.65	6	IPEQGVVWNK (36.49) NVDTVLVLPSIER (62.49) KNVDTVLVLPSIER (74.72) SVESVEDFDNEIPK (62.45) SVESVEDFDNEIPKNQGDVLT (36.24) EQMAGILSR (22.4)
67010041	100%	major royal jelly protein 9 precursor	44105.54	12	ILNAPVNQLIR (54.95) LTSSTFVYDPR (43.01) YFDYNFGSDEK (54.72) NDGVPSSLNVISNK (34.4) QNNEYIWIVSNK (34.11) IANGDLNFNEVNR (57.21) TQNLYYSAMSSHNLNYVNTK (42.3) YTINDESFLQDGILGMALSHK (52.05) FQANDIQYQGASDILWTQASAK (56.05) AISETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLK (56.86) YFDYNFGSDEKR (21.9) QNNEYIWIVSNKYQK (30.12)
74835477	100%	venom allergen acid phosphatase	10382.27	5	IVYYLGIPSEAR (55.97) MREYQLGQFLR (49.16) ELQLPGCEVLCPLYK (60.56)

Continua

Conclusão

					LQQWNEDLNWQPIATK (57.63) YLQLIENVIPSNEELICDKR (36.71)
94400907	100%	allergen Api m 6 precursor	6464.06	3	ICAPGCVCR (31.83) GKCPSNEIFSR (26.44) FCPNVVPKPLCIK (27.82)
328781841	99.9%9	mast cell degranulating peptide-like	101571.36	3	IIIPHMCWK (19.49) IIIPHM[15.99492]CWK (28.97) IIIPHMCWKK (19.42)
328788558	99.9%	putative cysteine proteinase CG12163-like	43093.49	2	QVVSGYLYK (24.1) KDEVQEEIYPTKK (19.38)
328790726	99.9%	venom acid phosphatase Acph-1-like	53782.57	5	LLQTIFR (34.1) QISAGIWIR (22.82) NIGLELPEWTK (37.56) YENFLGEIYTK (34.19) VFLLYQYLFQDR (86.76)
226533687	99.9%	venom serine carboxypeptidase precursor	8844.77	4	WALDLITR (33.29) TVDSLTEVLVR (47.59) KVWFVGNELAGYSK (38.43) CHNLLYIDNPVGTGFSFTEDER (67.33)
58585180	99.9%	secapin preproprotein	202117.23	2	YIIDVPPR (38.08) YIIDVPPRCPPGSK (47.48)
58585104	99.8%	vitellogenin precursor	27696.61	0	
110751310	99.6%	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	15589.97	3	ILEKGDVVFVQTEQTR (25.55) SGIYLGLPGCVEQLDR (46.4) VFEETLPEIQR (28.58)
94158822	99.5%	odorant binding protein 14 precursor	18421.27	2	AVMELLIDENSVK (55.81) QLVSDCSTISEENPHLK (24.93)
328779578	98.3%	lysozyme c-1	8691.24	3	TASSYSFGIFQINSAK (94.08) RCEDFADDDIRDDIECAK (28.49) CEDFADDDIRDDIECAK (64.17)

Anexo C

Lista de peptídeos e proteínas identificados para o veneno da abelha *A. m. ligustica* após utilização de gradiente de 2h na separação cromatográfica.

Número de Acesso	Probabilidade da Proteína	Nome da Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de Peptídeos Identificados	Sequências dos peptídeos identificados (MASCOT Íon Escore)
110756431	100%	hypothetical protein LOC725074	8691.24	2	ITEEELMK (29.44) HGDSCVSSSDCCPGTWCHTYANR (68.15)
110758297	100%	phospholipase A2-like	21147.65	9	VYFNDIIIPK (48.4) KYQWFDLPSF (46.9) HNLWNASLFLR (34.91) KHNLWNASLFLR (37.29) CFELEHPIIGCK (49.44) CFELEHPIIGCKK (26.27) RKHNLWNASLFLR (22.37) NYNDLGFNHITDACCR (28.56) AKNYNDLGFNHITDACCR (33)
187281543	100%	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	88338.11	9	AQLVLYDTK (28.39) QISIWEENR (23.44) VPFNLEETYDQSFR (76.99) YGSPGNSRDQYPNEIR (23.81) TDREILYSDNYVGDIR (39.82) GNANNIYEEETEGWLR (58.65) FWANCLGYSH (26.51) EILYSDNYVGDIR (57.37) NLYSVQLSGNEPPVCLSCDVLTPENR (30.34)
187281550	100%	venom carboxylesterase-6 precursor	63938.35	11	LFNIDFEK (31.1) TIPFNENKLN (38.67) NIVFVAINYR (52.98) SPVWTTYYSYR (25.51) EGLYTAAEFVDNAK (76.5) GISISGVAFCPWAQTK (23.02) INKSPVWTTYYSYR (22.64) LYEAYEGIPYAQSPVGK (45.07) SGPINYDKVESIIQMMSDR (38.23) SDRLYEAYEGIPYAQSPVGK (32.3) WVFNNIK (18.38)

Continuação

Continuação

221325614	100%	C1q-like venom protein precursor	17145.87	2	AVFAETLVDK (43.1) LSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (27.6)
328782499	100%	proactivator polypeptide isoform 1	103056.81	15	SIINLIK (22.12) IMGICPTPGK (31) CTILINSYGK (42.89) LCEQLVGHLK (27.87) YASSIIDITK (62.06) QITLSETEPNV (25.89) LCDPTEHLGPR (28.33) QVCSFLGVCTK (47.19) VCQYLPSNMEHK (23.04) LVPFPM[15.99492]LGESLGTQGK (38.01) FVNKYASSIIDITK (26.38) NKVENAVHSVCNHLPK (20.62) HMKVPNDDDSVCTICK (50.46) ADFAPPKQITLSETEPNV (24.72) GLNCNIICK (26.52)
			11511.84	3	GEVCVPYLGCIK (31.4) CIVKDDKDVPEVHVIR (22.68) DTDCTKGEVCVPYLGCIK (51.16)
328787755	100%	hypothetical protein LOC100577054	24271.94	1	AHIAEHMEVPIDTSK (24.08)
328787985	100%	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	61891.91	3	TFEIQDLK (33.47) LENALDSDIR (55.94) IAEELQFVNR (79.84)
328789222	100%	nucleobindin-2-like	37194.82	16	DISFFSSSSR (34.24) NFEILVTILESSGK (25.67) DVPKDISFFSSSSR (30.52) MWHPDLCSCFCR (33.56) IVPIEEHTQCTCDCK (31.27) LVKDVPKDISFFSSSSR (36.11) ETANPALEGGPSGGGIGELAK (68.78) RIVPIEEHTQCTCDCK (22.17) ETQECSTGFYFDQNSCR (43.53) GRETANPALEGGPSGGGIGELAK (97.57) CGGCCTHSLSCQPTATEIR (29.19) QSYVPEECTCACNNVDEQK (37.52)

Continua

Continuação

					QSYVPEECTCACNNVDEQKK (44.06) FGQTQRPDNPVPPVIALDSDDPR (34.27) KQSYVPEECTCACNNVDEQKK (26.67) SNAERPQNALCM[15.99492]PELQTVPLLENPSVIYYPTCTR (23.73)
328789531	100%	hypothetical protein LOC408666	22743.57	6	IEIGLFGK (18.51) TVENFIELSK (43.3) VISEFMIQGGDFTK (72.63) VISEFM[15.99492]IQGGDFTK (76.12) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSK (44.08) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSKEDATD (52.39)
335892796	100%	peptidyl-prolyl cis- trans isomerase B precursor	19044.99	24	SSGPNELGR (27.8) LSCDCDDK (32.55) CLHYTVDK (30.77) VYQWFDLR (34.7) MYFNLIDTK (19.84) M[15.99492]YFNLIDTK (33.67) FKHTDACCR (22.02) HGLTNTASHTR (39.35) LEHPVTGCGER (40.52) VYQWFDLRK (20.66) NSADTISSYFVGK (54.07) SKPKVYQWFDLR (38.83) IYPGTLWCGHGNK (21.74) THDMCPDVMSAGESK (48.15) THDM[15.99492]CPDVMSAGESK (33.4) THDMCPDVM[15.99492]SAGESK (35.66) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESK (23.83) CYKLEHPVTGCGER (35.6) LSCDCDDKFYDCLK (25.06) FYDCLKNSADTISSYFVGK (34.74) THDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (48.77)

Continua

Continuação

					THDM[15.99492]CPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (28.13) THDMCPDVM[15.99492]SAGESKHGLTNTASHTR (24.75) LSCDCDDKFYDCLKNSADTISSYFVGK (25.75)
5627	100%	phospholipase A-2	47325.96	12	TFVIIMK (21.25) IEIDMCDR (52.81) LTSSTFASDPR (54.71) ILIANVNDLIK (41.32) NKETLQAITGLK (44.4) YIDYDFGSDEK (52.71) LWVLDSGLINNVR (59.59) YIDYDFGSDEKR (43.17) SVCPPQLLVFDLNTSQLLK (67.82) SQYQANNVHYQGKENILWTQASAK (22.11) VIYGDFDNDVNFR (79.16) GISDNGVLFFGLVGDTSLACWNENR (49.24)
58585070	100%	major royal jelly protein 8 precursor	80033	7	ALSSLFSK (20.88) YLDVIER (22.37) DLALICPDGGR (24.24) WCTWSEGDLEK (26.38) IFTICVPEIYSK (36.82) LASNAGYNVIEQVR (60.72) SENEAADFFSGSCAPGAPLDSK (82.14)
58585086	100%	transferrin 1 precursor	46399.08	11	YPLPYSGSK (22.53) MTVILTPPGR (24.92) CTWTITSYHR (30.03) LAIVVGEHDWSSK (23.89) TTLNMLTQVECYK (62.68) TYEPGMICGATIISK (50.92) YVLTAACIIDENTTK (39.69) RYVLTAACIIDENTTK (34.19) CSLVEFSENKNCNAGSLTVK (22.82) CSLVEFSENKNCNAGSLTVKK (26.53) YDIIKDDWQINDIALLK (45.07)
58585116	100%	venom serine protease 34 precursor	7580.02	4	VLTTGLPALISWIK (75.02) VLTTGLPALISWIKR (60.07) VLTTGLPALISWIKRK (28.27) VLTTGLPALIS[79.96632]WIKRK (26.15)

Continua

Continuação

58585154	100%	melittin precursor	44459.59	29	LSVEVVR (44.37) LTVDVSVDQV (41.63) VLPYYWYK (36.25) DHLINQIPDK (28.39) EHPFWDDQR (25.32) QNWASLQPYK (44.81) KVLPPYYWYK (22.16) YGILQNWMDK (52.98) YGILQNWM[15.99492]DK (44.85) EYLNNELGPAVK (47.71) YGQLFMEETLK (78.93) QNWASLQPYKK (41.35) YGQLFM[15.99492]EETLK (54.59) KKVLPYYWYK (27.89) EYLNNELGPAVKR (56.48) YGILQNWMDKFR (29.45) EHPFWDDQRVEQEA (43.41) EFNVYWNVPTFMCHK (34.41) HLQVFRDHLINQIPDK (23.68) EFNVYWNVPTFM[15.99492]CHK (53.17) SFPGVGVDFESWRPIFR (21.88) MSWLFESDVLLPSVYLR (65.76) M[15.99492]SWLFESDVLLPSVYLR (71.21) ITDLGADGFIIWGSSDDINTK (97.28) KITDLGADGFIIWGSSDDINTK (47.1) DHLINQIPDKSFPGVGVDFESWRPIFR (21.9) ADLEATLR (54.21) GEEIAILYDPGMFPALLK (47.11) GEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (30.73)
58585182	100%	hyaluronidase precursor	24830.22	8	EQMAGILSR (32.86) VREQMAGILSR (34.39) IPEQGVVWNK (48.76) NVDTVLVLPISIER (74.6) KNVDTVLVLPISIER (100.72) SVESVEDFDNEIPK (47.42) SVESVEDFDNEIPKNQGDVLTA (33.02) SVES[79.96632]VEDFDNEIPK (29.43)

Continua

Continuação

60115688	100%	icarapin-like precursor	48942.65	12	ILNAPVNQLIR (50.8) LTSSTFVYDPR (42.38) QAAIQSGEYNYK (45.21) YFDYNFGSDEK (65) NDGVPSSLNVISNK (41.05) QNNEYIWIVSNK (39.59) YFDYNFGSDEKR (21.49) IANGDLNFNEVNFR (63.11) TQNLYYSAMSSHNLNYVNTK (27.29) AISETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLK (61.06) IAIDEWDR (28) FQANDIQYQGASDILWTQASAK (45.14)
67010041	100%	major royal jelly protein 9 precursor	44105.54	15	KLYGGPLLR (18.34) EYQLGQFLR (28.51) IVYYLGIPSEAR (56.25) MREYQLGQFLR (54.39) DPYLYYDFYPLER (30.29) ELQLPGCEVLCPLYK (63) LQQWNEDLNWQPIATK (63.53) FVDESANNLSIEELDFVK (95.78) RFVDESANNLSIEELDFVK (33.93) YLQLIENVIPSNEELICDKR (34.66) NEMYPKDPYLYYDFYPLER (40.89) RYEDNIFLPEDCLLFTIELDK (25.09) MSLQLVLAALYPPNKLQQWNEDLNWQPIATK (21.3) QINVIFR (34.77) YGDFLGDIYTEESVSALSSFYDR (50.94)
74835477	100%	venom allergen acid phosphatase	10382.27	4	ICAPGCVCR (25.4) CPSNEIFSR (46.82) GKCPSNEIFSR (21.85) FCPNVVPKPLCIK (20.14)
94400907	100%	allergen Api m 6 precursor	6464.06	2	IIIPHMCWK (18.89) IIIPHM[15.99492]CWK (19.84)
328781841	99.9%9	mast cell degranulating peptide-like	101571.36	3	QVVSGYLYK (22.41) LTFDLIPICK (43.76) QHELGDINVLK (30.28)

Continua

Conclusão

328788558	99.9%	putative cysteine proteinase CG12163-like	43093.49	4	LLQTIFR (25.85) YENFLGEIYTK (29.8) VFLLYQYLFQDR (24.53) QISAGIWIR (19.43)
328790726	99.9%	venom acid phosphatase Acph-1-like	53782.57	3	WALDLITR (40.91) TVDSLTEVLVR (35.62) KVWFVGNELAGYSK (37.01)
226533687	99.9%	venom serine carboxypeptidase precursor	8844.77	2	YIIDVPPR (32.92) YIIDVPPRCPPGSK (20.07)
58585180	99.9%	secapin preproprotein	202117.23	4	MDFNVDIR (50.91) VGFVTPFEHR (24.67) ILSVFEPYLEGK (45.08) VMTRPDTDSENWTPK (27.77)
58585104	99.8%	vitellogenin precursor	27696.61	5	TDPILFVAEK (18.49) DSHDLLVAEVR (28.01) VFEETLPEIQR (27.27) ILEKGDVVFVQTEQTR (25.73) SGIYLGLPGCVEQLDR (33.76)
110751310	99.6%	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	15589.97	1	QLVSDCSTISEENPHLK (44.01)
94158822	99.5%	odorant binding protein 14 precursor	18421.27	2	AWDGWMK (16.13) TASSYSFGIFQINSAK (72.52)
328779578	98.3%	lysozyme c-1	8691.24	2	ITEEELMK (29.44) HGDSCVSSSDCCPGTWCHTYANR (68.15)

Anexo D

Lista de peptídeos e proteínas identificados para o veneno da abelha africanizada após utilização de gradiente de 6h na separação cromatográfica.

Número de Acesso	Probabilidade da Proteína	Proteína	Número de Peptídeos identificados	Massa Molecular (Da)	Sequências dos peptídeos identificados (MASCOT Ion Score)
110751310	100%	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	5	27696.61	TDPILFVAEK (18.29) DSHDLVAEVR (44.04) GDVVFVQTEQTR (28.32) VFEETLPEIQR (34.68) SGIYLGLPGCVEQLDR (28.33)
110756431	100%	hypothetical protein LOC725074	3	8691.24	ITEEELMK (42.47) HGDSCVSSSDCCPGTWCHTYANR (28.6) ITEEELMKQR (32.42)
110758297	100%	phospholipase A2-like	8	21147.65	VYFNDIIPK (27.3) KYQWFDLPSF (42.64) HNLWNASLFLR (23.36) KHNLWNASLFLR (50.2) CFELEHPIIGCK (26.4) RKHNLWNASLFLR (22.16) NYNDLGFNHITDACC (59.8) AKNYNDLGFNHITDACC (38.15)
187281543	100%	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	4	88338.11	AQLVLYDTK (29.68) VPFNLEETYDQSFR (56.38) TDREILYSDNYVGDIR (38.21) AGTTNPFVSLVIDLHDPSSK (25.43)
187281550	100%	venom carboxylesterase-6 precursor	22	63938.35	VSTFTGNIR (46.79) LFNIDFEK (27.94) TIPFNENKLN (21.02) NIVFVAINYR (36.65) MIDCLQSRPAR (32.17) SPVWTTYYSYR (42.96) EGLYTAAEFVDNAK (40.75) GISISGVAFCPWAQTK (65.11) GSEDCLYINIYVPVR (36.36) RGISISGVAFCPWAQTK (24.31) LYEAYEGIPYAQSPVGK (59.03) VKGSEDCLYINIYVPVR (19.07) SSVCMQYLMFTTTHGNR (79.07) KSSVCMQYLMFTTTHGNR (44.07) SGPINYDKVESIIQMMSDR (100.02) SGPINYDKVESIIQM[15.99492]MSDR (41.97) SDRLYEAYEGIPYAQSPVGK (36.94)

Continua

Continuação

					VKGSEDCLYINIYVPVRNNR (28.61) LGPFGFLSTGDIVVPGNMGLKDQSM[15.99492]ALR (41.46) WVFNNIK (19.42) VESIIQMMSDR (31.73) INKSPVWTTYYSYR (47.42)
221325614	100%	C1q-like venom protein precursor	5	17145.87	ISDGVTFSGYR (64.15) LSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (38.89) ISTVNPSKLSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (22.42) GVGYVPQTGIFITNCPGLYQFSFAGYGSTDLR (54.45) AVFAETLVDK (38.19)
226533687	100%	venom serine carboxypeptidase precursor	6	53782.57	WALDLITR (41.18) TVDSLTEVLVR (49.19) VWFVGNELAGYSK (22.41) KVWFVGNELAGYSK (50.04) ADVMQSLAVLIADLTQHRY (25.79) CHNLLYIDNPVGTGFSFTEDER (68.42)
328780886	100%	apolipophorins-like	0	85159.9	
328782499	100%	proactivator polypeptide isoform 1	14	103056.8	SIINLIK (30.83) IMGICPTPGK (20.87) CTILINSYGK (22.86) LCEQLVGHLK (22.98) QITLSETEPNV (34.8) DYSAISLENLR (55.36) LCDPTEHLGPR (21.6) QVCSFLGVCTK (56.43) VCQYLP SNMEHK (27.25) NKVENAVHSVCNHLPK (22.92) ADFAPPKQITLSETEPNV (32.48) VFQANENLNKNDNEELNK (27.22) ETCALCEYILHFIEAITNPTTEEK (25.96) YASSIIDITK (45.31)
328787755	100%	hypothetical protein LOC100577054	4	11511.84	GEVCVPYLGCIK (31.08) CIVKDDKDVPEVHVIR (21.41) DTDCTKGEVCVPYLGCIK (65.67) KDTDCTKGEVCVPYLGCIK (38.46)
328788558	100%	putative cysteine proteinase CG12163-like	6	101571.4	QVVSGLYLYK (21.6) KDEVQEEIYPTKK (19.65) NAIEQSECSVQLNSSFK (27.92) ICLVTFEEKPWQQSSR (28.42) SELVGASSYIDINNPTVQELANK (55.49) LTFDLIPICK (19.29)
328789222	100%	nucleobindin-2-like	2	61891.91	IAEELQFVNR (42.25) LYAQGAPQDDFLK (32.84)
328789531	100%	hypothetical protein LOC408666	18	37194.82	DISFFSSSSR (33.15) NFEILVTILESSGK (38.93) DVPKDISFFSSSSR (21.65)

Continua

Continuação

					MWHPDLCSCFCR (26.34) M[15.99492]WHPDLCSCFCR (40.07) IVPIEEHTQCTCDCK (74.74) LVKDVPKDISFFSSSSR (22.65) ETANPALEGGPSGGGIGELAK (45.34) RIVPIEEHTQCTCDCK (25.52) ETQECSTGFYFDQNSCR (49.92) GRETANPALEGGPSGGGIGELAK (66.19) CGGCCTHSLSCQPTATEIR (42.16) QSYVPEECTCACNNVDEQK (40.73) QSYVPEECTCACNNVDEQKK (28.21) RCGGCCTHSLSCQPTATEIR (53.43) KQSYVPEECTCACNNVDEQKK (42.72) SNAERPQNQALCMPELQTVPLLENEPSVIYYPTCTR (46.38) SNAERPQNQALCM[15.99492]PELQTVPLLENEPSVIYYPTCTR (46.03)
328790726	100%	venom acid phosphatase Acph-1-like	4	43093.49	LLQTIFR (20.26) NIGLELPEWTK (31.13) LDELAVYDILIR (56.88) FVKPLISINTDEICGQK (33)
335892796	100%	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	8	22743.57	IEIGLFGK (27.19) TVENFIELSK (36.93) VWFDINIDGK (23.83) VISEFMIQGGDFTK (69.12) VISEFM[15.99492]IQGGDFTK (76.98) VTDKVVFDINIDGK (28.52) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSK (39.84) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSKEDATD (27.15)
5627	100%	phospholipase A-2	33	19044.99	FYDCLK (16.15) SSGPNELGR (29.27) HTDACCR (21.46) LSCDCDDK (14.37) CLHYTVDK (31.48) VYQWFDLR (43.39) MYFNLIDTK (44.05) M[15.99492]YFNLIDTK (30.72) FKHTDACCR (26.46) HGLTNTASHTR (42.97) LEHPVTGCGER (20.48) VYQWFDLRK (30.19) NSADTISSYFVGK (72.63) SKPKVYQWFDLR (25.59) MYFNLIDTKCYK (35.86) IYPGTLWCGHGNK (27.93)

Continua

Continuação

					THDMCPDVMSAGESK (43.45) THDM[15.99492]CPDVMSAGESK (51.22) THDMCPDVM[15.99492]SAGESK (45.58) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESK (21.92) CYKLEHPVTGCGER (43.06) LSCDCDDKFYDCLK (57.81) CYKLEHPVTGCGERTEGR (23.67) FYDCLKNSADTISSYFVGK (71.01) IIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGR (25.94) NSADTISSYFVGKM[15.99492]YFNLIDTK (47.36) THDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (48.54) FKHTDACCRTTHDM[15.99492]CPDVMSAGESK (26.78) THDM[15.99492]CPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (60.32) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESKHGLTNTASHTR (69.54) HGLTNTASHTRLSCDCDDKFYDCLK (23.1) LSCDCDDKFYDCLKNSADTISSYFVGK (30.19) IGDNELEER (63.07)
58585070	100%	major royal jelly protein 8 precursor	16	47325.96	TFVIIMK (29.85) IEIDMCDR (39.13) LTSSTFASDPR (77.68) ILIANVNDLIK (33.38) ENILWTQASAK (55.23) NKETLQAITGLK (46.29) LWVLDSGLINNVR (51.1) YIDYDFGSDEKR (37.47) VIYGDFDNVDNFR (41.91) TGNGGPLLAPYPDWTWAK (56.28) SVCPPQLLVFDLNTSQLLK (86.3) ISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (25.23) RISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (19.56) GISDNGVLFFGLVGDTSACWNENR (67.56) SQYQANNVHYQGKENILWTQASAK (56.93) YIDYDFGSDEK (40.53)
58585086	100%	transferrin 1 precursor	6	80033	YLDVIER (28.54) WCTWSEGDLEK (25.1) IFTICVPEIYSK (30.47) LASNAGYNVIEQVR (42.54) ALSSLFSK (20.32) FFGLPVGVTAAIPTSENPADYR (23.3)

Continua

Continuação

58585104	100%	vitellogenin precursor	0	202117.2	
58585108	100%	major royal jelly protein 2 precursor	18	51440.52	TFVTILR (33.2) TLQMIAGMK (23.36) SLNVIHEWK (26.99) MTIDGESFTLK (42.42) QNLEMVAQNDR (37.19) QNLEM[15.99492]VAQNDR (60.68) YFDYDFGSEER (44.48) YDGV PSTLNVISGK (23.28) YFDYDFGSEERR (25.4) IVNDDFNFDVNFR (79.32) LLKPYPDWSFAEFK (41.45) GDALIVYQNADDSFHR (26.19) LLKPYPDWSFAEFKDCSK (22.28) SQFGENNVQYQGSEDI LNTQSLAK (60.44) NGVLFVGLVGNSAVGCWNEHQSLQR (53.96) RQAAIQSGEYDHTKNYPFDVDQWR (40.36) IKEELPHFVGSNKPKVDEYMLVLSNR (33.01) DKTFVTILR (27.1)
58585116	100%	venom serine protease 34 precursor	1	46399.08	GKDACQM[15.99492]DSGGPVLWQNPR (29.24)
58585138	100%	major royal jelly protein 5 precursor	11	70530.99	IAIDKFDR (46.28) DCSGIVSAYK (22.69) LTSNTFDYDPK (35.15) YLDYDFGSDER (25.05) QM[15.99492]NEYMMALSMK (39.91) SLYYVNTKPFM[15.99492]K (21.59) LHVFDLNTSHQLK (22.37) ILGANVNDLIM[15.99492]NTR (36.59) LLQPYPDWSWANYK (41.74) FINNDYNFNEVNFR (68.09) LLQPYPDWSWANYKDCSGIVSAYK (26.09)
58585142	100%	major royal jelly protein 3 precursor	14	61966	VIYEWK (21.44) LLTFDLK (23.46) TFVTIER (21.03) TNTM[15.99492]VYIADEK (42.1) LTSNTFDYDPR (38.12) YEDCSGIVSAFK (28.26) HIDFDFGSDERR (22.25) GGPLLRPYPDWSFAK (25.53) IINNDNFNFDVNFR (71.4) INDPEGNEYMLALSNR (45.64) GEGIMYQNSDDSFHR (21.4) LWVLD SGLVNNNQPM[15.99492]CSPK (25.12) NGVLFLGLVGNSGIACVNEHQVLQR (49.11) TNTMVYIADEK (28.08)

Continua

Continuação

58585154	100%	melittin precursor	6	7580.02	VLTTGLPALISWIK (87.71) VLTTGLPALIS[79.96632]WIK (48.24) VLTT[79.96632]GLPALISWIK (17.33) VLTTGLPALISWIKR (44.13) VLTTGLPALISWIKRK (20.21) VLT[79.96632]TGLPALISWIK (36.95)
58585164	100%	alpha-glucosidase precursor	12	65694.13	DVLDEFPQPK (31.19) MLNDNVFAFSR (26.65) VDALPYICEDMR (24.08) FRDVLDEFPQPK (27.73) VSALGFFILISQDAK (67.1) IYTHDIPETYNVVR (42.8) KLNMFYNNFNNDIK (67.29) YYDYGADFPFNFAFIK (40.61) RVPPTNWVGVFGGSAWSWR (39.01) FLDEPLSGETNDPNKTEYTLK (24.08) TPFQWDDSVSAGFSSSSNTWLR (32.29) NIEPYNNYYIWHPGK (46.88)
58585182	100%	hyaluronidase precursor	33	44459.59	LSVEVVR (27.53) ADLEATLR (56) WNLTSGER (32.87) LTVDVSVQV (36.71) VLPYYWYK (26.36) DHLINQIPDK (42.27) EHPFWDDQR (29.03) QNWASLQPYK (25.36) YGILQNWMDK (50.67) YGILQNWM[15.99492]DK (46.88) EYLNNELGPAVK (54.73) YGQLFMEETLK (58.91) QNWASLQPYKK (35.26) YGQLFM[15.99492]EETLK (31.97) KKVLPYYWYK (19.85) EYLNNELGPAVKR (55.72) YGILQNWMDKFR (25.82) YGILQNWM[15.99492]DKFR (21.25) EHPFWDDQRVEQEA (21.98) EFNVYWNVPTFMCHK (56.89) HLQVFRDHLINQIPDK (30.92) EFNVYWNVPTFM[15.99492]CHK (42.49) SFPVGVIDFESWRPIFR (29.62) MSWLFESDVLLPSVYLR (22.35) M[15.99492]SWLFESDVLLPSVYLR (25.29) ITDLGADGFIIWGSSDDINTK (49.18) KITDLGADGFIIWGSSDDINTK (38.56) GEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (39.94) GEEIAILYDPGM[15.99492]FPALLKDPNGNVVAR (41.88)

Continua

Continuação

					DHLINQIPDKSFPGVGVIDFESWRPIFR (42.19) FEEVSEK (22.13) FRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (37.33) FRGEEIAILYDPGM[15.99492]FPALLKDPNGNVVAR (33.27)
60115688	100%	icarapin-like precursor	7	24830.22	EQMAGILSR (20.47) VREQMAGILSR (28.79) IPEQGVVNWNK (29.09) NVDTVLVLPSIER (40.94) KNVDTVLVLPSIER (35.43) SVESVEDFDNEIPK (59.67) SVESVEDFDNEIPKNQGDVLTA (36.88)
66500170	100%	neutral alpha-glucosidase AB-like isoform 2	1	107169.5	KLVVIIDPHIK (19.98)
66507455	100%	venom protease	4	40313.29	SCQFLITLLEK (55.72) VTAFLDFIISALK (42.45) NYPFVAGWGSTETR (52.45) YENNDPFVCCPK (29.14)
66514614	100%	chitinase-like protein Idgf4-like	1	48995.98	DGFTILVR (25.37)
67010041	100%	major royal jelly protein 9 precursor	20	48942.65	ANIFQVK (33.86) NNVPIDVDR (22.33) QISSNIYER (20.72) ILNAPVNQLIR (47.58) LTSSTFVYDPR (42.68) YFDYNFGSDEK (45.52) NDGVPSSLNVISNK (29.36) QNNEYIWIVSNK (35.18) IPHDIAINSTTGKR (18.28) YFDYNFGSDEKR (46.45) IANGDLNFNEVNFR (66.22) QNNEYIWIVSNKYQK (26.6) IGNGGPLLEPYPNWSWAK (21.93) TQNLYYSAMSSHNLYVNTK (27.08) QAAIQSGEYNYKNNVPIDVDR (26.22) YTINDESFSLQDGILGMALSHK (47.89) FQANDIQYQGASDILWTQASAK (27.67) YTKYTINDESFSLQDGILGMALSHK (33.65) AISETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLK (41.85) QAAIQSGEYNYKNNVPIDVDRWNGK (36.44)
74835477	100%	venom allergen acid phosphatase	5	44105.54	EYQLGQFLR (27.44) ELQLPGCEVLCPLYK (73.05) FVDESANNLSIEELDFVK (108.4) YLQLIENVIPSNEELICDKR (37.35) MREYQLGQFLR (27.37)

Continua

Continuação

94158822	100%	odorant binding protein 14 precursor	5	15589.97	VQLYCECILK (23.02) KVQLYCECILK (42.58) AVMELLIDENSVK (64.04) QLVSDCSTISEENPHLK (27.76) NFNILDKNNVFKPQGIK (22.54)
229892214	100%	heat shock protein cognate 3	4	72877.8	VFAPEEISAM[15.99492]VLGK (33.55) ITPSYVAFTADGER (40.8) QKEDIGTVIGIDLGTTYSCVGVYK (65.72) NELESYAYSLK (24.24)
328779578	100%	lysozyme c-1	5	18421.27	IQAMEGFK (24.12) TASSYSFGIFQINSAK (25.07) CEDFADDDIRDDIECAK (31.67) RCEDFADDDIRDDIECAK (24.01) TYISNVVCLMQSESGMNTR (69.76)
328785691	100%	carboxypeptidase D-like	0	184523.7	
328790510	100%	dnaJ homolog subfamily B member 11-like	1	41655.77	FQDLGAAYEVLSDNEK (73.87)
328787985	100%	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	2	24271.94	AHIAEHMEVPIDTSK (24.95) AHIAEHM[15.99492]EVPIDTSK (21.66)
328781841	100%	mast cell degranulating peptide-like	4	6464.06	IIIPHMCWK (18.28) IIIPHM[15.99492]CWK (25.5) IIIPHMCWKK (23.41) IIIPHM[15.99492]CWKK (19.98)
94400907	100%	allergen Api m 6 precursor	4	10382.27	ICAPGCVCR (29.88) CPSNEIFSR (18.24) GKCPSNEIFSR (29.43) FCPNVVPKPLCIK (33.55)
328783471	99.9%	hypothetical protein LOC725114 isoform 1	2	10691.8	CGENEKPYICGSLCEPSCNAPHPNR (37.25) IECTWSLTGGCR (56.26)

Continua

Conclusão

110748908	99.9%	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3-like	3	87593.65	LLSLDAQCR (19.88) VLVDGNIGSELVIRPLPDR (32.91) VTNADVDIGDIYQDTTNMASILLHR (25.76)
48101366	99.8%	venom serine protease 34	0	45521.91	
58585180	99.7%	secapin preproprotein	3	8844.77	YIIDVPPR (45.69) SADLVPEPR (38.21) YIIDVPPRCPPGSK (36.32)
328783352	99.6%	chymotrypsin inhibitor	2	7723.19	NGEGACVLPENC (19.85) IGCQCQEGFLR (44.53)
66560290	99.4%	lysosomal aspartic protease	2	42651.25	ISVDGVTPVFYNMVK (32.04) ISDQTFAEALSEPGLAFVAAK (45.72)
328787622	98.2%	peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase	2	39201.47	DAPTLILPEGVGFK (32.55) VVSGYVVKPDYTWIELGK (31.46)
66511507	97.3%	endochitinase isoform 2	3	61895.26	TSVAVGGWGEGGR (24.37) LKTSVAVGGWGEGGR (27.04) LVVGIPLYGR (23.38)
328778095	96.9%	lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like	0	56965.61	
58585098	95.3%	major royal jelly protein 1	6	49311.14	FFDYDFGSDER (48.54) TSDYQQNDIHYEGVQNILDTQSSAK (41.91) LLTFDLTTSQLLK (45.01) IMNANVNELILNTR (67.25) TVAQSDETLQMIASMK (50.06) SGVLFFGLVGDSALGCWNEHR (25.29)

Anexo E

Lista de peptídeos e proteínas identificados para o veneno da abelha *A. m. carnica* após utilização de gradiente de 6h na separação cromatográfica.

Número de Acesso	Probabilidade da Proteína	Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de Peptídeos Identificados	Sequências dos peptídeos identificados (MASCOT Íon Escore)
110751310	100%	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	27696.61	5	TDPILFVAEK (24.44) GDVVFVQTEQTR (34.61) VFEETLPEIQR (36.21) ILEKGDVVFVQTEQTR (27.19) SGIYLGLPGCVEQLDR (42.76)
110756431	100%	hypothetical protein LOC725074	8691.24	3	ITEEELMK (32.73) ITEEELMKQR (40.51) HGDSCVSSSDCCPGTWCHTYANR (74.4)
110758297	100%	phospholipase A2-like	21147.65	10	VYFNDIIPK (64.36) KYQWFDLPSF (60.32) HNLWNASLFLR (38.44) KHNLWNASLFLR (31.13) CFELEHPIIGCK (33.53) CFELEHPIIGCKK (45.5) RKHNLWNASLFLR (24.77) NYNDLGFNHITDACC (77.38) AKNYNDLGFNHITDACC (84.86) NYNDLGFNHITDACC REHDYCPDSIK (26.62)
187281543	100%	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	88338.11	4	AQLVLYDTK (19.13) VPFNLEETYDQSFR (60.08) TDREILYSDNYVGDIR (23.82) EILYSDNYVGDIR (52.16)
187281550	100%	venom carboxylesterase-6 precursor	63938.35	19	VSTFTGNIR (37.24) LFNIDFEK (30.46) TIPFNENKLN (28.89) NIVFVAINYR (56.09) MIDCLQSRPAR (35.55) SPVWTYYYYSYR (44.07) EGLYTAAEFVDNAK (75.08) GISISGVAFCPWAQTK (48.8) GSEDCLYINIYVPVR (44.09) INKSPVWTYYYYSYR (23.22) RGISISGVAFCPWAQTK (38.02) LYEAYEGIPYAQSPVGK (49.5) VKGSEDCLYINIYVPVR (19.23) SSVCMQYLMTFTTHGNR (30.99) KSSVCMQYLMTFTTHGNR (57.8) SGPINYDKVESIIQMMSDR (125.38)

Continua

Continuação

					SDRLYEAYEGIPYAQSPVGK (25.39) WVFNNIK (21.15) GSEDCLYINIYVVRNNR (47.22)
221325614	100%	C1q-like venom protein precursor	17145.87	4	ISDGVTFSGYR (56.77) LSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (24.74) GVGYVPQTGIFITNCPGLYQFSFAGYGSTDLR (54.01) AVFAETLVDK (43.28)
226533687	100%	venom serine carboxypeptidase precursor	53782.57	5	WALDLITR (41.01) TVDSLTEVLVR (32.97) VWFVGNELAGYSK (42.78) KVWVFGNELAGYSK (27.33) CHNLLYIDNPVGTGFSFTEDER (91.95)
328780886	100%	apolipoporphins-like	85159.9	0	
328782499	100%	proactivator polypeptide isoform 1	103056.8	21	SIINLIK (18.8) SIINLIKR (24.11) IMGICPTPGK (24.67) GLNCNIICK (26.03) CTILINSYGK (44.27) LCEQLVGHLK (32.65) YASSIIDITK (34.37) QITLSETEPNV (46.02) DYSAISLENLR (49.5) LCDPTEHLGPR (25.76) QVCSFLGVCTK (46.21) VCQYLPSNMEHK (27.21) VPNDDDSVCTICK (39.56) FVNKYASSIIDITK (30.02) HMKVPNDDDSVCTICK (56.88) HM[15.99492]KVPNDDDSVCTICK (35.42) ADFAPPKQITLSETEPNV (22.51) VFQANANENLKNENEELNK (25.86) LCIHLPHSLVDECTELVK (33.14) TVQNEPIWPLVPR (19.52) ETCALCEYILHFIEAITNPTEEK (33.37)
328787755	100%	hypothetical protein LOC100577054	11511.84	5	GEVCPVYLGCIK (31.52) DDKDVPEVHVIR (45.58) CIVKDDKDVPEVHVIR (29.6) DTDCTKGEVCPVYLGCIK (29.59) KDTDCTKGEVCPVYLGCIK (26.55)
328788558	100%	putative cysteine proteinase CG12163-like	101571.4	9	QVVSGLYLYK (24.61) LTFDLIPICK (30.89) DLDHGVLIVGYGISK (20.14) KDEVQEEIYPTKK (21.88) NAIEQSECSVQLNSSFK (39.44) VYRGDGTGCVNAMASSAIVA (50.34) SELVGASSYIDINNPTVQELANK (47.38) IINELQTFEQGTAEYGVMTMFADLTPK (30.77) ICLVTFEEKPWQQSSR (24.48)

Continua

Continuação

328789222	100%	nucleobindin-2-like	61891.91	6	IAEELQFVNR (41.26) MREHVFNEADLNK (27.57) LENALDSDIR (45.84) QQLEEVWEK (25.66) LYAQGAPQDDFLK (27.7) ELDKLYAQGAPQDDFLK (55.65)
328789531	100%	hypothetical protein LOC408666	37194.82	20	DISFFSSSSR (25.05) NFEILVTILESSGK (51.08) DVPKDISFFSSSSR (30.2) MWHPDLCSCFCR (26.6) IVPIEEHTQCTCDCK (42.52) LVKDVPKDISFFSSSSR (22.66) ETANPALEGGPSGGGIGELAK (68.34) RIVPIEEHTQCTCDCK (22.49) ETQECSTGFYFDQNSCR (40.78) GRETANPALEGGPSGGGIGELAK (95.22) CGGCCTHSLSCQPTATEIR (34.25) QSYVPEECTCACNNVDEQK (68.67) QSYVPEECTCACNNVDEQKK (26.49) KQSYVPEECTCACNNVDEQK (31.07) RCGGCCTHSLSCQPTATEIR (49.9) FGQTQRPDNPVPIIALDSDDPR (42.28) KQSYVPEECTCACNNVDEQKK (42.06) IVFPDRGRETANPALEGGPSGGGIGELAK (19.38) SNAERPQNQALCMPELQTVPLLENPSVIYYPTCTR (46.51) SNAERPQNQALCM[15.99492]PELQTVPLLENPSVIYYPTCTR (43.02)
328790726	100%	venom acid phosphatase Acph-1-like	43093.49	8	LLQTIFR (29.76) QISAGIWIR (25.11) NIGLELPEWTK (37.98) YENFLGEIYTK (56.64) LDELAVYDILIR (65.08) TAMSVQLVTTGLYPPSK (28.25) FVKPLISINTDEICGQK (43.21) NMVEETDKDVIQFK (23.95)
335892796	100%	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	22743.57	8	IEIGLFGK (20.91) TVENFIELSK (43.45) VWFDINIDGK (35.61) VISEFMIQGGDFTK (61.38) VISEFM[15.99492]IQGGDFTK (72.5) VTDKVVFDINIDGK (21.84) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSK (71.93) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSKEDATD (41.92)

Continua

Continuação

5627	100%	phospholipase A-2	19044.99	29	SSGPNELGR (26.48) HTDACC (17.97) LSCDCDDK (13.32) CLHYTVDK (25.35) IGDNELEER (50.96) VYQWFDLR (36.42) MYFNIDTK (44.59) M[15.99492]YFNIDTK (19.27) FKHTDACC (40.62) HGLTNTASHTR (46.61) LEHPVTGCGER (21.63) VYQWFDLR (27.95) NSADTISSYFVGK (64.21) IYPGTLWCGHGNK (20.12) THDMCPDVMSAGESK (27.25) THDM[15.99492]CPDVMSAGESK (43.8) THDMCPDVM[15.99492]SAGESK (41.55) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESK (29.98) CYKLEHPVTGCGER (32.28) LSCDCDDKFYDCLK (28.08) FYDCLKNSADTISSYFVGK (61.62) THDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (44.01) FKHTDACCRTTHDM[15.99492]CPDVMSAGESK (26.91) THDM[15.99492]CPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (44.83) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESKHGLTNTASHTR (33.27) LSCDCDDKFYDCLKNSADTISSYFVGK (64.32) MYFNIDTKCYK (44.47) NSADTISSYFVGKM[15.99492]YFNIDTK (43.27) HGLTNTASHTRLSCDCDDKFYDCLK (35.45)
58585070	100%	major royal jelly protein 8 precursor	47325.96	17	TFVIIMK (28.3) IEIDMCDR (28.6) ETLQAITGLK (35.93) LTSSTFASDPR (43.44) ILIANVNDLIK (30.84) ENILWTQASAK (47.38) NKETLQAITGLK (27.85) YIDYDFGSDEK (32.94) LWVLDSGLINNVR (49.2) YIDYDFGSDEK (40.98) VIYGFDFNDVNFR (32.52) TGNGGPLLAPYPDWTWAK (50.01) SVCPPQLLVFDLNTSQLLK (85.71) ISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (25.79) RISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (16.33) GISDNGVLFFGLVGDTSACWNENR (57.69)

Continua

Continuação

					SQYQANNVHYQGKENILWTQASAK (54.95)
58585086	100%	transferrin 1 precursor	80033	1	IFTICVPEIYSK (40.26)
58585104	100%	vitellogenin precursor	202117.2	0	
58585108	100%	major royal jelly protein 2 precursor	51440.52	2	TFVTILR (25.1) IVNDDFNDDVNFR (49.05)
58585116	100%	venom serine protease 34 precursor	46399.08	15	MTVILTPPGR (52.99) CTWTITSYHR (29.08) LAIVVGEHDWSSK (39.5) TTLNMLTQVECYK (62.14) TYEPMICGATIISK (26.14) YYGNIMVNAMCAYAK (44.56) YVLTAHCIIDENTTK (24.75) IVGGTNTGINEFPMMAGIK (56.5) RYVLTAHCIIDENTTK (42.03) GKDACQMDSGGPVLWQNPR (35.36) GKDACQM[15.99492]DSGGPVLWQNPR (39.07) CSLVEFSENKNCNAGSLTVKK (27.68) VGSYIDWIVSQTPDAEYCVIE (23.52) DDWQINDIALLK (52.53) IVGGTNTGINEFPMMAGIKR (21.44)
58585138	100%	major royal jelly protein 5 precursor	70530.99	0	
58585142	100%	major royal jelly protein 3 precursor	61966	2	VIYEWK (20.7) LTSNTFDYDPR (34.69)
58585154	100%	melittin precursor	7580.02	4	VLTTGLPALISWIK (71.83) VLTTGLPALISWIKR (34.84) VLTTGLPALISWIKRK (25.59) VLTTGLPALIS[79.96632]WIKRK (20.14)
58585164	100%	alpha-glucosidase precursor	65694.13	0	
58585182	100%	hyaluronidase precursor	44459.59	38	LSVEVVR (25.77) FEEVSEK (24.86) ADLEATLR (53.91) WNLTSGER (28.71) LTVDSVDQV (30.52) VLPYYWYK (23.41)

Continua

Continuação

					DHLINQIPDK (34.89) EHPFWDDQR (23.27) QNWASLQPYK (44.1) KVLPPYYWYK (24.25) YGILQNWMDK (48.43) YGILQNWMDK[15.99492]DK (40.77)
					EYLNNEELGPAVK (54.79) YGQLFMEETLK (58.1) QNWASLQPYKK (33.81) YGQLFM[15.99492]EETLK (23.48) KKVLPPYYWYK (29.79) EYLNNEELGPAVKR (52.08) YGILQNWMDKFR (22.93) YGILQNWMDK[15.99492]DKFR (43.07) EHPFWDDQRVEQEAK (55.84) EFNVYWNVPTFMCHK (54.9) HLQVFRDHLINQIPDK (24.97) GEEIAILYDPGMFPALLK (75.51) EFNVYWNVPTFM[15.99492]CHK (38.57) SFPVGVIDFESWRPIFR (34.25) IALNNNANDRLTVDSVSDQV (42) MSWLFESDVLPSVYLR (38.19) M[15.99492]SWLFESDVLPSVYLR (23.79) ITDLGADGFIIWGSSDDINTK (91.02) KITDLGADGFIIWGSSDDINTK (49.29) FRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (18.57) DHLINQIPDKSFPVGVIDFESWRPIFR (23.73) IALNNNANDR (25.05) REHPFWDDQR (23.47) REHPFWDDQRVEQEAK (26.02) GEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (53.35) GEEIAILYDPGM[15.99492]FPALLKDPNGNVVAR (51.1)
60115688	100%	icarapin-like precursor	24830.22	7	EQMAGILSR (20.54) VREQMAGILSR (24.32) IPEQGVVWNK (49.01) NVDTVLVLPISIER (53.14) KNVDTVLVLPISIER (83.14) SVESVEDFDNEIPK (64.4) SVESVEDFDNEIPKNQGDVLTA (35)
66500170	100%	neutral alpha-glucosidase AB-like isoform 2	107169.5	0	
66507455	100%	venom protease	40313.29	5	SCQFLITLLEK (65) VTAFLDFIISALK (58.67) YENNDPFVCCPK (37.96)

Continua

Continuação

					NYPFVAGWGSTETR (64.53) LIHPDYSTTTTFVNDIAVLR (27.41)
66514614	100%	chitinase-like protein Idgf4-like	48995.98	4	DGFTILVR (26.95) YLVLTETSQSR (49.59) EGDYPAPIYESYGRVPQDNVDSTAR (23.93) LTSESQISGVPPIVTDGPGAEGPHTNTPGLLSYAEVCSR (38.74)
67010041	100%	major royal jelly protein 9 precursor	48942.65	24	ANIFQVK (42.73) NNVPIDVDR (21.94) DFKANIFQVK (18.34) ILNAPVNQLIR (51.09) LTSSTFVYDPR (23) QAAIQSGEYNYK (61.7) YFDYNFGSDEK (54.81) NDGVPSSLNVISNK (25.08) QNNEYIWIVSNK (23.06) IPHDIAINSTTGKR (19.56) IANGDLNFNEVNFR (61.99) QNNEYIWIVSNKYQK (50.27) IGNGGPLLEPYPNWSWAK (37.61) TQNLYYSAMSSHNLNYVNTK (114.02) TQNLYYSAM[15.99492]SSHNLNYVNTK (23.47) QAAIQSGEYNYKNNVPIDVDR (38.98) YTINDESFSLQDGILGMALSHK (50.26) YTINDESFSLQDGILGM[15.99492]ALSHK (34.9) FQANDIQYQGASDILWTQASAK (36.58) YTKYTINDESFSLQDGILGMALSHK (53.61) AISETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLK (67.16) AISETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLKR (27.03) YFDYNFGSDEKR (23) LWVLDNGISGETSVCPQSIVVFDLK (47.2)
74835477	100%	venom allergen acid phosphatase	44105.54	9	EYQLGQFLR (42.65) IVYYLGIPSEAR (42.27) MREYQLGQFLR (31.09) DPYLYYDFYPLER (43.09) ELQLPGCEVLCPLYK (28.52) LQQWNEDLNWQPIATK (30.34) FVDESANNLSIEELDFVK (44.22) YLQLIENVIPSNEELICDKR (42.64) YGDFLGDIYTEESVSALSSFYDR (41.74)
94158822	100%	odorant binding protein 14 precursor	15589.97	3	AVMELLIDENSVK (65.81) QLVSDCSTISEENPHLK (36.97)

Continua

Continuação

					NFNILDKNNVFKPQGIIK (19.64)
229892214	100%	heat shock protein cognate 3	72877.8	1	ITPSYVAFTADGER (36.35)
328779578	100%	lysozyme c-1	18421.27	7	AWDGWMK (19.17) IQAMEGFK (30.56) TASSYSFGIFQINSAK (34.94) CEDFADDDIRDDIECAK (69.88) RCEDFADDDIRDDIECAK (21.28) TYISNWVCLMQSESGMNTR (81.81) CEDFADDDIRDDIECAKK (41.78)
328785691	100%	carboxypeptidase D-like	184523.7	1	NLLVLEISENVK (59.47)
328790510	100%	dnaJ homolog subfamily B member 11-like	41655.77	2	FQDLGAAYEVLSDNEK (92.91) FQDLGAAYEVLSDNEKR (30.53)
328787985	100%	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	24271.94	1	AHIAEHMEVPIDTSK (43.31)
328781841	100%	mast cell degranulating peptide-like	6464.06	4	IIIPHMCWK (19.54) IIIPHM[15.99492]CWK (22.1) IIIPHM[15.99492]CWKK (19.93) IIIPHMCWKK (21.41)
94400907	100%	allergen Api m 6 precursor	10382.27	3	ICAPGCVCR (34.43) GKCPSNEIFSR (37.54) FCPNVVPKPLCIK (23.39)
328783471	99.9%	hypothetical protein LOC725114 isoform 1	10691.8	0	
110748908	99.9%	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3-like	87593.65	2	VLVDGNIGSELVIRPLPDR (16.83) VTNADVDIGDIYQDTTNMASILLHR (30.56)

Continua

Conclusão

48101366	99.8%	venom serine protease 34	45521.91	0	
58585180	99.7%	secapin preproprotein	8844.77	3	YIIDVPPR (32.57) SADLVPEPR (21.18) YIIDVPPRCPPGSK (20.29)
328783352	99.6%	chymotrypsin inhibitor	7723.19	2	NGEGACVLPENC (20.29) IGCQCQEGFLR (53.18)
66560290	99.4%	lysosomal aspartic protease	42651.25	3	ISVDGVTPVFYNMVK (27.39) ISDQTFAEALSEPGLAFVAAK (42.28) YGSGLSGYLSTDTVDIAGMK (64.51)
328787622	98.2%	peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase	39201.47	1	VVSGYVVKPDYTWIELGK (33.36)
66511507	97.3%	endochitinase isoform 2	61895.26	5	LVVGIPLYGR (20.04) TSVAVGGWGEGGR (40.42) LKTSVAVGGWGEGGR (28.21) LNVHDGLLLWEEK (21.16) GNWAGFADVHSPLYR (28.32)
328778095	96.9%	lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like	56965.61	1	ANFLAPLPAYPINAVCK (26.81)
58585098	95.3%	major royal jelly protein 1	49311.14	0	

Anexo F

Lista de peptídeos e proteínas identificados para o veneno da abelha *A. m. ligustica* após utilização de gradiente de 6h na separação cromatográfica.

Número de Acesso	Probabilidade da Proteína	Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de Peptídeos Identificados	Sequências dos peptídeos identificados (MASCOT Íon Escore)
110751310	100%	endoplasmic reticulum resident protein 29-like	27696.61	10	TDPILFVAEK (26.31) FDVAFPYGEK (26.86) DSHDLLVAEVR (25.17) GDVVFVQTEQTR (41.71) VFEETLPEIQR (48.52) AKVFEETLPEIQR (22.78) ILEKGDVVFVQTEQTR (20.2) SGIYLGPGCQEQLDR (38.99) SEAFPAILLFLQGK (17.58) FDVAFPYGEKHEQYQIAAATK (22.95)
110756431	100%	hypothetical protein LOC725074	8691.24	3	ITEEELMK (40.97) HGDSCVSSSDCCPGTWCHTYANR (49.94) ITEEELMKQR (37.25)
110758297	100%	phospholipase A2-like	21147.65	9	VYFNDIIPK (42.86) KYQWFDLPSF (23.02) HNLWNASLFLR (40.55) KHNLWNASLFLR (30.9) CFELEHPIIGCK (39.25) CFELEHPIIGCKK (22.14) RKHNLWNASLFLR (18.29) NYNDLGFNHITDACCR (62.85) AKNYNDLGFNHITDACCR (27.55)
187281543	100%	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	88338.11	16	AQLVLYDTK (38.76) QISIWEENR (21.45) FWANCLGYSH (45.99) DGEIVATWTNR (33.47) NFNVNANGYTNK (57.25) EILYSDNYVGDTR (62.24) LGTVEIEDQIITR (56.2) VPFNLEETYDQSFR (42.45) YGSPGNSRDQYPNEIR (33.93) NDIYYQVFFEGGSDTR (41.29) TDREILYSDNYVGDTR (39.77) GNANNIYEEETEGWLR (36.04) AGTTNPFVSLSLVDLHDPSSK (24.91) LIDLPPPVDDVVGADNVLYTANWR (38.58) NLYSVQLSGNEPPVCLSCDVLTPEGNR (32.01) NGALVDETDLTPTGTCEVISLLLVDHAR (38.11)

Continua

Continuação

187281550	100%	venom carboxylesterase- 6 precursor	63938.35	18	VSTFTGNIR (38.77) LFNIDFEK (35.97) TIPFNENKLN (41.63) NIVFVAINYR (35.46) MIDCLQSRPAR (36.65) SPVWTTYYSYR (40.51) EGLYTAAEFVDNAK (75.1) GISISGVAFCPWAQTK (25.38) GSEDCLYINIYVPVR (45.96) INKSPVWTTYYSYR (22.71) LYEAYEGIPYAQSPVGK (34.04) VKGSEDCLYINIYVPVR (20.13) SSVCMQYLMTFTTHGNR (37.36) KSSVCMQYLMTFTTHGNR (30.7) SGPINYDKVESIIQMMSDR (104.84) SDRLYEAYEGIPYAQSPVGK (34.42) WVFNNIK (19.55) RGISISGVAFCPWAQTK (23.66)
221325614	100%	C1q-like venom protein precursor	17145.87	3	AVFAETLVLDK (29.55) LSTAVDCTGIIAFSATHASVDHAK (34.08) ISDGVTFSGYR (81.44)
226533687	100%	venom serine carboxypeptidase precursor	53782.57	4	WALDLITR (38.58) TVDSLTEVLVR (56.29) VWFVGNELAGYSK (37.14) KWWFVGNELAGYSK (42.92)
328780886	100%	apolipoporphins- like	85159.9	6	LGYLGVGQVIGR (50.46) ALGNSQFLDDATLQK (62.22) YCQQNSCENVAEIK (61.79) ENVNQGLVSGNTDAEAGVK (45.03) LFLDALFR (41.99) LSATVELSVKPDICINQLR (31.62)
328782499	100%	proactivator polypeptide isoform 1	103056.8	25	SIINLIK (28.39) IMGICPTPGK (32.21) GLNCNIICK (35.53) CTILINSYGK (31.4) YASSIIDITK (31.45) QITLSETEPNV (39.65) DYSAISLENLR (60.14) LCDPTEHLGPR (41.04) QVCSFLGVCTK (45.82) VCQYLPSNMEHK (25.32) VPNDDDSVCTICK (45.57) LVPFPM[15.99492]LGESLGTQGK (26.89) FVNKYASSIIDITK (20.08) NKVENAVHVCNHLPK (24.11) HMKVPNDDDSVCTICK (59.78) HM[15.99492]KVPNDDDSVCTICK (29.86) ADFAPPKQITLSETEPNV (27.73) VFQANANENLKNNDNEELNK (32.39) VEIRPLSSVGM[15.99492]VDVNDLDPCK (38.13) ELIELLLADLTPQEVVYIK (35.45) ETCALCEYLHFIQEAITNPTTEEK (32.89) M[15.99492]WQSIPK (27.14) LCEQLVGHLK (33.49) VEIRPLSSVGMVDVNDLDPCK (35.25)

Continua

Continuação

328787755	100%	hypothetical protein LOC100577054	11511.84	5	GEVCPYLGCIK (32.85) CIVKDDKDVPEVHVIR (22.67) DTDCTKGEVCPYLGCIK (32.36) KDTDCTKGEVCPYLGCIK (26.56) DDKDVPEVHVIR (25.05)
328788558	100%	putative cysteine proteinase CG12163-like	101571.4	11	QVVSGLYLYK (19.67) LTFDLIPICK (43) QHELGDINVLK (35.31) LEESPYVIYR (31.05) ALNSLNQDSPTHHTYR (28.46) VYRGDGTGCGVNAMASSAIVA (34.88) ICLVTFEEKPWQQSSR (36.95) SELVGASSYIDINNPTVQELANK (56.62) IINELQTFEQGTAEYGVTFADLTPK (48.97) KDEVQEEIYPTKK (26.55) NAIEQSECSVQLNSSFK (60.52)
328789222	100%	nucleobindin-2-like	61891.91	3	LENALDSDIR (40.61) QQLLEVWEK (31.19) IAEELQFVNR (50.71)
328789531	100%	hypothetical protein LOC408666	37194.82	20	DISFFSSSSR (30.44) NFEILVTILESSGK (68.1) DVPKDISFFSSSSR (21.12) MWHPDLCSCFCR (36.87) M[15.99492]WHPDLCSCFCR (25.85) IVPIEEHTQCTCDCK (75.31) ETANPALEGGPSGGGIGELAK (75.95) RIVPIEEHTQCTCDCK (25.79) ETQECSTGFYFDQNSCR (37.73) GRETANPALEGGPSGGGIGELAK (74.63) CGGCCTHSLSCQPTATEIR (38.3) QSYVPEECTCACNNVDEQK (54.48) QSYVPEECTCACNNVDEQKK (42.04) KQSYVPEECTCACNNVDEQK (41.57) RCGGCCTHSLSCQPTATEIR (49.49) FGQTQRPDNPVPPVIALDSDDP (36.67) KQSYVPEECTCACNNVDEQKK (24.17) IVFPDRGRETANPALEGGPSGGGIGELAK (22.77) SNAERPQALCMPELQTVPLENEPSVIYYPTCTR (42.11) LVKDVPKDISFFSSSSR (19.23)
328790726	100%	venom acid phosphatase AcpH-1-like	43093.49	5	LLQTIFR (33.55) QISAGIWIR (23.63) LDELAVYDILIR (66.24) TAMSVQLVTTGLYPPSK (47.49) NIGLELPEWTK (33.65)

Continua

Continuação

335892796	100%	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	22743.57	10	IEIGLFGK (20.82) TVENFIELSK (46.58) VWFDINIDGK (26) DTNGSQFFITVK (61.59) VISEFMIQGGDFTK (72.41) VISEFM[15.99492]IQGGDFTK (48.86) VTDKVVFDINIDGK (31.92) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSK (48.01) VISEFMIQGGDFTKGDGTGGHSIYGSR (25.19) DRPIKDVVIADCGAEVVANPFSVSKEDATD (43.53)
5627	100%	phospholipase A-2	19044.99	27	SSGPNELGR (18.96) LSCDCDDK (19.28) IGDNELEER (43.42) VYQWFDLR (36.05) MYFNLIDTK (32.05) M[15.99492]YFNLIDTK (48.54) FKHTDACC (26.06) HGLTNTASHTR (25.45) LEHPVTGCGER (31.82) VYQWFDLRK (22.45) NSADTISSYFVGK (58.67) IIYPGTLWCGHGNK (29.58) THDMCPDVMSAGESK (33.84) THDMCPDVM[15.99492]SAGESK (29.22) THDM[15.99492]CPDVMSAGESK (36.25) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESK (21.43) CYKLEHPVTGCGER (35.63) LSCDCDDKFYDCLK (23.15) FYDCLKNSADTISSYFVGK (41.4) IIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGR (24.22) FKHTDACCRTTHDMCPDVMSAGESK (31.58) THDM[15.99492]CPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (45.96) THDM[15.99492]CPDVM[15.99492]SAGESKHGLTNTASHTR (24.77) LSCDCDDKFYDCLKNSADTISSYFVGK (26.53) HTDACC (16.08) HTDACCRTTHDMCPDVMSAGESK (21.13) THDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHTR (49.23)
58585070	100%	major royal jelly protein 8 precursor	47325.96	16	TFVIIMK (26.57) IEIDMCDR (43.63) LTSSTFASDPR (56.08) ILIANVNDLIK (21.52) NKETLQAITGLK (43.19) LWVLDSGLINNVR (66.71) YIDYDFGSDEKR (47.38) VIYGFDFNDVNFR (54.59) TGNGGPLLAPYPDWTWAK (40.48)

Continua

Continuação

					SVCPPQLLVFDLNTSQLLK (87.89) ISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (25.83) RISFILVHGFPLEYEYVLAVSNR (16.88) GISDNGVLFFGLVGDTSLACWNENR (66.4) SQYQANNVHYQGKENILWTQASAK (29.05) ENILWTQASAK (54.29) YIDYDFGSDEK (26.01)
58585086	100%	transferrin 1 precursor	80033	17	YLDVIER (27.02) GIPVSCISGR (27.65) AEINEWER (27.6) IFTICVPEIYSK (45.53) LASNAGYNVIEQVR (44.24) LCQQCVGNLASNDR (80.13) GCLVGTWSPDPAINRR (32.9) AIKENNADLTVVSGGSVLR (26.45) LTAMGVLLNLHDPEYSAR (28.83) RFFGLPVGVTAIPTSENPADYR (32.42) ATKEYNTVPIIAESYSGSGSTNFNERPAVAVVSK (31.84) DLPINNVQGLR (37.96) WCTWSEGDLK (30.05) GCLVGTWSPDPAINR (39.44) EADVVAVDPEDMYLAVK (51.53) SENEAADFFSGSCAPGAPLDSK (74.34) LKETYSNMCALCEKPEVCDYPDIYSGYEGALR (31.23)
58585104	100%	vitellogenin precursor	202117.2	20	STIQSLMK (19.04) VLAMISSVK (19.04) MDFNVDIR (28.49) CTAVFLMK (27.39) VGFVTPFEHR (38.58) SPELVPMPTLK (24.42) ILSVFEPYLEGK (56.95) DAITQTGTGPAFLTIK (67.34) VMTRPDTDSENWTPK (24.26) DLIVDRDVPTWEVNILK (26.35) CEVLYDIAPLSDFVIHR (28.21) KPEHFVASYALISNQCEGDSLNVAK (47.48) ISLDVNTPK (30.29) QNTWTVFR (24.29) SFFELLQNP (50.83) LKELVGATSIK (20.69) VEENEIIFEIYK (77.8) SIVGQLQVDTQGENAVK (41.24) TLTSLGDLSDVHTGILIK (36.33) VHVPGESESETVLTALWSESNVESK (54.09)
58585108	100%	major royal jelly protein 2 precursor	51440.52	1	TFVTILR (32.15)

Continua

Continuação

58585116	100%	venom serine protease 34 precursor	46399.08	19	YPLPYSGSK (25.12) MTVILTPPGR (25.8) M[15.99492]TVILTPPGR (24.71) CSLVEFSENK (23.66) CTWTITSYHR (25.96) LAIVVGEHDWSSK (21.9) DDWQINDIALLK (45.28) TTLNMLTQVECYK (60.58) TYEPGMICGATIISK (75.94) YYGNIMVNAMCAYAK (50.68) YVLTAAHCIIDENTTK (39.54) IVGGTNTGINEFPMMAGIK (55.8) RYVLTAAHCIIDENTTK (27.58) IVGGTNTGINEFPMMAGIKR (23.35) GKDACQMDSGGPVLWQNPR (38.85) CSLVEFSENKNCNAGSLTVK (24.11) CSLVEFSENKNCNAGSLTVKK (29.77) VGSYIDWIVSQTPDAEYCVIE (25.99) GKDACQM[15.99492]DSGGPVLWQNPR (35)
58585138	100%	major royal jelly protein 5 precursor	70530.99	0	
58585142	100%	major royal jelly protein 3 precursor	61966	1	VIYEWK (23.36)
58585154	100%	melittin precursor	7580.02	4	VLTTGLPALISWIK (25.04) VLTTGLPALISWIKR (41.47) VLTTGLPALISWIKRK (29.32) VLTTGLPALIS[79.96632]WIKRK (29.89)
58585164	100%	alpha-glucosidase precursor	65694.13	0	
58585182	100%	hyaluronidase precursor	44459.59	33	LSVEVVR (22.68) ADLEATLR (58.5) LTVDVSDQV (22.9) VLPYYWYK (23.05) DHLINQIPDK (27.83) EHPFWDDQR (36.32) QNWASLQPYK (38.78) YGILQNWMDK (37.8) YGILQNWMDK[15.99492]DK (42.52) EYLNNELGPAVK (51.31) YGQLFMEETLK (25.98) QNWASLQPYKK (30.26) YGQLFM[15.99492]EETLK (36.66) REHPFWDDQR (28.21) KKVLPYYWYK (42.15)

Continua

Continuação

					EYLNNELGPAVKR (28.13) YGILQNWMDKFR (54.41) YGILQNWM[15.99492]DKFR (21.17) EHPFWDDQRVEQEAK (27.95) EFNVYWNVPTFMCHK (40.5) HLQVFRDHLINQIPDK (19.28) EFNVYWNVPTFM[15.99492]CHK (35.44) SFPGVGVDFESWRPIFR (32.47) MSWLFESDVLPSVYLR (49.64) M[15.99492]SWLFESDVLPSVYLR (64.12) ITDLGADGFIIWGSSDDINTK (54.91) KITDLGADGFIIWGSSDDINTK (39.86) GEEIAILYDPGM[15.99492]FPALLKDPNGNVVAR (57.65) DHLINQIPDKSFPGVGVDFESWRPIFR (52.84) WNLTSGER (29.58) KVLPPYYWYK (23.5) GEEIAILYDPGMFPALLK (53.25) FRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVAR (29.18)
60115688	100%	icarapin-like precursor	24830.22	9	EQMAGILSR (38.47) VREQMAGILSR (25.42) IPEQGVVWNK (45.94) NVDTVLVLPISIER (50.92) KNVDTVLVLPISIER (20.67) SVESVEDFDNEIPK (22.31) SVES[79.96632]VEDFDNEIPK (45.28) S[79.96632]VESVEDFDNEIPK (48.84) SVESVEDFDNEIPKNQGDVLT (29.05)
66500170	100%	neutral alpha-glucosidase AB-like isoform 2	107169.5	5	LVVIIDPHIK (17.31) YNPNNNVLTIR (27.38) LYNLDFEYEVNER (63.11) LSSYQTESWLER (36.78) YEPEYALQDQPQTSK (26.88)
66507455	100%	venom protease	40313.29	6	SCQFLITLLEK (60.59) VTAFLDFIISALK (66.84) YENNDPFVCCPK (27.29) NYPFVAGWGSTETR (37.9) DDDGAHPHQVEIEDK (25.44) LIHPDYSTTTFVNDIAVLR (25.94)
66514614	100%	chitinase-like protein Idgf4-like	48995.98	4	YLVLTETSQSR (53.64) EGDYPAPIYESYGR (24.52) AKGLGGVAIYDLSLDDFR (25.25) LTSESQISGVPPIVTDGPGAEGPHTNTPGLLSYAEVCSR (42.15)
67010041	100%	major royal jelly protein 9 precursor	48942.65	20	ANIFQVK (24.17) NNVPIDVDR (23.73) QISSNIYER (21.3)

Continua

Continuação

					ILNAPVNQLIR (21.9) LTSSTFVYDPR (37.87) QAAIQSGEYNYK (39.75) YFDYNFGSDEK (55.17) NDGVPSSLNVISNK (45.29) QNNEYIWIVSNK (44.64) YFDYNFGSDEKR (23.94) IANGDLNFNEVNFR (71.38) QNNEYIWIVSNKYQK (21.2) IGNGGPLLEYPNWSWAK (27.66) TQNLYYSAMSSHNLNYVNTK (81.95) QAAIQSGEYNYKNNVPIDVDR (34.1) YTINDESFSLQDGILGMALSHK (51.99) FQANDIQYQGASDILWTQASAK (30.42) ASETGALFFGLVSDTALGCWNENRPLK (58.69) IPHDIAINSTTGKR (25.46) YTKYTINDESFSLQDGILGMALSHK (23.65)
74835477	100%	venom allergen acid phosphatase	44105.54	21	LYGGPLLRL (25.89) KLYGGPLLRL (21.65) EYQLGQFLR (29.54) HMLDVVSGTQK (20.21) IVYYLGIPSEAR (58.44) MREYQLGQFLR (54.39) DPYLYYDFYPLER (64.79) ELQLPGCEVLCPLYK (31.72) HGDRIPDEKNEMYPK (27.38) LQQWNEDLNWQPIATK (35.15) FVDESANNLSIEELDFVK (88.58) YLQLIENVIPSNEELICDKR (33.95) YEDNIFLPEDCLLFTIELDR (25.56) NEMYPKDPYLYYDFYPLER (34.69) NEM[15.99492]YPKDPYLYYDFYPLER (36.7) YGDFLGDIYTEESVSALSSFYDR (48.01) RYEDNIFLPEDCLLFTIELDR (38.66) IPDEKNEMYPKDPYLYYDFYPLER (28.58) MSLQLVLAALYPPNKLQQWNEDLNWQPIATK (29.57) QINVIFR (25.03) YLQLIENVIPSNEELICDK (45.05)
94158822	100%	odorant binding protein 14 precursor	15589.97	6	VQLYCECILK (22.98) KVQLYCECILK (32.52) AVMELLIDENSVK (50.4) QLVSDCSTISEENPHLK (41.97) NFNILDKNNVFKPQGIG (18.43) ANDVIEGNIDVEDK (79.64)
229892214	100%	heat shock protein cognate 3	72877.8	2	DVDEIVLVGGSTR (29.14) ITPSYVAFTADGER (42.2)

Continua

Continuação

328779578	100%	lysozyme c-1	18421.27	6	IQAMEGFK (18.71) TASSYSFGIFQINSAK (59.87) CEDFADDDIRDDIECAK (23.04) CEDFADDDIRDDIECAKK (36.09) RCEDFADDDIRDDIECAK (31.46) AWDGWMK (23.41)
328785691	100%	carboxypeptidase D-like	184523.7	3	NLLVLEISENVK (47.4) DIDGQPIEGATIIVR (42.3) LNKESLITYFEQAHIGIK (25.35)
328790510	100%	dnaJ homolog subfamily B member 11-like	41655.77	1	ILEVEVEPGMVDGQETK (47.93)
328787985	100%	multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog	24271.94	0	
328781841	100%	mast cell degranulating peptide-like	6464.06	2	IIIPHMCWK (19.8) IIIPHM[15.99492]CWK (23.04)
94400907	100%	allergen Api m 6 precursor	10382.27	4	ICAPGCVCR (37.16) CPSNEIFSR (50.2) GKCPSNEIFSR (32.03) FCPNVVPKPLCIK (26.73)
328783471	99.9%	hypothetical protein LOC725114 isoform 1	10691.8	0	
110748908	99.9%	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3-like	87593.65	2	ISIAGIIISR (43.72) RLPVYDIAVAVTK (25.26)
48101366	99.8%	venom serine protease 34	45521.91	5	VTVSVLTLNQCTK (67.21) FYPDLPQQMCTYAK (24.06) RPQDSTNCQCGWNNPSR (24.86) AVKRPQDSTNCQCGWNNPSR (33.45) DKDACQMDSGGPVLWQNPTTK (23.1)

Continua

Conclusão

58585180	99.7%	secapin preproprotein	8844.77	2	YIIDVPPR (32.73) YIIDVPPRCPPGSK (29.6)
328783352	99.6%	chymotrypsin inhibitor	7723.19	2	NGEGACVLPENC (25.84) IGCQCQEGFLR (32.03)
66560290	99.4%	lysosomal aspartic protease	42651.25	0	
328787622	98.2%	peptidylglycine alpha- hydroxylating monooxygenase	39201.47	3	YCFTAGPPR (25.88) DSWTYIGATK (46.04) VVSGYVVKPDYTWIELGK (39.62)
66511507	97.3%	endochitinase isoform 2	61895.26	5	TSVAVGGWGEGGR (39.56) KGWELTIAVPMK (21.23) LKTSVAVGGWGEGGR (31.15) LVVGIPLYGR (25.13) TFTLSQSNNNYEPGTYINK (35.2)
328778095	96.9%	lysosomal Pro-X carboxypeptidase- like	56965.61	2	SLNIQNELHSAK (39.37) ANFLAPLPAYPINAVCK (45.79)
58585098	95.3%	major royal jelly protein 1	49311.14	0	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kerr W. The history of the introduction of African bees to Brazil. South african bee journal. 1967;39:3-5.
2. McKenna WR. The Africanized honey bee. Allergy Proc. 1992 1992 Jan-Feb;13(1):7-10. PubMed PMID: 1577266. eng.
3. Schumacher MJ, Egen NB. Significance of Africanized bees for public health. A review. Arch Intern Med. 1995 Oct;155(19):2038-43. PubMed PMID: 7575061. eng.
4. Winston ML. The Africanized 'killer' bee: biology and public health. Q J Med. 1994 May;87(5):263-7. PubMed PMID: 7938406. eng.
5. França FO, Benvenuti LA, Fan HW, Dos Santos DR, Hain SH, Picchi-Martins FR, et al. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees--*Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. Q J Med. 1994 May;87(5):269-82. PubMed PMID: 7938407. eng.
6. Kaplan JK. What's buzzing with Africanized Honey Bees? Agricultural Research Magazine. 2004;52:4-8. Epub March 1, 2004.
7. Taylor OR. Health problems associated with African bees. Ann Intern Med. 1986 Feb;104(2):267-8. PubMed PMID: 3946961. eng.
8. Muñoz-Arizpe R, Velásquez-Jones L, Romero-Navarro B, Gómez-Chico R. [Acute kidney failure due to stings by Africanized bees]. Bol Med Hosp Infant Mex. 1992 Jun;49(6):388-90. PubMed PMID: 1632913. spa.
9. Abramson CI, Aquino IS. Behavioral studies of learning in the Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.). Brain Behav Evol. 2002;59(1-2):68-86. PubMed PMID: 12097861. eng.
10. Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ, Emore C. Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bees. Behav Genet. 2003 May;33(3):357-64. PubMed PMID: 12837024. eng.
11. Hunt GJ, Wood KV, Guzmán-Novoa E, Lee HD, Rothwell AP, Bonham CC. Discovery of 3-methyl-2-buten-1-yl acetate, a new alarm component in the sting apparatus of Africanized honeybees. J Chem Ecol. 2003 Feb;29(2):453-63. PubMed PMID: 12737269. eng.
12. Sherman RA. What physicians should know about Africanized honeybees. West J Med. 1995 Dec;163(6):541-6. PubMed PMID: 8553637. Pubmed Central PMCID: PMC1303260. eng.
13. BOCH R, SHEARER DA, STONE BC. Identification of isoamyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. Nature. 1962 Sep;195:1018-20. PubMed PMID: 13870346. eng.
14. Ghent RL, Gary NE. A chemical alarm releaser in honeybee stings (*Apis mellifera ligustica*). Psyche. 1962;69(1):1-6.
15. ALLERGEN NOMENCLATURE IUIS - Allergen Nomenclature Sub-Committee Home Page 2012 [cited 2012 April, 2012]. Available from: <http://www.allergen.org/index.php>.
16. Habermann E. [Pharmacologically important substances in the bee- and wasp-venoms]. Pharm Unserer Zeit. 1974 Sep;3(5):145-51. PubMed PMID: 4410384. ger.
17. Wade D, Boman A, Wåhlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4761-5. PubMed PMID: 1693777. Pubmed Central PMCID: PMC54197. eng.
18. Dempsey CE. The actions of melittin on membranes. Biochim Biophys Acta. 1990 May;1031(2):143-61. PubMed PMID: 2187536. eng.

19. Katsu T, Kuroko M, Morikawa T, Sanchika K, Fujita Y, Yamamura H, et al. Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. *Biochim Biophys Acta*. 1989 Aug;983(2):135-41. PubMed PMID: 2474329. eng.
20. Ladokhin AS, Selsted ME, White SH. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin. *Biophys J*. 1997 Apr;72(4):1762-6. PubMed PMID: 9083680. Pubmed Central PMCID: PMC1184370. eng.
21. Lee SY, Park HS, Lee SJ, Choi MU. Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: lack of selective activation of phospholipase A2 by melittin. *Arch Biochem Biophys*. 2001 May;389(1):57-67. PubMed PMID: 11370672. eng.
22. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep*. 2007 Oct;27(4-5):189-223. PubMed PMID: 17139559. eng.
23. Annand RR, Kontoyianni M, Penzotti JE, Dudler T, Lybrand TP, Gelb MH. Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. *Biochemistry*. 1996 Apr;35(14):4591-601. PubMed PMID: 8605210. eng.
24. Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science*. 1972 Jul;177(4046):314-22. PubMed PMID: 4113805. eng.
25. Dotimas EM, Hider RC. Honeybee venom. *Bee world*. 1987;2(68):51-71.
26. Fernandez J, Blanca M, Soriano V, Sanchez J, Juarez C. Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy*. 1999 Aug;29(8):1069-74. PubMed PMID: 10457110. eng.
27. Müller UR. [Insect venom allergy]. *Ther Umsch*. 1994 Jan;51(1):38-44. PubMed PMID: 7511840. ger.
28. Castro FFM. Reações alérgicas por venenos de Hymenoptera: experiencia de 20 anos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
29. Winston ML. The Africanized 'killer' bee: biology and public health. *Q J Med*. 1994 May;87(5):263-7. PubMed PMID: 7938406. eng.
30. Schumacher MJ, Egen NB, Tanner D. Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Aug;55(2):197-201. PubMed PMID: 8780460. eng.
31. Jones RG, Corteling RL, Bhogal G, Landon J. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Sep;61(3):361-6. PubMed PMID: 10497971. eng.
32. Santos KS. Identificação de proteínas do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) imunoreativas ao soro antiveneno por abordagem proteômica. Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2008.
33. Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Aug;1752(1):1-5. PubMed PMID: 16112630. eng.
34. Sobotka AK, Franklin RM, Adkinson NF, Valentine M, Baer H, Lichtenstein LM. Allergy to insect stings. II. Phospholipase A: the major allergen in honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1976 Jan;57(1):29-40. PubMed PMID: 54382. eng.
35. Hoffman DR. Hymenoptera venom allergens. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2006 Apr;30(2):109-28. PubMed PMID: 16645223. eng.
36. Wang H, Chang-Wong T, Tang HY, Speicher DW. Comparison of extensive protein fractionation and repetitive LC-MS/MS analyses on depth of analysis for complex proteomes. *J Proteome Res*. 2010 Feb;9(2):1032-40. PubMed PMID: 20014860. Pubmed Central PMCID: PMC2870931. eng.
37. Lundby A, Olsen JV. GeLCMS for in-depth protein characterization and advanced analysis of proteomes. *Methods Mol Biol*. 2011;753:143-55. PubMed PMID: 21604121. eng.

38. Jonsson AP, Aissouni Y, Palmberg C, Percipalle P, Nordling E, Daneholt B, et al. Recovery of gel-separated proteins for in-solution digestion and mass spectrometry. *Anal Chem*. 2001 Nov;73(22):5370-7. PubMed PMID: 11816562. eng.
39. Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006 Nov;127(3):635-48. PubMed PMID: 17081983. eng.
40. Haas W, Faherty BK, Gerber SA, Elias JE, Beausoleil SA, Bakalarski CE, et al. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jul;5(7):1326-37. PubMed PMID: 16635985. eng.
41. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev*. 1998 1998 Jan-Feb;17(1):1-35. PubMed PMID: 9768511. eng.
42. Olsen JV, Schwartz JC, Griep-Raming J, Nielsen ML, Damoc E, Denisov E, et al. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Dec;8(12):2759-69. PubMed PMID: 19828875. Pubmed Central PMCID: PMC2816009. eng.
43. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989 Oct;246(4926):64-71. PubMed PMID: 2675315. eng.
44. Wilm MS, Mann M. Electrospray and Taylor-Cone theory, dole's beam of macromolecules at last? *Inter-national Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1994;136(2-3):167-80. Epub Set, 1994.
45. Emmett MR, Caprioli RM. Micro-electrospray mass spectrometry: Ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1994;5(7):605-13. Epub July, 1994.
46. Chait BT. Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science*. 2006 Oct;314(5796):65-6. PubMed PMID: 17023639. eng.
47. Hearn MT, Aguilar MI, Mant CT, Hodges RS. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. LXXXV. Evaluation of the use of hydrophobicity coefficients for the prediction of peptide elution profiles. *J Chromatogr*. 1988 Apr;438(2):197-210. PubMed PMID: 3384884. eng.
48. Scigelova M, Makarov A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics*. 2006 Sep;6 Suppl 2:16-21. PubMed PMID: 17031791. eng.
49. Matrix science - help - peptide fragmentation [updated 05/01/2012; cited 2012 22/07/2012]. Available from: http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html.
50. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*. 1984 Nov;11(11):601. PubMed PMID: 6525415. eng.
51. Gygi SP, Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2000 Oct;4(5):489-94. PubMed PMID: 11006534. eng.
52. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1994;5:976-89.
53. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, et al. Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res*. 2004 2004 Sep-Oct;3(5):958-64. PubMed PMID: 15473683. eng.
54. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*. 2011 Apr;10(4):1794-805. PubMed PMID: 21254760. eng.

55. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000 Jun;405(6788):837-46. PubMed PMID: 10866210. eng.
56. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988 Oct;60(20):2299-301. PubMed PMID: 3239801. eng.
57. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 1998;2(8):151-3.
58. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989 Oct;246(4926):64-71. PubMed PMID: 2675315. eng.
59. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Oct;389(4):1017-31. PubMed PMID: 17668192. eng.
60. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Jul. PubMed PMID: 22772140. ENG.
61. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002 May;1(5):376-86. PubMed PMID: 12118079. eng.
62. Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, Wisniewski JR, Mann M. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods*. 2010 May;7(5):383-5. PubMed PMID: 20364148. eng.
63. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Dec;3(12):1154-69. PubMed PMID: 15385600. eng.
64. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999 Oct;17(10):994-9. PubMed PMID: 10504701. eng.
65. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun;100(12):6940-5. PubMed PMID: 12771378. Pubmed Central PMCID: PMC165809. eng.
66. Gevaert K, Impens F, Ghesquière B, Van Damme P, Lambrechts A, Vandekerckhove J. Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics*. 2008 Dec;8(23-24):4873-85. PubMed PMID: 19003869. eng.
67. iTRAQ | Broad Institute of MIT and Harvard. 2012 [cited 2012]. Available from: www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/itraq.
68. Patel VJ, Thalassinou K, Slade SE, Connolly JB, Crombie A, Murrell JC, et al. A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J Proteome Res*. 2009 Jul;8(7):3752-9. PubMed PMID: 19435289. eng.
69. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. 2011 Feb;11(4):535-53. PubMed PMID: 21243637. eng.
70. Mueller LN, Brusniak MY, Mani DR, Aebersold R. An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res*. 2008 Jan;7(1):51-61. PubMed PMID: 18173218. eng.

71. America AH, Cordewener JH. Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys. *Proteomics*. 2008 Feb;8(4):731-49. PubMed PMID: 18297651. eng.
72. Meng Y, Liu F, Pang C, Fan S, Song M, Wang D, et al. Label-free quantitative proteomics analysis of cotton leaf response to nitric oxide. *J Proteome Res*. 2011 Dec;10(12):5416-32. PubMed PMID: 22029526. eng.
73. Oswald ES, Brown LM, Bulinski JC, Hung CT. Label-free protein profiling of adipose-derived human stem cells under hyperosmotic treatment. *J Proteome Res*. 2011 Jul;10(7):3050-9. PubMed PMID: 21604804. Pubmed Central PMCID: PMC3153440. eng.
74. Mueller LN, Rinner O, Schmidt A, Letarte S, Bodenmiller B, Brusniak MY, et al. SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protein profiling. *Proteomics*. 2007 Oct;7(19):3470-80. PubMed PMID: 17726677. eng.
75. Sturm M, Bertsch A, Gröpl C, Hildebrandt A, Hussong R, Lange E, et al. OpenMS - an open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:163. PubMed PMID: 18366760. Pubmed Central PMCID: PMC2311306. eng.
76. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008 Dec;26(12):1367-72. PubMed PMID: 19029910. eng.
77. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:840518. PubMed PMID: 19911078. Pubmed Central PMCID: PMC2775274. eng.
78. Deutsch EW, Mendoza L, Shteynberg D, Farrah T, Lam H, Tasman N, et al. A guided tour of the Trans-Proteomic Pipeline. *Proteomics*. 2010 Mar;10(6):1150-9. PubMed PMID: 20101611. Pubmed Central PMCID: PMC3017125. eng.
79. Polpitiya AD, Qian WJ, Jaitly N, Petyuk VA, Adkins JN, Camp DG, et al. DAnTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics*. 2008 Jul;24(13):1556-8. PubMed PMID: 18453552. Pubmed Central PMCID: PMC2692489. eng.
80. Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods*. 2007 Mar;4(3):207-14. PubMed PMID: 17327847. eng.
81. Spirin V, Shpunt A, Seebacher J, Gentzel M, Shevchenko A, Gygi S, et al. Assigning spectrum-specific P-values to protein identifications by mass spectrometry. *Bioinformatics*. 2011 Apr;27(8):1128-34. PubMed PMID: 21349864. Pubmed Central PMCID: PMC3072553. eng.
82. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2003 Sep;75(17):4646-58. PubMed PMID: 14632076. eng.
83. Köcher T, Pichler P, Swart R, Mechtler K. Quality control in LC-MS/MS. *Proteomics*. 2011 Mar;11(6):1026-30. PubMed PMID: 21360669. eng.
84. Van Belle G, Fisher L. *Biostatistics: a methodology for the health sciences*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons; 2004. 871 p.
85. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85. PubMed PMID: 3843705. eng.
86. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May;72:248-54. PubMed PMID: 942051. eng.
87. Ting L, Cowley MJ, Hoon SL, Guilhaus M, Raftery MJ, Cavicchioli R. Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Oct;8(10):2227-42. PubMed PMID: 19605365. Pubmed Central PMCID: PMC2758752. eng.

88. Callister SJ, Barry RC, Adkins JN, Johnson ET, Qian WJ, Webb-Robertson BJ, et al. Normalization approaches for removing systematic biases associated with mass spectrometry and label-free proteomics. *J Proteome Res.* 2006 Feb;5(2):277-86. PubMed PMID: 16457593. Pubmed Central PMCID: PMC1992440. eng.
89. Clough T, Key M, Ott I, Ragg S, Schadow G, Vitek O. Protein quantification in label-free LC-MS experiments. *J Proteome Res.* 2009 Nov;8(11):5275-84. PubMed PMID: 19891509. eng.
90. Karpievitch Y, Stanley J, Taverner T, Huang J, Adkins JN, Ansong C, et al. A statistical framework for protein quantitation in bottom-up MS-based proteomics. *Bioinformatics.* 2009 Aug;25(16):2028-34. PubMed PMID: 19535538. Pubmed Central PMCID: PMC2723007. eng.
91. Bonferroni CE. Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste. *Studi in Onore del Professore Salvatore Ortu Carboni.* 1935:13-60.
92. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological.* 1995;57(1):289-300. Epub 19/10/2009.
93. Han KK, Martinage A. Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int J Biochem.* 1992;24(1):19-28. PubMed PMID: 1582530. eng.
94. Appel RD, Bairoch A. Post-translational modifications: a challenge for proteomics and bioinformatics. *Proteomics.* 2004 Jun;4(6):1525-6. PubMed PMID: 15174121. eng.
95. Kersten B, Agrawal GK, Iwahashi H, Rakwal R. Plant phosphoproteomics: a long road ahead. *Proteomics.* 2006 Oct;6(20):5517-28. PubMed PMID: 16991200. eng.
96. Paradela A, Albar JP. Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J Proteome Res.* 2008 May;7(5):1809-18. PubMed PMID: 18327898. eng.
97. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):140-6. PubMed PMID: 19269802. Pubmed Central PMCID: PMC2670436. eng.
98. Hunter T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998 Apr;353(1368):583-605. PubMed PMID: 9602534. Pubmed Central PMCID: PMC1692245. eng.
99. Krebs EG. Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1983 Jul;302(1108):3-11. PubMed PMID: 6137005. eng.
100. Yan JX, Packer NH, Gooley AA, Williams KL. Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *J Chromatogr A.* 1998 May;808(1-2):23-41. PubMed PMID: 9652109. eng.
101. Yan GR, Xiao CL, He GW, Yin XF, Chen NP, Cao Y, et al. Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways. *Proteomics.* 2010 Mar;10(5):976-86. PubMed PMID: 20049867. eng.
102. Zolnierowicz S, Bollen M. Protein phosphorylation and protein phosphatases. *De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. EMBO J.* 2000 Feb;19(4):483-8. PubMed PMID: 10675316. Pubmed Central PMCID: PMC305585. eng.
103. Mann M, Ong SE, Grønborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* 2002 Jun;20(6):261-8. PubMed PMID: 12007495. eng.
104. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.* 2001 Feb;101(2):269-95. PubMed PMID: 11712248. eng.
105. Liao PC, Leykam J, Andrews PC, Gage DA, Allison J. An approach to locate phosphorylation sites in a phosphoprotein: mass mapping by combining specific enzymatic

degradation with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1994 May;219(1):9-20. PubMed PMID: 8059960. eng.

106. Eyrich B, Sickmann A, Zahedi RP. Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics.* 2011 Feb;11(4):554-70. PubMed PMID: 21226000. eng.

107. Pandey A, Fernandez MM, Steen H, Blagoev B, Nielsen MM, Roche S, et al. Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, STAM2, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000 Dec;275(49):38633-9. PubMed PMID: 10993906. eng.

108. Negroni L, Claverol S, Rosenbaum J, Chevet E, Bonneau M, Schmitter JM. Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Apr;891-892:109-12. PubMed PMID: 22406350. eng.

109. Nühse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC. Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Nov;2(11):1234-43. PubMed PMID: 14506206. eng.

110. Villén J, Beausoleil SA, Gerber SA, Gygi SP. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan;104(5):1488-93. PubMed PMID: 17242355. Pubmed Central PMCID: PMC1785252. eng.

111. McNulty DE, Annan RS. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Mol Cell Proteomics.* 2008 May;7(5):971-80. PubMed PMID: 18212344. eng.

112. Ye J, Zhang X, Young C, Zhao X, Hao Q, Cheng L, et al. Optimized IMAC-IMAC protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *J Proteome Res.* 2010 Jul;9(7):3561-73. PubMed PMID: 20450229. eng.

113. Imanishi SY, Kochin V, Ferraris SE, de Thonel A, Pallari HM, Corthals GL, et al. Reference-facilitated phosphoproteomics: fast and reliable phosphopeptide validation by microLC-ESI-Q-TOF MS/MS. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Aug;6(8):1380-91. PubMed PMID: 17510049. eng.

114. Carr SA, Huddleston MJ, Annan RS. Selective detection and sequencing of phosphopeptides at the femtomole level by mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1996 Aug;239(2):180-92. PubMed PMID: 8811904. eng.

115. Schlosser A, Pipkorn R, Bossemeyer D, Lehmann WD. Analysis of protein phosphorylation by a combination of elastase digestion and neutral loss tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2001 Jan;73(2):170-6. PubMed PMID: 11199962. eng.

116. Nagaraj N, D'Souza RC, Cox J, Olsen JV, Mann M. Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation. *J Proteome Res.* 2010 Dec;9(12):6786-94. PubMed PMID: 20873877. eng.

117. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods.* 2007 Sep;4(9):709-12. PubMed PMID: 17721543. eng.

118. McAlister GC, Phanstiel DH, Brumbaugh J, Westphall MS, Coon JJ. Higher-energy collision-activated dissociation without a dedicated collision cell. *Mol Cell Proteomics.* 2011 May;10(5):O111.009456. PubMed PMID: 21393638. Pubmed Central PMCID: PMC3098599. eng.

119. Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Anal Chem.* 2000 Feb;72(3):563-73. PubMed PMID: 10695143. eng.

120. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun;101(26):9528-33. PubMed PMID: 15210983. Pubmed Central PMCID: PMC470779. eng.
121. Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb;104(7):2199-204. PubMed PMID: 17287340. Pubmed Central PMCID: PMC1794346. eng.
122. Zougman A, Pilch B, Podtelejnikov A, Kiehnopf M, Schnabel C, Kumar C, et al. Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J Proteome Res*. 2008 Jan;7(1):386-99. PubMed PMID: 18052119. eng.
123. Zhang Y, Ficarro SB, Li S, Marto JA. Optimized Orbitrap HCD for quantitative analysis of phosphopeptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2009 Aug;20(8):1425-34. PubMed PMID: 19403316. eng.
124. Schlosser A, Volkmer-Engert R. Volatile polydimethylcyclsiloxanes in the ambient laboratory air identified as source of extreme background signals in nanoelectrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2003 May;38(5):523-5. PubMed PMID: 12794873. eng.
125. Hide I, Bennett JP, Pizzey A, Boonen G, Bar-Sagi D, Gomperts BD, et al. Degranulation of individual mast cells in response to Ca²⁺ and guanine nucleotides: an all-or-none event. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):585-93. PubMed PMID: 8227127. Pubmed Central PMCID: PMC2200119. eng.
126. Han G, Ye M, Liu H, Song C, Sun D, Wu Y, et al. Phosphoproteome analysis of human liver tissue by long-gradient nanoflow LC coupled with multiple stage MS analysis. *Electrophoresis*. 2010 Mar;31(6):1080-9. PubMed PMID: 20166139. eng.
127. Wang F, Dong J, Ye M, Wu R, Zou H. Improvement of proteome coverage using hydrophobic monolithic columns in shotgun proteome analysis. *J Chromatogr A*. 2009 May;1216(18):3887-94. PubMed PMID: 19303076. eng.
128. Wang X, Stoll DR, Schellinger AP, Carr PW. Peak capacity optimization of peptide separations in reversed-phase gradient elution chromatography: fixed column format. *Anal Chem*. 2006 May;78(10):3406-16. PubMed PMID: 16689544. Pubmed Central PMCID: PMC2638764. eng.
129. Müller UR. Hymenoptera venom proteins and peptides for diagnosis and treatment of venom allergic patients. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011 Oct;10(5):420-8. PubMed PMID: 21756243. eng.
130. Hoffman DR, Shipman WH. Allergens in bee venom. I. Separation and identification of the major allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1976 Nov;58(5):551-62. PubMed PMID: 977862. eng.
131. Hoffman DR, Shipman WH, Babin D. Allergens in bee venom II. Two new high molecular weight allergenic specificities. *J Allergy Clin Immunol*. 1977 Feb;59(2):147-53. PubMed PMID: 401840. eng.
132. Hoffman DR. Allergens in bee venom. III. Identification of allergen B of bee venom as an acid phosphatase. *J Allergy Clin Immunol*. 1977 May;59(5):364-6. PubMed PMID: 853176. eng.
133. Santos LD, Santos KS, de Souza BM, Arcuri HA, Cunha-Neto E, Castro FM, et al. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). *Toxicon*. 2007 Dec;50(7):923-37. PubMed PMID: 17761205. eng.
134. dos Santos LD, da Silva Menegasso AR, dos Santos Pinto JR, Santos KS, Castro FM, Kalil JE, et al. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom

- of the social wasp *Polybia paulista*. *Proteomics*. 2011 Apr;11(8):1403-12. PubMed PMID: 21365748. eng.
135. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Oct;123(2):99-106. PubMed PMID: 11060481. eng.
 136. Gallagher P, Bao Y, Serrano SM, Laing GD, Theakston RD, Gutiérrez JM, et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. *Arch Biochem Biophys*. 2005 Sep;441(1):1-15. PubMed PMID: 16083850. eng.
 137. Koya S, Crenshaw D, Agarwal A. Rhabdomyolysis and acute renal failure after fire ant bites. *J Gen Intern Med*. 2007 Jan;22(1):145-7. PubMed PMID: 17351856. Pubmed Central PMCID: PMC1824724. eng.
 138. Sitprija V, Boonpucknavig V. Renal failure and myonecrosis following wasp-stings. *Lancet*. 1972 Apr;1(7753):749-50. PubMed PMID: 4111226. eng.
 139. Peiren N, de Graaf DC, Vanrobaeys F, Danneels EL, Devreese B, Van Beeumen J, et al. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*. 2008 Jul;52(1):72-83. PubMed PMID: 18573272. eng.
 140. dos Santos LD, Santos KS, Pinto JR, Dias NB, de Souza BM, dos Santos MF, et al. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J Proteome Res*. 2010 Aug;9(8):3867-77. PubMed PMID: 20540563. eng.
 141. Crichton RR, Charlotteaux-Wauters M. Iron transport and storage. *Eur J Biochem*. 1987 May;164(3):485-506. PubMed PMID: 3032619. eng.
 142. Georgieva D, Seifert J, Öhler M, von Bergen M, Spencer P, Arni RK, et al. *Pseudechis australis* venomomics: adaptation for a defense against microbial pathogens and recruitment of body transferrin. *J Proteome Res*. 2011 May;10(5):2440-64. PubMed PMID: 21417486. eng.
 143. Winningham KM, Fitch CD, Schmidt M, Hoffman DR. Hymenoptera venom protease allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;114(4):928-33. PubMed PMID: 15480337. eng.
 144. Sacher M, Di Bacco A, Lunin VV, Ye Z, Wagner J, Gill G, et al. The crystal structure of CREG, a secreted glycoprotein involved in cellular growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec;102(51):18326-31. PubMed PMID: 16344469. Pubmed Central PMCID: PMC1317909. eng.
 145. Pelosi P, Calvello M, Ban L. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chem Senses*. 2005 Jan;30 Suppl 1:i291-2. PubMed PMID: 15738163. eng.
 146. Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Res*. 2006 Nov;16(11):1385-94. PubMed PMID: 17065613. Pubmed Central PMCID: PMC1626640. eng.
 147. Schmitzová J, Klaudivy J, Albert S, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci*. 1998 Sep;54(9):1020-30. PubMed PMID: 9791542. eng.
 148. Garcia L, Saraiva Garcia CH, Calábria LK, Costa Nunes da Cruz G, Sánchez Puentes A, Báó SN, et al. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. *J Proteome Res*. 2009 Mar;8(3):1464-73. PubMed PMID: 19203288. eng.
 149. Blank S, Bantleon, F. I., McIntyre, M., Ollert, M. and Spillner, E. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate based reactivity. *Clinical & Experimental Allergy*. 2012.

150. de Graaf DC, Brunain M, Scharlaken B, Peiren N, Devreese B, Ebo DG, et al. Two novel proteins expressed by the venom glands of *Apis mellifera* and *Nasonia vitripennis* share an ancient C1q-like domain. *Insect Mol Biol.* 2010 Feb;19 Suppl 1:1-10. PubMed PMID: 20167013. eng.
151. Rodriguez-Lainz A, Fritz CL, McKenna WR. Animal and human health risks associated with Africanized honeybees. *J Am Vet Med Assoc.* 1999 Dec;215(12):1799-804. PubMed PMID: 10613211. eng.
152. Peiren N, de Graaf DC, Brunain M, Bridts CH, Ebo DG, Stevens WJ, et al. Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein. *FEBS Lett.* 2006 Sep;580(20):4895-9. PubMed PMID: 16914147. eng.
153. Kocher SD, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM. Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics.* 2008;9:232. PubMed PMID: 18489784. Pubmed Central PMCID: PMC2413142. eng.
154. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics.* 2009 Mar;9(6):1451-68. PubMed PMID: 19235172. eng.
155. Wong KL, Li H, Wong KK, Jiang T, Shaw PC. Location and reduction of icarapin antigenicity by site specific coupling to polyethylene glycol. *Protein Pept Lett.* 2012 Feb;19(2):238-43. PubMed PMID: 21838698. eng.
156. Shipolini RA, Callewaert GL, Cottrell RC, Doonan S, Vernon CA, Banks BE. Phospholipase A from bee venom. *Eur J Biochem.* 1971 Jun;20(4):459-68. PubMed PMID: 5087615. eng.
157. Banks BE, Dempsey CE, Pearce FL, Vernon CA, Wholley TE. New methods of isolating been venom peptides. *Anal Biochem.* 1981 Sep;116(1):48-52. PubMed PMID: 7304985. eng.
158. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec;1462(1-2):71-87. PubMed PMID: 10590303. eng.
159. Hider RC, Khader F, Tatham AS. Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. *Biochim Biophys Acta.* 1983 Feb;728(2):206-14. PubMed PMID: 6830776. eng.
160. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution. *Biopolymers.* 2006 Oct;83(2):111-21. PubMed PMID: 16680713. eng.
161. Mukai H, Wakamatsu K. [Mastoparan as a G protein activator]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2001 Mar;46(4 Suppl):423-8. PubMed PMID: 11268642. jpn.
162. Ho CL, Hwang LL. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. *Biochem J.* 1991 Mar;274 (Pt 2):453-6. PubMed PMID: 2006909. Pubmed Central PMCID: PMC1150160. eng.
163. Ross EM, Higashijima T. Regulation of G-protein activation by mastoparans and other cationic peptides. *Methods Enzymol.* 1994;237:26-37. PubMed PMID: 7935002. eng.
164. Nishikawa H, Kitani S. Inhibitory effect of ganglioside on mastoparan-induced cytotoxicity and degranulation in lipid raft of connective tissue type mast cell. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011 May-Jun;25(3):158-68. PubMed PMID: 21671308. eng.
165. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997 Jun;387(6633):569-72. PubMed PMID: 9177342. eng.
166. Dráberová L, Dudková L, Boubelík M, Tolarová H, Smíd F, Dráber P. Exogenous administration of gangliosides inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell degranulation by decreasing the activity of phospholipase C gamma. *J Immunol.* 2003 Oct;171(7):3585-93. PubMed PMID: 14500655. eng.

167. Hou Y, Tse R, Mahuran DJ. Direct determination of the substrate specificity of the alpha-active site in heterodimeric beta-hexosaminidase A. *Biochemistry*. 1996 Apr;35(13):3963-9. PubMed PMID: 8672428. eng.
168. Nishikawa H, Kitani S. Gangliosides inhibit bee venom melittin cytotoxicity but not phospholipase A(2)-induced degranulation in mast cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 May;252(3):228-36. PubMed PMID: 21334356. eng.