

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

*Fracionamento Cromatográfico das Frações Protéicas da Geléia Real de *Apis mellifera**

Inez Repton Dias

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Setembro -2002

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

*Fracionamento Cromatográfico das Frações
Protéicas da Geléia Real de Apis mellifera*

Inez Repton Dias

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Setembro -2002

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas

*Fracionamento Cromatográfico das Frações Protéicas da Geléia Real de *Apis mellifera**

Inez Repton Dias

Aprovado pela Banca Examinadora em 17/09/02 Nota: 7,7

Orientador: Prof^o. Dr. Foued Salmen Espindola

Ms. Leticia Borges Euqueres Partata

Ms. Danielle Reis Napolitano

*Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas*

Uberlândia, 17 de setembro de 2002.

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Agradecimentos :

A Deus por tudo, especialmente, por estes momentos onde eu sinto que é o teu amor que me conduz e me acalma. A Deus pelas três jóias que colocou na minha vida: minha mãe e minhas duas irmãs (por nossas vitórias). A Deus pelas pessoas maravilhosas que me alegram: minhas grandes amigas (pelos sorrisos e palavras); os amigos do Grupo de Oração Universitário- GOU (pela confiança); do Bueno Brandão (pelo carinho); da 48ª Turma de Ciências Biológicas (pela amizade sincera e única de muitos biólogos "a nossa turma", pelo apoio incondicional de uma querida amiga e companheira de aventuras) e da 50ª Turma de Odontologia (pelo respeito e receptividade). A Deus pela oportunidade de me formar profissionalmente ao lado de um professor e orientador respeitado por muitos e pelo apoio de colegas do laboratório admirados por tantos outros. Em particular pelas colaborações firmadas para a realização deste trabalho. A Deus pelo orgulho enorme do meu avô, por sua honestidade e dedicação exclusiva a nossa família e pelo carinho de meus familiares. Eu só posso agradecer, cada dia mais, a Deus por cada um de vocês que estão sempre se fazendo presentes na minha vida.

A realização deste trabalho, coordenado pelo Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, contou com o apoio e ajuda preciosos dos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do qual me sinto honrada em pertencer, além das colaborações fundamentais, firmadas com o Apiários Girrassol de Uberlândia-MG, na pessoa do Sr. Cláudio Lemos Franco; Casa do Mel em Governador Valadares-MG; Laboratório de Imunologia do Instituto de Imunologia, Parasitologia e Microbiologia Aplicadas, desta instituição, em especial a pesquisadora Deise Aparecida Oliveira Silva e da Empresa Vallée S.A., Uberlândia-MG, através do médico veterinário Laudio Aless Machado.

Resumo:

A geléia real (GR) é uma secreção proteinácea sintetizada pela glândula hipofaríngeal das abelhas operárias de *Apis mellifera*, para alimentar as abelhas até o terceiro dia do estágio larval, tornando-se o alimento exclusivo da rainha ao longo de seu desenvolvimento, o que lhe garante fertilidade e maior longevidade. Desse modo a GR está relacionada com a diferenciação de castas na colmeia. As principais proteínas da GR são conhecidas como *major royal jelly proteins*, (MRJPs). Esta família consiste de cinco membros designados MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5. A GR foi homogeneizada em Tampão de Homogeneização, centrifugada, dialisada e novamente centrifugada, para obtenção do extrato protéico que será utilizado nos ensaios bioquímicos e imunológicos, como o fracionamento cromatográfico das proteínas da GR e a inoculação deste composto protéico em mamíferos para a produção e purificação de anticorpos contra estas proteínas. Foi observado que a resina aniônica fosfocelulose apresentou o melhor perfil cromatográfico da GR em SDS-PAGE. Além disso os animais inoculados com GR produziram os anticorpos contra as MRJPs, sendo possível a purificação, por imunoafinidade, de IgG anti-MRJP1 e IgG anti-MRJP3 a partir do soro de camundongo.

Palavras-chaves: *Apis mellifera*, Geléia real, proteínas.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO:	1
1. 1- AS ABELHAS <i>APIS MELLIFERA</i> :	1
1. 2- GELÉIA REAL:	3
1. 3- PROPRIEDADES APITERÁPICAS E TECNOLÓGICAS DA GELÉIA REAL:	10
2- OBJETIVOS:	13
3- MATERIAL E MÉTODOS:	14
3. 1- OBTENÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:	14
3. 2- PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO:	14
3. 3- FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DE GR EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA:	15
3. 4- ANÁLISE ELETROFORÉTICA SDS-PAGE:	15
3. 5- DOSAGEM DE PROTEÍNAS:	17
3. 6- IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS:	17
3. 6. 1- IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS:	17
3. 6. 2- IMUNIZAÇÃO DE COELHOS:	18
3. 7- ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA:	18
3. 8- PREPARAÇÃO DOS SOROS:	19
3. 9- PURIFICAÇÃO DE IGG ANTI-GR:	19
3. 10- PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO POR AFINIDADE:	20
3. 11- WESTERN BLOT:	20
4- RESULTADOS:	22
4. 1- CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA DA GELÉIA REAL:	22
4. 2- PERFIL CROMATOGRÁFICO:	23
4. 3- CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA GELÉIA REAL:	29
5- DISCUSSÃO:	33
6- CONCLUSÃO:	36
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	37

1- INTRODUÇÃO:

Este trabalho tem a caracterização e purificação protéica da geléia real de *Apis mellifera* (GR) como primícias para o aprofundamento acerca dos princípios bioquímicos de seus componentes protéicos, que atuam na regularização de vários processos fisiológicos em abelhas e no nosso organismo. O mesmo pode ser incentivado por opiniões empíricas que relatam ser a GR um composto alimentar de grande importância por atuar na regulação metabólica, no funcionamento de órgãos vitais e na melhoria e prevenção de infecções e doenças de pele. Popularmente a GR é muito usada por conferir longevidade às pessoas que a consomem, como no caso da China onde o consumo de GR é bastante difundido. A GR, cientificamente é tratada como um composto alimentar rico em proteínas, açúcares, vitaminas e outras biomoléculas com aplicações terapêuticas e tecnológicas importantes.

1. 1- As abelhas *Apis mellifera*:

As primeiras *Apis mellifera* européias foram introduzidas no Brasil em 1839 pelo Padre Antônio Carneiro. As africanas foram trazidas em 1956 pelo Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, sendo uma das espécies de abelhas mais conhecidas e estudadas,

principalmente por sua grande importância econômica. Dela são extraídos o mel, a cera, a geléia real, o própolis e outros subprodutos.

As abelhas são consideradas um valioso modelo biológico para estudos tendo em vista o seu complexo comportamento social, no que diz respeito à memória olfatória e capacidade de aprendizado, além de serem importantes para testar a eficácia de drogas e pesticidas. Sendo assim, o estudo da GR de *Apis mellifera* justifica-se pela necessidade de se esclarecer vários fatores fisiológicos e bioquímicos que interferem diretamente na vida da rainha, bem como na sua diferenciação e desenvolvimento.

Estes insetos sociais apresentam polifenismo ou formas morfológicas alternativas acompanhadas por diferenças fisiológicas e comportamentais, onde rainhas e operárias são formas alternativas da fêmea adulta.

Existem vários genes responsáveis pela diferenciação na expressão gênica da abelha rainha e operária, sendo que sete locus caracterizam a evolução e função do grupo. Desses dois, um deles é homólogo a uma classe de proteínas muito difundida que ligam lipídeos e outras proteínas hidrossolúveis. O segundo mostra uma seqüência similar para o DNA. Sabe-se que a GR tem um papel essencial na diferenciação das castas, pelo fato de ser o alimento da rainha desde o momento de seu estágio larval. A GR também atua no desenvolvimento e diferenciação da rainha, que possui um corpo maior do que o da operária, além de promover sua longevidade, uma vez que a rainha vive cinco anos enquanto a operária vive cinquenta dias. Entretanto os princípios bioquímicos que explicam como isto acontece ainda não são conhecidos (Evans *et al.*, 1998).

O papel das abelhas operárias muda com a idade, ou seja, a função das operárias muda conforme o tempo de vida de cada uma delas. Quando são jovens as abelhas enfermeiras secretam um mel leitoso (geléia real) e as abelhas velhas forrageiras trazem néctar e pólen para produzir mel. O perfil eletroforético da glândula hipofaríngeal de operárias mostra que as proteínas secretadas por ela mudam com a idade. A análise de *immunoblotting* usando anticorpo purificado contra três proteínas principais (50, 56, e 64 kDa) de abelhas enfermeiras indica que elas são sintetizadas seletivamente e secretadas como proteínas da GR. Entretanto, a principal proteína sintetizada especificamente na glândula hipofaríngeal da abelha forrageira é a de 70 kDa que foi identificada como α -glicosidase. Por esta razão a glândula hipofaríngeal parece ter dois estados distintos

diferenciados pela síntese de várias proteínas dependentes da alteração funcional de acordo com a idade (Kubo *et al.*, 1996).

1. 2- Geléia real:

A GR é um composto protéico sintetizado pela glândula hipofaríngea da abelha operária de *Apis mellifera*. Até o terceiro dia do estágio larval as abelhas se alimentam de GR, sendo que depois a GR passa a ser o alimento exclusivo da rainha. Esta se apresenta mais robusta, fértil e com maior longevidade em relação à operária, desse modo acredita-se que a GR atua na diferenciação das castas na colméia.

A composição bioquímica da GR pode variar geograficamente e de acordo com as condições climáticas (Albert *et al.*, 1999 a). Geralmente a GR é composta de 60-70% de umidade (água); 12-15% de proteínas, das quais a maioria é composta de proteínas hidrossolúveis (*water soluble proteins-WSP*); 10-16% de açúcar; 3-6% de lipídeos e 2-3% de moléculas de baixo peso molecular como vitaminas, sais minerais e aminoácidos livres (Tabela 01) (Albert *et al.*, 1999a e Schimitzová *et al.*, 1998).

Tabela 01: Composição bioquímica da GR. A composição bioquímica foi obtida por ultracentrifugação e liofilização de amostras de GR, sendo que a GR-gel representa a fração de GR pura. (Simúth, 2001).

	Royal Jelly (RJ)	RJ-supernatant	RJ-soft-sediment	RJ-sediment	RJ-gel
SUGARS					
Fructose	14.0	21.8	10.6	3.8	1.7
Glucose	18.8	27.2	12.1	4.1	1.1
Saccharose	1.0	0.9	0.4	0.1	1.7
Trehalose	0.2	0.2	0.4	0.1	0.06
Other	0.7	1.1	0.39	0.03	0.24
Total	34.3	50.6	23.4	8.13	4.8
FATTY ACIDS					
10-H-2-DA	10.5	0.7	6.4	36.6	0.13
10-H-DA	2.7	0.4	2.1	8.6	0.04
Other	2.0	0.1	3.0	2.9	0.23
Total	15.2	1.2	11.5	48.1	0.4
CRUDE PROTEIN	39.3	35.3	57.1	40.3	88.4
ASH	2.8	0.85	4.5	0.56	0.21
DRY MATTER (%)					
Lyophilized sample	93.5	90.3	96.8	97.6	97.9
Original sample	33.8	21.5	49.1	65.7	34.2

10-H-2-DA: 10-hydroxy-2-decanoic acid.
10-H-DA: 10-hydroxy-decanoic acid.

Os estudos sobre as proteínas hidrossolúveis de GR têm se baseado em análises cromatográficas e na comparação das propriedades imunológicas destas proteínas, bem como das proteínas expressa na glândula hipofaríngeal de abelhas operárias em diferentes estágios de vida. A amostra designada como WJ corresponde ao homogeneizado de glândulas hipofaríngeal em Tampão de Homogeneização pH 8.0 (descrito no item 3.2). As principais proteínas hidrossolúveis da GR são conhecidas como *major royal jelly proteins*, (MRJPs). Esta família consiste de cinco membros designados MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 e MRJP5, sendo as proteínas MRJP3 e MRJP5 polimórficas (**Figura 01**). As MRJPs representam de 82% a 90% de proteínas da GR, além de conter alta porcentagem de aminoácidos essenciais. (Schimitzová *et al.*, 1998).

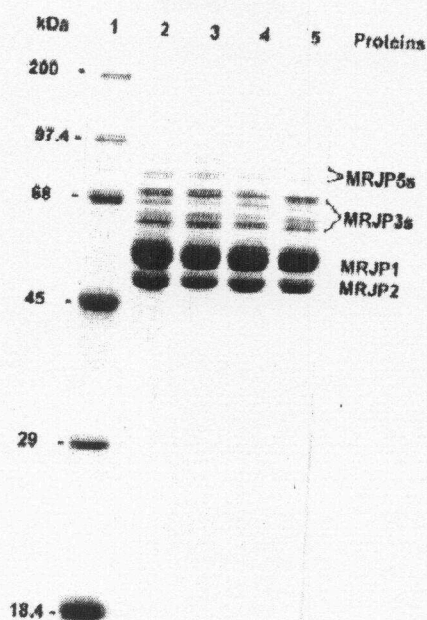


Figura01: Análise das proteínas de GR e de WJ (geléia obtida através de um pool de células de larvas de operárias homogeneizadas em Tampão fosfato, como descrito nos materiais e métodos), por SDS-PAGE (gel 10% de poliacrilamida). 1- Padrão de peso molecular; 2. Homogeneizado de WJ em tampão fosfato; 3- Homogeneizado de GR em tampão fosfato (70mg/ml); 4- sobrenadante após centrifugação de WJ homogeneizada (9 μ g de proteínas); 5- sobrenadante após centrifugação de GR homogeneizada (8 μ g de proteínas). O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Schimitsová *et al.*, 1998).

As proteínas MRJPs contêm um alto grau de homologia entre elas, sendo encontrado 64% de identidade entre a MRJP1 e MRJP2; 62% entre a MRJP2 e MRJP3; 61% entre a MRJP1 e MRJP5; 72% entre a MRJP2 e MRJP5; 68% entre a MRJP3 e MRJP5 e entre a MRJP2 e MRJP3 (**Figura 02**) (Blast European Bioinformatics Intitute www.ncbi.nlm.nih.gov). O peso molecular de cada proteína foi determinado como: MRJP1 55kDa; MRJP2 49kDa; MRJP3s 60,63,66 e70kDa; MRJP4 50kDa; MRJP5s77 e 87kDa (Schimitsová *et al.*, 1998). O gene das proteínas MRJPs tem uma origem evolutiva comum com a proteína *yellow* de *Drosophyla melanogaster* (Albert *et al.*, 1999a).

MRJP2	MTWLLVVLGLA...	24
MRJP3	MTWLLVVLGLA...	56
MRJP4	MTWLLVVLGLA...	60
MRJP5	MTWLLVVLGLA...	58
MRJP1	LSGVYV...	114
MRJP2	LSGVYV...	115
MRJP3	LSGVYV...	120
MRJP4	LSGVYV...	118
MRJP5	LSGVYV...	118
MRJP1	YDCCSDI...	174
MRJP2	YDCCSDI...	175
MRJP3	YDCCSDI...	180
MRJP4	YDCCSDI...	178
MRJP5	YDCCSDI...	178
MRJP1	AFNATD...	214
MRJP2	AFNATD...	212
MRJP3	AFNATD...	217
MRJP4	AFNATD...	212
MRJP5	AFNATD...	212
MRJP1	STTSTST...	281
MRJP2	STTSTST...	282
MRJP3	STTSTST...	284
MRJP4	STTSTST...	280
MRJP5	STTSTST...	280

Figura02: Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas da família MRJP. O alinhamento dos resíduos de aminoácidos foi feito usando o programa CLUSTAL V (Higgins and Sharp 1998). Os pontos indicam as posições do alinhamento que foram conservadas. A seqüência de MRJP4 mostra aminoácidos cisteina conservados. As regiões de MRJP3 e MRJP5 mostram motivos repetidos. (Schimitzová *et al.*, 1998).

As MRJPs respondem por importantes funções na nutrição das abelhas uma vez que fornecem um suprimento de aminoácidos essenciais presentes na sua estrutura primária principalmente na estrutura das MRJP1, MRJP4 e MRJP5, além de fornecerem nitrogênio biológico, requerido para o rápido desenvolvimento do organismo (Albert *et al.*, 1999a). Os aminoácidos essenciais presentes na GR, relacionados a seguir (Tabela 02), estão envolvidos com o desenvolvimento da abelha, sendo que a MRJP1 apresenta 48% de aminoácidos essenciais, que corresponde a dez diferentes aminoácidos (Schimitzová *et al.*, 1998).

Tabela 02. Composição de aminoácidos das MRJPs. Porcentagem de aminoácidos das proteínas nativas de GR, obtidas por análise computacional (programa PC Gene 6.7) (Schimitzová *et al.*, 1998).

%	MRJP1	MRJP2	MRJP3	MRJP4	MRJP5
Ala	3.9	6.2	4.9	4.3	3.8
Arg	3.4	3.8	4.9	4.1	9.0
Asn	6.9	11.3	15.9	13.8	8.7
Asp	8.6	7.1	7.5	7.5	12.0
Cys	2.5	1.5	1.1	1.3	1.0
Gln	3.9	5.1	7.1	6.3	3.8
Glu	3.9	3.8	3.8	3.9	2.5
Gly	5.6	6.0	6.4	4.1	4.0
His	2.3	2.4	2.2	3.9	1.8
Ile	6.0	5.1	4.0	3.2	4.8
Leu	9.5	8.2	6.8	9.7	5.2
Lys	5.1	6.9	5.8	5.0	4.3
Met	3.5	2.4	2.2	2.4	11.4
Phe	4.2	4.4	1.7	2.2	2.6
Pro	3.7	3.1	2.5	2.2	2.6
Ser	8.1	5.8	5.9	8.4	6.2
Thr	6.3	4.6	4.0	4.7	5.6
Trp	1.2	1.3	0.9	1.3	1.1
Tyr	4.4	3.5	3.1	3.9	3.3
Val	6.5	7.5	6.8	8.0	5.6
Ess. Aa.	48%	47%	39.3%	44.5%	51.4%

A MRJP1 corresponde a 48% das proteínas hidrossolúveis, sendo sintetizada na glândula hipofaríngea de abelhas operárias enfermeiras e expressa no cérebro de operárias

forrageiras, nos corpos de cogumelo. Esta proteína está relacionada a funções fisiológicas e nutricionais, atuando no desenvolvimento das abelhas (Figura 03) (Kucharski *et al.*, 1998, Albert *et al.*, 1999b e Simúth, 2001).

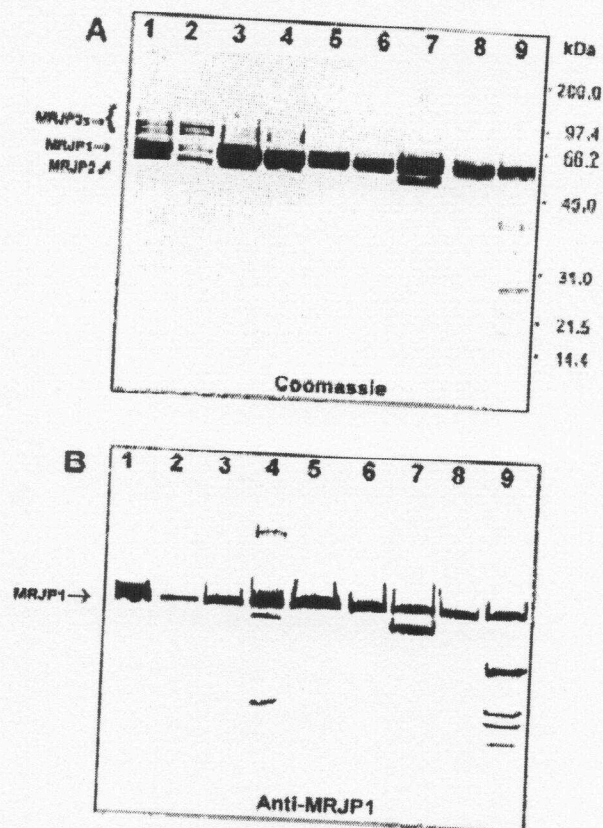


Figura 03: Caracterização da MRJP1 por ultracentrifugação (245000g por 5 horas a 6 °C). (A) Análise eletroforética sob condição desnaturante, das proteínas de GR. 1- GR nativa; 2- Sobrenadante da GR ultracentrifugada; 3- Sedimento leve da GR ultracentrifugada; 4- GR sedimentada; 5- GR-gel; 6- Fração de GR excluída da cromatografia (fração de alto peso molecular); 7- fração de baixo peso molecular; 8- oligômeros de MRJP1 e 9- monômeros de MRJP1. (B) Imunoblotting correspondentes as amostras de SDS-PAGE. (Simúth, 2001).

As proteínas MRJP1 e MRJP2, chamadas de apalbumin são expressa e localizadas nos corpos de cogumelo no cérebro de *Apis mellifera* que é o centro de aprendizagem e memória das abelhas adultas (Bíliková, *et al.* 2002).

A primeira MRJP caracterizada por clone de cDNA e sequenciamento peptídico, com massa molecular de 60-70kDa foi identificada como pertencente à classe MRJP3 (Albert *et al.*, 1999b e Schmitzová *et al.*, 1998). Esta contém regiões repetidas com a composição regulada por motivos de cinco resíduos. Existem evidências de que as proteínas de 60-70kDa são variações da MRJP3 cujo nome original, dessa parte variante é RJP57-1. A análise de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) mostra a presença de alelos diferentes do gene da MRJP3 e diferenças nos seus tamanhos, resultante de uma variabilidade dos números de repetições na região de MRJP3. Já foram caracterizados, a nível molecular, cinco alelos diferentes para a MRJP3 (Figura 04) (Albert *et al.*, 1999b).

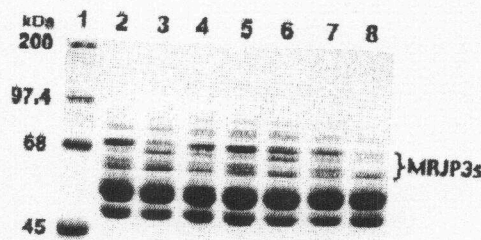


Figura 04: Perfil eletroforético das proteínas de GR, separadas por SDS-PAGE. 1- Padrão de peso molecular; 2- GR; 3- 8: geléias de diferentes células de operária (Albert *et al.*, 1999a).

Os métodos convencionais de preparação para o fracionamento da GR faz com que elas se agrupem formando oligômeros que são insolúveis em água e até mesmo em ensaios de eletroforese desnaturante. Desse modo foi proposto um novo método de fracionamento das MRJPs de GR, através de ultracentrifugação foi obtida a MRJP1 natural, sem a formação de oligômero, uma vez que é esta proteína que se apresenta propícia a formação de oligômeros (Simúth, 2001).

As atividades de algumas enzimas presentes na GR também já foram determinadas, como por exemplo: amilase, ascorbinoxidase, catalase, fosfatase ácida e invertase (Schimitzová *et al.*, 1998 e Albert *et al.*, 1999a).

1. 3- Propriedades apiterápicas e tecnológicas da geléia real:

À GR são atribuídos vários efeitos fisiológicos, os quais foram estudados experimentalmente em animais, incluindo atividades vasoativas e hipotensora (Shimoda *et al.*, 1978), ação desinfetante e antibacteriana (Fujiwara *et al.*, 1990), atividade antitumoral (Tanura *et al.*, 1987 & Townsend *et al.*, 1961) e atividade antiinflamatória (Fujii *et al.*, 1990). Sobre o metabolismo lipídico e na arterosclerose experimental, tem sido observados efeitos hipolipidêmicos relacionados com a redução do colesterol sérico e hepático e lípides totais hepáticos (Kaczor *et al.*, 1962; Nakajin *et al.*, 1982 & Vitteck 1995).

A GR pode conter fatores de crescimento que estimulam a síntese de DNA e a divisão celular em cultura primária de hepatócito. Um fator candidato é a proteína de 57 kDa, que também pode atuar como marcador de qualidade da GR uma vez que a proteína de 57 kDa foi especificamente degradada em proporção à temperatura e ao período de armazenamento, sendo que outros constituintes da GR não sofreram mudanças durante o armazenamento. Esta proteína estimula significativamente a síntese de DNA no hepatócito enquanto que este efeito não foi observado durante o tratamento com a albumina de soro bovino e nem com a GR estocada por sete dias a -40°C , na qual faltava a proteína de 57 kDa. A atividade mitogênica foi perdida após tratamento com tripsina. Estes dados indicam que a proteína de 57 kDa atua como mitogéno, além de prolongar a proliferação celular em cultura primária de hepatócito com um aumento da produção de albumina comparada com as células não tratadas. Portanto a proteína de 57 kDa pode promover a regeneração hepática com ação protetora sobre hepatócitos (Kanuara *et al.*, 2001).

Os efeitos imunomodulatórios da GR foram estudados através da supressão de reações alérgicas de camundongos imunizados com DNP-KLH (2,4 dinitrophenylated keyole limpet hemocyanin). A administração de 1g/Kg de GR para os camundongos DNP-KLH reduziu significativamente o nível sérico de imunoglobulina IgE antígeno específico e inibiu a liberação de histamina mediada por DNP-KLH de mastócitos, resultando na supressão imediata de reações de hipersensibilidade na pele da orelha. Nos camundongos imunizados com DNP-KLH e tratados com GR (camundongos DNP-KLH/GR), a produção de citocina interferon- γ (IFN- γ) por células TCD4⁺, a qual estimula as células Thelper 1 (Th1), suprimiu a produção de citocina interleucina4 (IL-4) por células TCD4⁺,

que atua nas células Th2. A IL-4 de camundongos DNP-KLH estava aumentada quando comparada com camundongos não imunizados, entretanto, houve uma diminuição desta citocina em camundongos DNP-KLH tratados com GR. Desse modo, a GR melhorou o balanço da resposta celular Th1/Th2 de células Th2-dominante (resposta alérgica) para Th1-dominante (resposta protetora), em associação com a restauração da função de macrófagos. A GR aumentou significativamente o nível de glutathione em macrófagos de camundongos DNP-KLH/GR, aumentou a expressão de mRNA p40 para IL-12 e a produção de óxido nítrico, diminui a produção de prostaglandina 2 (PGE2) de macrófagos quando comparados com camundongos DNP-KLH não tratados (Oka *et al.*, 1998).

No entanto, o alto consumo deste apiterápico pode ocasionar reações de hipersensibilidade a GR em pacientes atópicos. Em um caso específico o quadro clínico evolui para o óbito de uma paciente asmática logo após o consumo da GR. Isto pode ser explicado porque o consumo excessivo de GR por pacientes alérgicos ou com problemas respiratórios, induz a sensibilidade do indivíduo a este apiterápico ocasionando desde urticária até manifestações clínicas mais graves como o choque anafilático. As proteínas de 47 a 55 kDa, foram identificadas como potencialmente alergénicas, quando associadas a outras alergias ambientais (Leung *et al.*, 1997).

Vários insetos são conhecidos pela produção humoral de proteínas antibacterianas que participam do sistema de defesa contra microrganismo. Desse modo na hemolinfa de *Apis mellifera* foi isolado *apidecins*, que são peptídios bactericidas com atividade inibitória do crescimento de bactérias Gram+ e Gram-, *Ascomycetos* e outras espécies de fungos. Uma das substâncias da GR foi identificada, por ter ação antimicrobiana como a 10-hidroxy- Δ^2 decenoic (Fujiwara *et al.*, 1990).

A *royalisina* presente na GR é uma importante proteína com ação antibacteriana. A estrutura primária desta proteína está sendo investigada e pode ter uma similaridade com outras proteínas ou peptídeos bactericidas. A *royalisina* com 5523Da apresenta 51 resíduos de aminoácidos, sendo que seis resíduos são de cisteínas unidas por ligações dissulfeto, as quais provavelmente estão relacionadas com a atividade antibacteriana da *royalisina*. Os resultados da atividade antibacteriana da *royalisina* mostram uma seletividade da inibição do crescimento das bactérias Gram+. Entretanto na GR nativa a *royalisina* inibe somente bactérias Gram-. Esta diferença pode ser explicada pela presença do ácido 10-hidroxy-

Δ^2 decenoic, presente na GR nativa e perdido completamente durante o fracionamento. Por causa deste potente efeito antibacteriano a *royalisina* torna-se atrativa para futuras aplicações especialmente na conservação de alimentos (Fujiwara *et al.*, 1990).

Dentre os experimentos propostos com a GR, predominou a sua caracterização protéica e a determinação do seu perfil imunológico como etapa primordial, para este trabalho. Sendo assim, os ensaios bioquímicos e imunológicos em cromatografias líquidas e eletroforese SDS-PAGE e *western-blot*, foram realizados para a caracterização deste apiterápico.

2- OBJETIVOS:

- ✓ Preparar GR para conservação e análise bioquímica por meio de técnica de centrifugação e diálise.
- ✓ Realizar estudos de caracterização das propriedades bioquímicas da GR.
- ✓ Isolar as frações protéicas de GR por técnicas cromatográficas.
- ✓ Analisar por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida e caracterizar as principais proteínas da GR.
- ✓ Imunizar camundongos e coelhos com GR para produção de anticorpos policlonais.
- ✓ Purificar por imunoafinidade as imunoglobulinas relativas as principais proteínas da GR.
- ✓ Analisar por *western blot* a reatividade cruzada dos anticorpos purificados.

3- MATERIAL E MÉTODOS:

3. 1- Obtenção e estocagem do material:

As amostras de GR utilizadas foram fornecidas pelo Apiários Girassol, de Uberlândia-MG e pela Casa do Mel, de Governador Valadares-MG. Sendo as duas amostras importadas da China e comercializadas por estes estabelecimentos. Estas amostras foram alíquotas e acondicionadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. 2- Preparação do extrato protéico:

Alíquotas de 2g de GR foram homogeneizadas em 12ml do Tampão de Homogeneização pH 8.0: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0, 100 mM NaCl e 20 mM EDTA (Ácido etilenodiamino tetracético, J.T;Backer). O extrato protéico foi obtido após homogeneização de 30 minutos, em banho de água gelada, sendo agitado em *vortex* a cada 5 minutos. Em seguida foi centrifugado a 10000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O sobrenadante foi dialisado em Tampão Tris pH8.0: 20 mM Tris-HCl (Hydroxymethyl aminomethane, Nuclear) pH 8.0 e 0,5 mM EDTA, por 24 horas. Após a diálise a GR foi

novamente centrifugada a 10000 g a 4 °C por 10 minutos. A fração sobrenadante foi utilizada nos experimentos descritos abaixo (Schimitzová *et al.*, 1998).

3. 3- Fracionamento das proteínas de GR em cromatografia líquida:

As análises cromatográficas foram feitas em diferentes resinas de cromatografia líquida de troca iônica (volume de resina entre 5 a 10ml), as quais foram equilibradas com o mesmo Tampão Tris pH 8.0, já mencionado anteriormente, acrescido de 200 mM NaCl, azida a 0,02% e 21 µl/l β-mercaptoetanol. O fluxo foi mantido constante com a ajuda de uma bomba peristáltica disponível. As resinas (Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, EUA) usadas para os ensaios de cromatografias foram as seguintes: resinas de troca iônica carga positiva DEAE-Sepharose (Dietilaminoetil) e Q-Sepharose, resinas de troca iônica carga negativa SP-Sepharose (Sulfopropil) e Fosfocelulose. As amostras para cromatografia foram fornecidas pelo Apiários Girassol Ltda.

O extrato protéico centrifugado, após a diálise, foi aplicado nas colunas de cromatografia, sendo seu volume diluído para 30ml com Tampão de Homogeneização pH 8.0, acrescida de 200 mM NaCl, 200 mM NaCl, azida a 0,02% e 21 µl/l β-mercaptoetanol. Simultaneamente a aplicação da amostra coletou-se a fração protéica não retida pela coluna (*void*). Em seguida, a coluna foi lavada com o Tampão Tris pH 8.0, acrescido de 200mM de NaCl, 0,02% de azida e 21 µl/l de β-mercaptoetanol. As frações cromatografadas, foram eluídas com tampão Tris pH 8.0, em um gradiente de sal de 200 a 500 mM de NaCl e coletadas com a ajuda do coletor de frações num volume de 2ml por tubo de ensaio (aproximadamente 60 gotas). Todas as frações de cada passo do ensaio cromatográfico foram preparadas para análise eletroforética desnaturante, em gel de poliacrilamida.

3. 4- Análise eletroforética SDS-PAGE:

As frações eluídas de cada cromatografia foram separadas, de acordo com o peso molecular de cada polipeptídeo por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando sistema tampão descontínuo como descrito por Laemmli (1970) e sistema de placas de vidro descrito por Studier (1973). Foram utilizados mini géis de

dimensões de 7,1 X 10 x 0,0075cm (SE 215 Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, EUA) com concentrações gradiente de a 5% 16% de poliacrilamida.

O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl pH 8.8 a 0,375 M, SDS (Dodecil sulfato de sódio, Synth. Diadema-SP) a 1%, EDTA a 2 mM, solução de acrilamida a 30% e bis- acrilamida a 0,8% (N,N- metileno-bis-acrilamida, Sigma), TEMED (N,N,N,N- tetrametil etilenodiamino, American Bioanalytical) a 0,125% e PSA (Persulfato de amônio, Armesham-USB) a 0,125%. Para o gel de empilhamento utilizou-se Tris-HCl a 0,125 M pH 6.8, SDS a 0,1%, 2 mM EDTA, solução de acrilamida/ bis acrilamida a 5%, TEMED a 0,125% e PSA a 0,125%. A solução do gel de separação foi vertida cuidadosamente para a cavidade da placa previamente montada de maneira a evitar a formação de bolhas no gel, sendo acrescentado, em seguida uma camada de água deionizada. Após a polimerização do gel de separação adicionou-se a solução do gel de empilhamento e o pente para a formação dos poços de aplicação da amostras. As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo o tampão eletrodo Tris-glicina 0,025 M pH 8.3. A migração eletroforética das proteínas ocorreu em Tampão eletrodo pH 8.3: 0,19M de glicina, 0,025 M de Tris, 0,075% de SDS e 1,65 M de EDTA.

As amostras foram preparadas na proporção de 1:10, em volume, da fração para tampão da amostra "TA 10 X" (31,2mM Tris-HCl, 8,75% SDS, 20% sacarose, 10% β -mercaptoetanol, 0,25% azul de bromofenol, 11mM EGTA), respectivamente. A separação eletroforética será conduzida com amperagem constante de 30mA.

Após a corrida, o gel foi corado, com *comassie brilliant blue R-0,25%*, dissolvido em solução de metanol e ácido acético a 5 e 10%, respectivamente. A descoloração ocorreu na presença de solução 30% de metanol e 10% de ácido acético, seguida de solução de ácido acético a 7%.

Os géis foram estocados nesta mesma solução até a sua documentação. Para a comparação dos pesos moleculares utilizou-se padrão de peso molecular SDS 6H Sigma, ao qual é adicionado calmodulina purificada. Os pesos molecular de cada proteína são: 205 kDa cadeia pesada de miosina II, 116 kDa β -galactosidade, 97.4 kDa fosforilase b, 66 kDa soro albumina bovina, 45 kDa ovoalbumina, 29 kDa anidrase carbônica.

3. 5- Dosagem de proteínas:

A concentração de proteína na fração foi determinada pelo método de Bradford (1976) tendo como padrão a soro albumina bovina. Neste método, uma alíquota de cada fração será diluída para 100 μ l com água deionizada e adicionando 3,0ml de reagente de Bradford (100 mg de Coomassie Blue G, 50ml de etanol 95% e 100ml ácido fosfórico 85%). As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteína das frações fez-se a curva padrão de soro albumina bovina. A concentração de proteína em mg/ml foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão.

3. 6- Imunização dos animais:

3. 6. 1- Imunização de camundongos:

Foi separado um lote com 10 camundongos para imunização com GR, os quais foram mantidos no Laboratório de Imunologia, desta universidade. Antes da imunização fez-se a sangria prévia dos animais para se certificar, através de imunoblotting, que os animais não possuíam proteínas contra a GR.

Os camundongos foram imunizados intraperitonealmente com GR dialisada e posteriormente centrifugada (conforme item 3. 2.), num intervalo de 15 dias. A primeira dose foi administrada na concentração de 50 μ g/500 μ l mais Adjuvante Completo de Freund's, volume/ volume (v/v). As doses de reforço foram administradas na concentração de 25 μ l/ 500 μ l mais Adjuvante Incompleto de Freund's, v/v. Cada animal recebeu uma dose de 500 μ l.

Após três doses de reforço, fez-se a sangria dos animais pelo olho, com a ajuda de um capilar. O sangue coletado dos animais foi separado, após formação de coágulo, por centrifugação a 350g por 10 minutos. Os soros obtidos foram alíquotados e armazenados a

-20 °C até a realização de testes sorológicos (descrito a seguir). Três dias antes da sangria completa dos animais foi administrada outra dose de reforço, sem o adjuvante.

3. 6. 2- Imunização de coelhos:

Os coelhos utilizados para a produção de anticorpos foram cedidos e mantidos pelo Vallee S.A., em Uberlândia-MG. Foram separados 2 coelhos novos. Antes da imunização fez-se a sangria prévia dos animais para se certificar, através de imunoblotting, que os animais não possuíam proteínas contra a GR.

Os coelhos foram imunizados dorsalmente com GR dialisada e posteriormente centrifugada (conforme item 3. 2.), num intervalo de 15 dias. A primeira dose foi administrada na concentração de 500 µg/ml mais Adjuvante Completo de Freund's, v/v. As doses de reforço foram administradas na concentração de 250 µl/ml; mais Adjuvante Incompleto de Freund's, v/v. Cada animal recebeu uma dose de 1ml.

Fez-se a sangria dos animais pela orelha, após três imunizações de reforço. Com o soro, separado por centrifugação fez-se o teste sorológico (descrito a seguir).

3. 7- Ensaio imunoenzimático ELISA:

A placa de ELISA foi sensibilizada *overnight* a 4°C com a GR (antígeno), usada na imunização dos animais, nas concentrações protéicas de 10µg/µl e 20µg/µl, diluídas em Tampão Carbonato pH 9.6. A placa foi lavada por 3 vezes com PBS-Teewn 20. Aplicou-se o soro de cada animal na placa de ELISA, diluídos 1:50 com PBS mais molico5%, deixando por 1h a 37° C. A placa foi lavada 6 vezes com PBS-Teewn 20. Em seguida aplicou-se o anticorpo secundário anticamundongo conjugado com peroxidase na titulação de 1:2000 e 1:4000, incubando-se por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada 6 vezes com PBS-Teewn 20. O teste foi revelado com Usou-se ácido sulfúrico 2N para interromper a reação.

O mesmo experimento foi realizado com o anticorpo secundário anticoelho conjugado com peroxidase na titulação de 1:2000 e 1:4000, sendo também revelado com tampão OPD+H₂O₂ 30%.

3. 8- Preparação dos soros:

O sangue coletado de cada animal foi separado do plasma, após a formação de coágulo por centrifugação a 350 g por 10 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento após a separação do sobrenadante. Os soros foram diluídos 1:1 com PBS mais 0,2 % Na₂S₂O₃ e acondicionados a -20°C.

3. 9- Purificação de IgG anti-GR:

O soro dos animais foram incubados em membranas de PVDF previamente incubadas por 24 horas a 4 °C ou filtradas e incubadas por 24 horas a 4 °C com GR, sob agitação. As membranas foram bloqueadas por 12 horas com PBS-T mais 5% de leite em pó desnatado, sendo lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS-Teewn 20. As membranas foram incubadas com os soros dos animais a 4°C por 24 horas, sob agitação. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS-Teewn 20 e eluídas com Tampão de eluição trietilamina 100mM, na proporção de 14µl de trietilamina por 1ml de água deionizada. As membranas foram incubadas com o Tampão de eluição por 5 minutos, agitando em temperatura ambiente. Em seguida a reação foi neutralizada transferindo-se a trietilamina para um tubo *ependorf* com 100ml de Tris-HCl 1M pH 8.5. A fração eluída foi dialisado contra PBS por 2 dias. Depois da diálise foi lida a absorbância da amostra em 280nm, zerando o espectrofotômetro com PBS usado para dialisar a amostra. Para se saber qual a concentração protéica do anticorpo purificado, correspondente a fração eluída com a trietilamina, dividiu-se a absorbância da amostra pelo coeficiente de extinção molar da IgG: 13,6. As membranas foram guardadas em PBS mais 0,02% azida a 4 °C.

3. 10- Purificação de anticorpo por afinidade:

Os anticorpos produzidos foram purificados por afinidade, através da imobilização de proteínas purificadas da GR (MRJP1 e MRJP3), em membrana de nitrocelulose 0,2 μ m, por transferência do gel SDS-PAGE em corrente elétrica de 60V. A membrana foi corada com Ponceu, para marcar os pesos moleculares das bandas transferidas do padrão Sigma SDS-7B (180 kDa α_2 -macroglobulina, 116 kDa β -galactosidase, 84 kDa frutose 6-fosfato, 58 kDa piruvato quinase, 48.5 kDa fumarase, 36.5 kDa lactato desidrogenase e 26.6 kDa trifosfato isomerase). A membrana foi cortada horizontalmente de acordo com a faixa, ou seja banda correspondente a cada proteína. As membranas foram bloqueadas agitando em solução bloqueio PBS- Teewn 20 mais 5% de leite em pó desnatado por 8 horas a 4 °C e lavada 4 vezes por 4 minutos com PBS-T. Em seguida foram incubadas, *overnight* a 4 °C sob agitação, com o anticorpo a ser purificado contra cada uma dessas proteínas descritas acima. As membranas foram lavadas com PBS-T 4 vezes por 4 minutos e eluídas com Tampão de Eluição trietilamina, conforme o tópico anterior. As frações eluídas foram lidas a 280nm no espectrofotômetro. Em seguida as mesmas foram dialisadas contra PBS por 24horas a 4°C. após a diálise as amostras foram novamente lidas a 280mm no espectrofotômetro.

3. 11- Western Blot:

As bandas protéicas foram transferidas do gel de eletroforese para a membrana de nitrocelulose 0,2 μ m, pela técnica de *western blot*, segundo Towbin (1979). A transferência foi realizada *overnight* a 60V. A membrana foi corada com Ponceu, deixando-a secar, em temperatura ambiente, para marcar os pesos moleculares das bandas transferidas do padrão Sigma SDS-7B. As membranas foram guardadas a 4°C. As membranas foram incubadas *overnight* em solução bloqueio, contendo 5% de leite em pó desnatado em TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Base, pH 8.0). As membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS-Teewn 20, sendo posteriormente incubadas por 12 horas com anticorpos primários na

concentração protéica de 0,2µg/ml, produzidos contra as MRJPs. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS-Teewn 20. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário do respectivo animal, do qual está sendo testado o soro, conjugado com fosfatase alcalina (AP). Após duas horas de incubação, as membranas foram lavadas pela última vez com TBS, 3 vezes por 5 minutos e 1 vez com tampão AP. As membranas foram reveladas em incubação com NBT/BCIP. A reação foi paralisada com ácido acético 7%, quando fosse bem visível a coloração roxa da banda marcada.

4- RESULTADOS:

4. 1- Caracterização protéica da geléia real:

A fim de caracterizar as proteínas da GR, principalmente as MRJPs foram feitos vários ensaios de SDS-PAGE, utilizando amostras de GR fornecidas pelo Apiários Girassol e pela Casa do Mel.

A dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976) indicou uma concentração protéica de 10,3mg/ml na GR pronta para ser aplicada nas colunas de cromatografia.

A princípio a caracterização protéica da GR revelou que suas proteínas se degradam facilmente devido ao acondicionamento inadequado, bem como pela variação de temperatura e variação de pH. A degradação da GR foi observada, principalmente, através da proteína de 57 kDa (dados não mostrados).

4. 2- Perfil cromatográfico:

O fracionamento das MRJPs foi um dos principais objetivos deste trabalho, para tanto a GR foi preparada e aplicada em diferentes resinas de cromatografia de troca iônica. Desse modo foi possível obter uma comparação entre os perfis cromatográficos de cada resina, através da técnica de SDS-PAGE.

A resina de troca iônica com carga elétrica positiva DEAE-sepharose (**Figura 05**), demonstrou em SDS-PAGE o fracionamento das proteínas MRJP1 e MRJP3s, com o isolamento parcial da MRJP1 em concentração mais elevada de NaCl, quando consideramos que esta coluna foi eluída com gradiente de 200-500mM NaCl.

A resina catiônica Q-sepharose mostra a separação cromatográfica em SDS-PAGE das proteínas MRJP1, MRJP2 e MRJP3s. Neste experimento observar-se a formação de prováveis oligômeros da MRJP1 em quase todas as amostras eluídas da coluna, bem com o isolamento parcial dessa proteína em concentração mais elevada de NaCl, quando consideramos que esta coluna foi eluída com gradiente de 200-500mM NaCl (**Figura 06**).

Em resina de troca iônica negativa SP-sepharose observa-se o fracionamento cromatográfico, através de SDS-PAGE, das proteínas MRJP1, MRJP3s e MRJP5 (**Figura 07**). Nesta cromatografia também é possível observar a formação de oligômeros da MRJP1.

O ensaio cromatográfico em resina de troca iônica com carga elétrica negativa Fosfocelulose mostra em SDS-PAGE (**Figura 08 e 09**), o fracionamento das proteínas da GR. Esta resina apresentou o resultado mais satisfatório dentre os ensaios cromatográficos realizados, podendo ser observado o fracionamento de todas as proteínas da família das MRJPs.

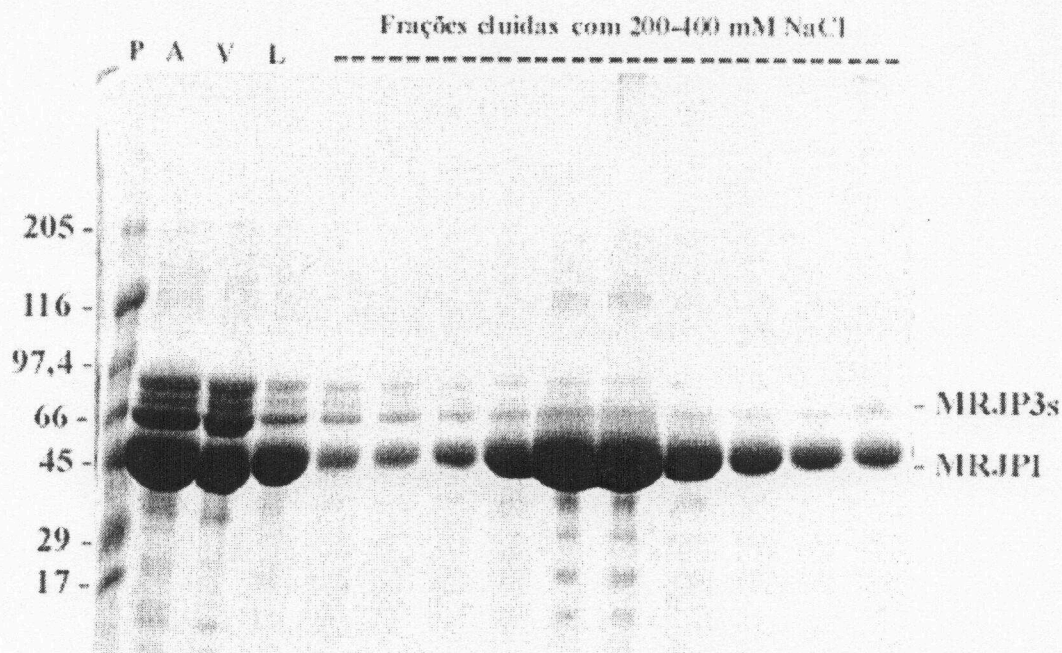


Figura 05: Fracionamento das principais proteínas da geléia real (MRJPs) pela cromatografia de troca catiônica em coluna de DEAE-SEPHAROSE®.

A Figura mostra o perfil de proteínas separados por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de gradiente de 5-16% de poliacrilamida, corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. A pista (A) contém a mostra de geléia real aplicada na coluna, a pista V a fração de proteínas que não ligaram na coluna, a pista L as proteínas que foram lavadas da coluna. A eluição da coluna foi feita com gradiente de força iônica usando o tampão de eluição com 200 a 500 mM de NaCl. As pistas assim indicadas contêm as frações proteicas eluídas da coluna. A pista P indica o padrão de peso molecular 6H. As bandas indicadas referem-se a proteínas do tipo MRJP1 e MRJP3s.

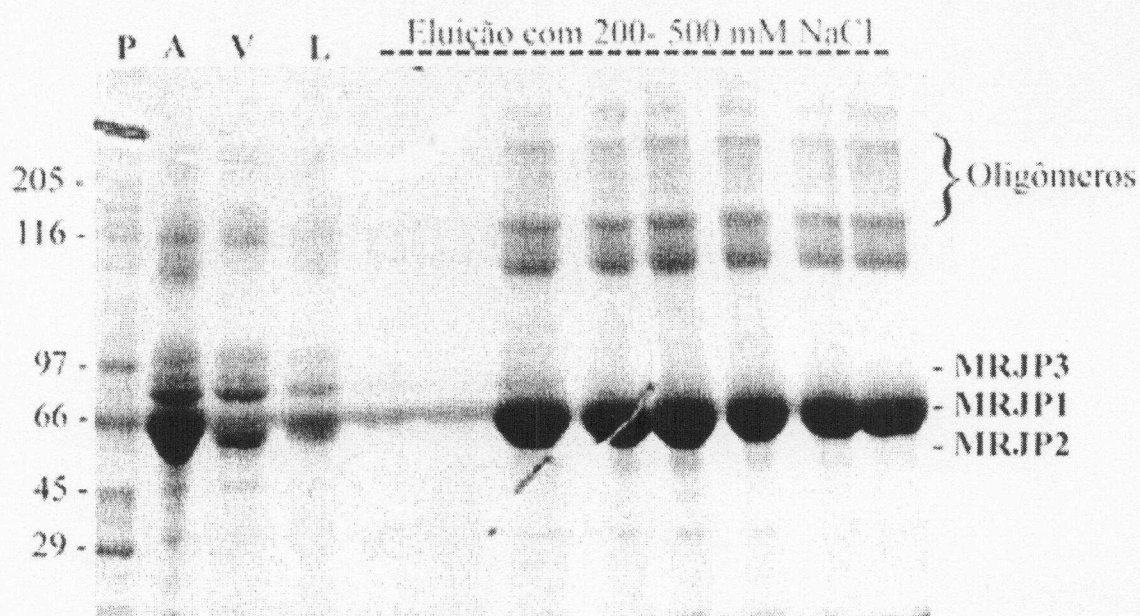


Figura 06: Fracionamento das principais proteínas da geléia real (MRJPs) pela cromatografia de troca catiônica em coluna de Q-SEPHAROSE®.

A Figura mostra o perfil de proteínas separados por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de gradiente de 5-16% de poliacrilamida, corado com Coomassie Brilliant Blue. A pista (A) contém amostra de geléia real aplicada na coluna, a pista V a fração de proteínas que não ligaram na coluna, a pista L as proteínas que foram lavadas da coluna. A eluição da coluna foi feita com gradiente de força iônica usando o tampão de eluição com 200 a 500 mM de NaCl. As pistas assim indicadas contem as frações protéicas eluidas da coluna. A pista P indica o padrão de peso molecular 6H. As bandas indicadas referem-se a proteínas MRJP1, MRJP2 e MRJP3s. A chave representa bandas de prováveis oligômeros da MRJP1 conforme descrito em SIMÚTH (2001).

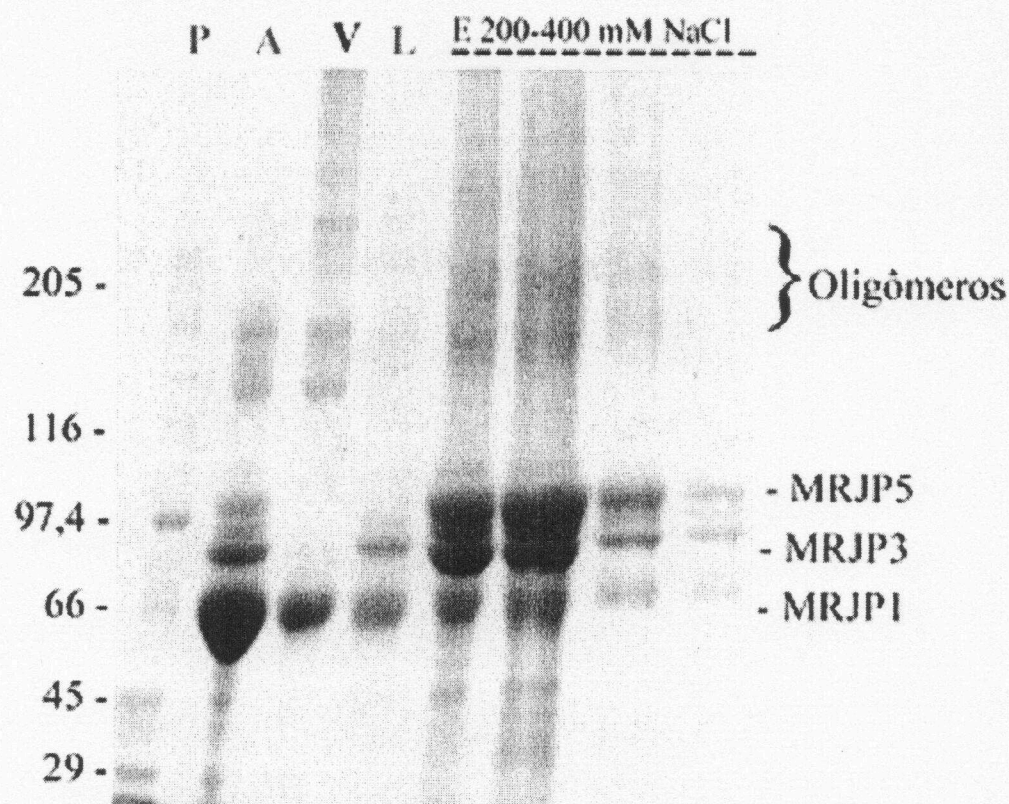


Figura 07: Fracionamento das principais proteínas da geléia real (MRJPs) pela cromatografia de troca aniônica em coluna de SP-SEPHAROSE®.

A Figura mostra o perfil de proteínas separado por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de gradiente de 5-16% de poliacrilamida, corado com Coomassie Brilliant Blue. A pista (A) contém amostra de geléia real aplicada na coluna, a pista V a fração de proteínas que não ligaram na coluna, a pista L as proteínas que foram lavadas da coluna. A eluição da coluna foi feita com gradiente de força iônica usando o tampão de eluição com 200 a 500 mM de NaCl. As pistas assim indicadas contêm as frações protéicas eluídas da coluna. A pista P indica o padrão de peso molecular 6H. As bandas indicadas referem-se a proteínas MRJP1, MRJP3 e MRJP5. A chave representa bandas de prováveis oligômeros da MRJP1 conforme descrito em SIMÚTH (2001).

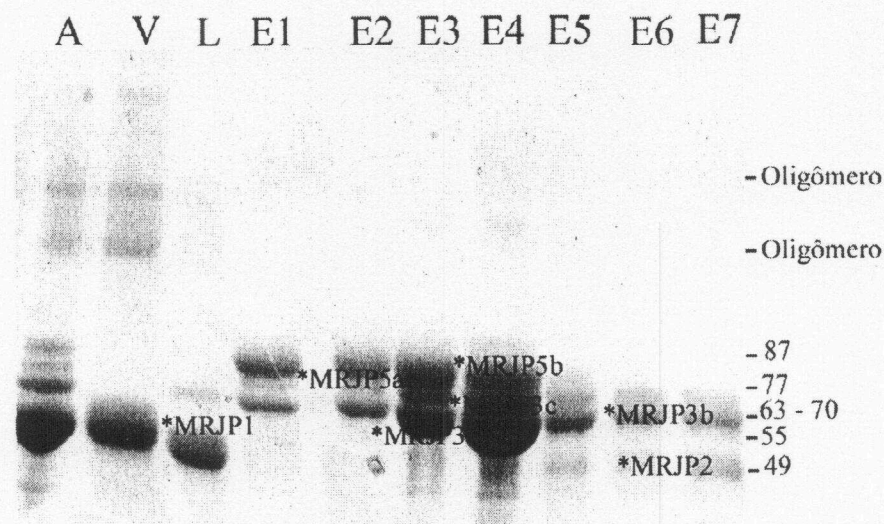


Figura 08: Fracionamento das principais proteínas da geléia real (MRJPs) pela cromatografia de troca aniônica em coluna de FOSFOCELULOSE.

A Figura mostra o perfil de proteínas separado por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de gradiente de 5-16% de poliacrilamida, corado com Coomassie Brilliant Blue. A pista (A) contém amostra de geléia real aplicada na coluna, a pista V a fração de proteínas que **não** ligaram na coluna, a pista L as proteínas que foram lavadas da coluna. A eluição da coluna foi feita com gradiente de força iônica usando o tampão de eluição com 200 a 500 mM de NaCl. As pistas indicadas com E1 – E7 contêm as frações protéicas eluidas da coluna. As bandas indicadas referem-se a proteínas **MRJP1**, **MRJP2** e **MRJP3s**. As outras bandas indicadas como **oligômeros** representam prováveis oligômeros da MRJP1 conforme descrito em SIMÚTH (2001).

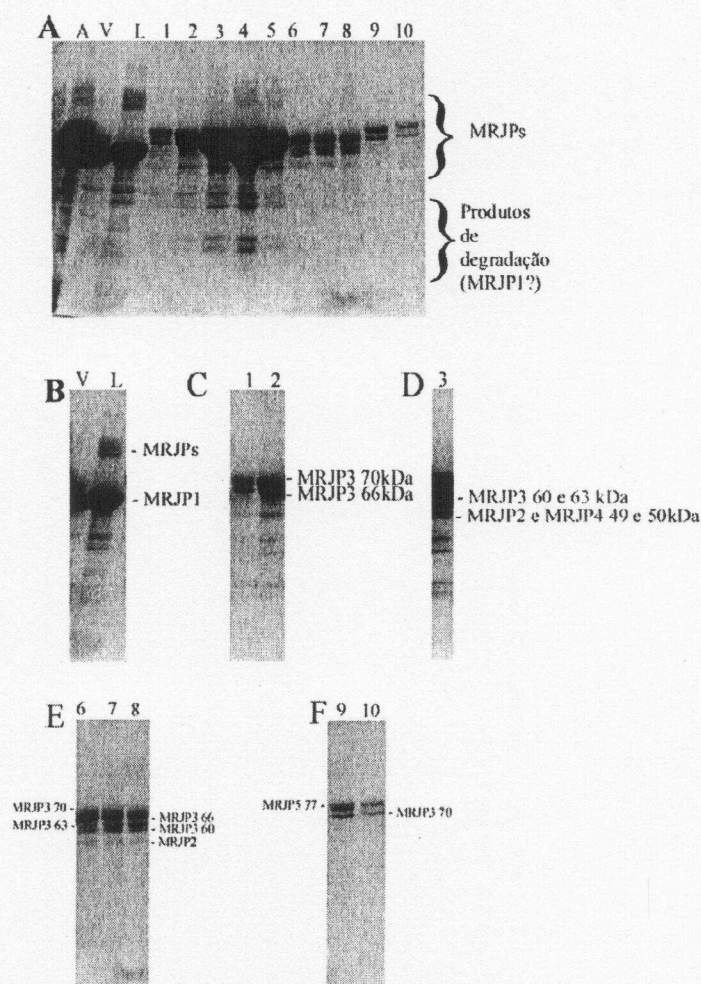


Figura 09: Perfil de proteínas da geléia real (MRJPs) da cromatografia em coluna de fosofocelulose, separadas por letroforse em gel com 5-22% de poliacrilamida.

PAINEL A: A Figura mostra o perfil de proteínas separados por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de gradiente de 5-22% de poliacrilamida, corado com Coomassie Brilliant Blue. A pista (A) contém amostra de geléia real aplicada na coluna, a pista V a fração de proteínas que **não** ligaram na coluna, a pista L as proteínas que foram lavadas da coluna. A eluição da coluna foi feita com gradiente de força iônica usando o tampão de eluição com 200 e 500 mM de NaCl. As pistas indicadas com números de 1-10 contêm as frações protéicas eluidas da coluna. As bandas indicadas referem-se a proteínas MRJPs 1-5. Os painéis B-F representam detalhes do mesmo gel para marcação das MRJPs individualmente.

4.3- Caracterização imunológica da geléia real:

Os animais inoculados com GR produziram anticorpos contra as proteínas deste apiterápico. Isto pode ser evidenciado pelo Teste de ELISA o qual revelou para camundongo uma absorvância maior do soro pós-imune se comparado com o soro pré-imune. Já no soro de coelho essa diferença foi de 20 vezes superior a leitura do soro pós para o pré-imune. Estes resultados também podem ser evidenciados através dos *blots* com o soro dos animais, pelo ensaio de *western-blot* (Figuras 10 e 11).

A partir do soro purificado dos camundongos contendo IgG produzida contra GR, foram purificados, por afinidade os anticorpos contra as proteínas MRJP1 e MRJP3 (Figura 12). A purificação das IgG de coelho ainda está em andamento.

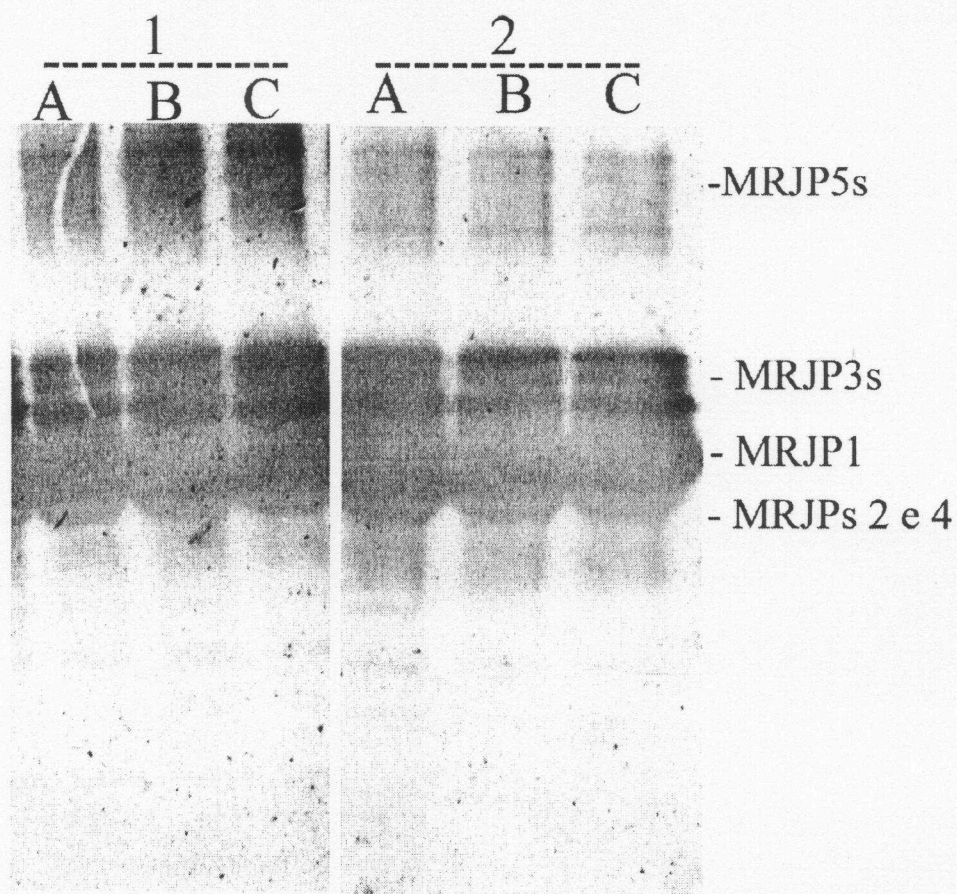


Figura 9: Ensaio de *imunoblotting* com soro de camundongos pós-imunização com as proteínas da geléia real, revelados por fosfatase alcalina com NBT/BCIP.

O ensaio consistiu em sondar com os anticorpos pós-imune as proteínas principais da geléia real imobilizada em nitrocelulose por incubação direta com a membrana (1) ou filtração através da membrana (2). As pistas A-C indicam repetições da mesma amostra aplicada na eletroforese. As bandas indicadas com MRJPs referem-se as principais proteínas da geléia real. O padrão de peso molecular (não mostrado) refere-se ao padrão pré-colorido de alto peso molecular (SDS-7B, SIGMA).

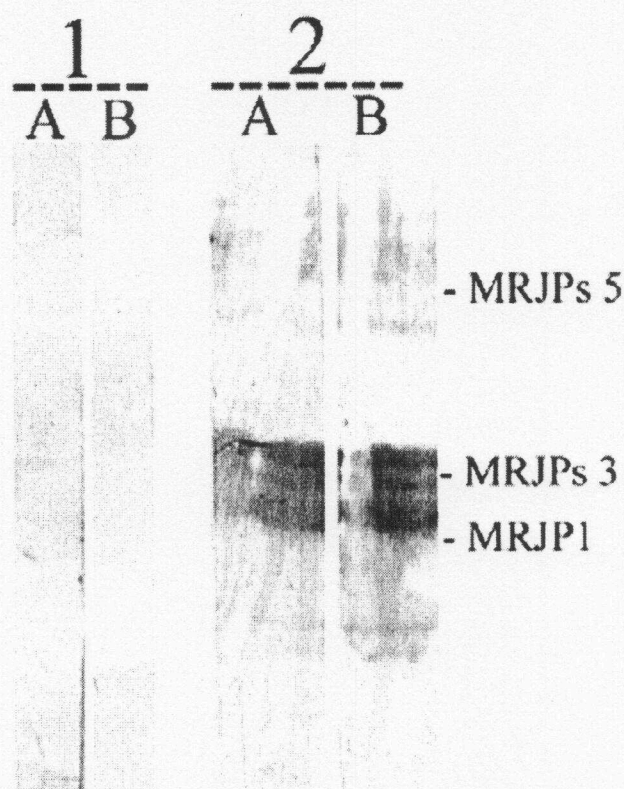


Figura 10 : Ensaio de *immunoblotting* sondando as proteínas da geléia real imobilizada em nitrocelulose com soro de coelho dos animais (1 e 2) imunizados com as proteínas solúveis da geléia real e revelados em fosfatase com NBT/BCIP (A) indica o soro pré-imune e (B) o soro pós-imune retirado após o protocolo de imunização descrito em material e métodos.

As bandas indicadas com MRJPs referem-se as principais proteínas da geléia real reconhecidas soro imune. O padrão de peso molecular (não mostrado) refere-se ao padrão pré-colorido de alto peso molecular (SDS-7B, SIGMA).

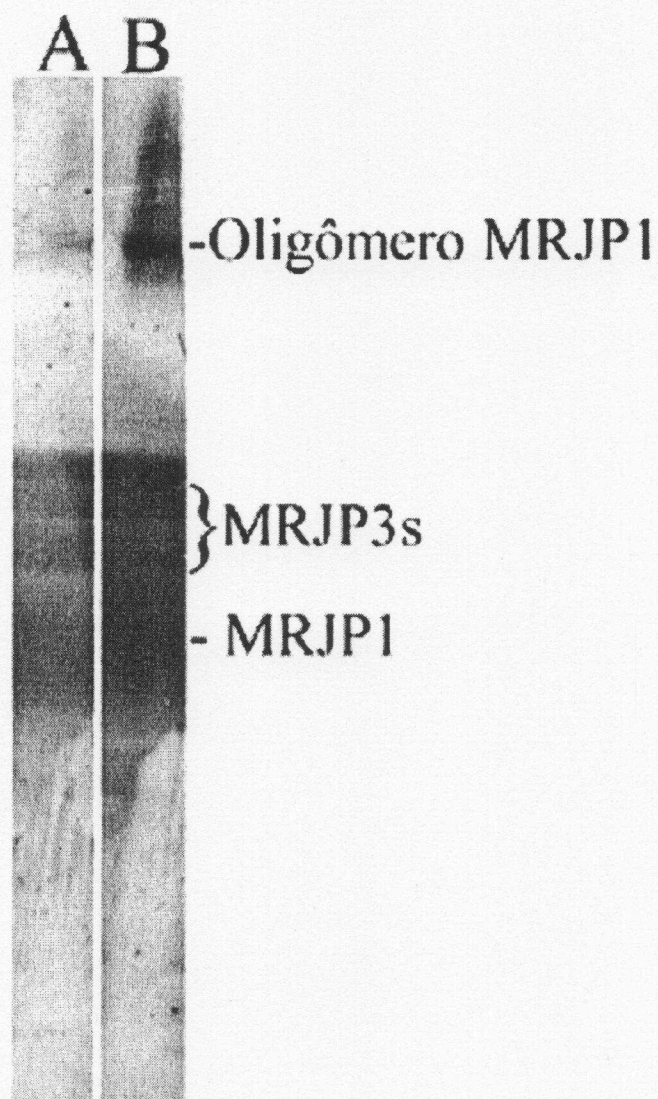


Figura11: Ensaio de imunoblotting sondando as proteínas da geléia real com anticorpo anti-MRJP3 (pista A) e anti-MRJP1 (pista B) purificados por imunoafinidade.

A purificação de anti-MRJP1 e anti-MRJP3 foi feita a partir da incubação do soro pós-imune de camundongo com as bandas correspondentes a MRJP1 e MRJP3 separada por eletroforese e cortada da membrana de nitrocelulose de acordo com referência do padrão de peso molecular pré-colorido (SDS-7B, SIGMA) e o protocolo descrito em Material e Métodos. As bandas indicadas MRJP1 E MRJP3s foram reconhecidas pelos dois anticorpos. A banda indicada como **oligômero** refere-se ao complexo formado pela MRJP1 e reconhecido pelo anticorpo específico.

5- DISCUSSÃO:

A GR de *Apis mellifera*, produzida pela glândula hipofaríngeal das operárias é um composto altamente protéico (Albert *et al.*, 1999a & Schimitzová *et al.*, 1998). Isto pode ser evidenciado pelo perfil SDS-PAGE das proteínas deste apiterápico, que por estarem muito concentradas, mostra um araste nas bandas o que dificulta a visualização e definição de cada proteína. Geralmente isso acontece porque se aplicou uma grande quantidade de proteínas, que ainda não sofreram nenhum processo de separação, como a centrifugação.

Algumas proteínas têm tendência a formar oligômeros que no caso da proteína MRJP1, formando um complexo de alto peso molecular que é resistente a eletroforese em condição desnaturante. Isto acontece provavelmente porque os métodos de preparação das GR fazem com que as proteínas precipitem e se agreguem tornando-se insolúveis (Simúth,

2001). Neste trabalho a formação desse oligômeros também nas resinas Q-sepharose, SP-sepharose e Fosfocelulose.

Nos ensaios cromatograficos foram obtidos resultados importantes como o fracionamento quase completo das MRJPs alcançado na resina de Fosfocelulose, a qual apresentou o melhor fracionamento destas proteínas. Já entre as resinas de carga positiva o melhor fracionamento foi obtido pelas resinas DEAE-sepharose e Q-sepharose, verificou-se o isolamento parcial da MRJP1.

A MRJP1, provavelmente uma das mais importantes e abundantes dentre as MRJPs e estando presente em quase todas as amostras de eletroforese está relacionada a diversas funções fisiológicas na abelha, ainda desconhecidas, além de já ter sido localizada no corpo de cogumelo, que representam o centro de aprendizagem e memória das abelhas, no cérebro de forrageiras (Kaludiny *et al.*, 1994a, Kucharski *et al.*, 1998 e Albert *et al.*, 1999b).

As proteínas polimórficas MRJP3 e MRJP5, as quais apareceram em cromatografadas em várias resinas, estão relacionadas com funções nutricionais na abelha (Schimiitzová *et al.*, 1998).

Ainda é necessário investigar mais o comportamento cromatográfico das MRJPs de GR, para tanto sugere-se fazer a associação de resinas de troca iônica com cargas diferentes, como por exemplo aplicar o void da DEAE-sepharose na Fosfocelulose.

Com a purificação das proteínas da GR pode-se determinar quais os princípios bioquímicos responsáveis pela diferenciação da rainha, bem como pela sua fertilidade e longevidade; o que poderá ser usado na indústria para a fabricação de substâncias que atuem contra o envelhecimento. Já a determinação das proteínas da GR que apresentam uma atividade imunomodulatória, pode ser útil para a fabricação de uma substância que vai prevenir ou curar a reação alérgica provocada por algum produto apiterápico ou até mesmo pelo veneno da abelha. A GR é um composto protéico com um grande potencial industrial, basta que se amplie as pesquisas a respeito de seus componentes e suas propriedades. Entretanto os anticorpos que foram produzidos durante a realização deste trabalho não pode determinar a atividade imunomodulatória da GR, sendo uma ferramenta básica para o aprofundamento e determinação desta atividade.

Muitas das propriedades terapêuticas da GR ainda não foram bioquimicamente esclarecidas, por isso a purificação de anticorpos contra as proteínas MRJPs torna-se uma importante ferramenta para o esclarecimento destas propriedades, além de contribuir para o estudo do nível de degradação da GR através da técnica de *wesrten-blot*.

A inoculação de GR em camundongos e coelhos foi importante para a produção de anticorpos contra as proteínas da GR, a qual possibilitou a purificação do anticorpo contra algumas proteínas da GR. Com os anticorpos purificados é possível fazer imunolocalizações e ensaios de proliferação celular, contribuindo para a caracterização imunológica deste composto alimentar, com isto pode-se esclarecer qual é o papel da GR na manifestação clínica de alergias ou de problemas respiratórios. A princípio já se sabe que as proteínas de 55 a 47kDa são alergênicas, quando associadas a outras alergias ambientais, entretanto ainda não se sabe como essas proteínas atuam (Leung *et al.*, 1997b).

A partir da purificação dos anticorpos contra as MRJPs um próximo passo importante são os ensaios de imunolocalização destas proteínas no cérebro e na glândula hipofaríngeal de *Apis mellifera*.

6- CONCLUSÃO:

As proteínas da GR são facilmente degradadas em alta temperatura ou quando mal acondicionadas, sendo que a proteína de 57kDa, apresenta-se com um marcador do nível da degradação da GR, o que compromete a atividade biológica deste apiterápico.

A MRJP1 foi parcialmente isolada através das resinas de cromatografia de troca iônica DEAE-sepharose e Q-sepharose, com carga elétrica positiva. Nas resinas Q-sepharose, SP-sepharose e Fosfocelulose ocorre a formação de oligômeros. A resina Fosfocelulose apresentou um perfil mais satisfatório de separação das MRJPs.

Os camundongos e coelhos inoculados com a GR, produziram anticorpos que foram purificados contra as MRJPs. Já a purificação dos anticorpos contra as MRJPs produzidos a partir do soro de coelho ainda estão em andamento.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBERT, S.; BHATTACHARYA, D.; KLAUDINY, J.; SHMITZOVÁ, J. and SIMÚTH, J. (1999 a). The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J. Mol. Evol.*, **49**:290-297.

ALBERT, S.; KLAUDINY, J. and SIMÚTH, J. (1999 b) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Ins. Biochem. Mol. Biol.*, **29**:427-434.

BÍLIKOVÁ, J., HANES, E., NORDHOFF, E., SAENGER, W., KLAUDINY, J., and SIMÚTH, J., (2002) Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters* (**26498**):1-5.

- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.
- EVANS, J. D. and WHEELER, D. E. (1998) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**:5575-5580.
- FUJIWARA, S.; IMAI, J.; YAESHIMA, T.; KAWASHIMA, T. and KOBAYASHI, K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.*, **265**:11333-11337.
- HIGGINS, D. G.; IMAI, J.; YAESHIMA, T.; KAWASHIMA, T. and KOBAYASHI, K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.*, **265**:11333-11337.
- KANUARA, M.; SUENOBU, N. and FUKUSHIMA, M. (2001) Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. *Biochem. and Biophys. Research Communications*, **282**:865-874.
- KACZOR, M., KOLTEK, A. and MATUSZEWSKI, J. (1962). The effect of royal jelly on blood lipids in atheromatic subjects. *Polski. Tygod. Lek.* **17**:140-144.
- KLAUDINY, J., KULIFAJOVÁ, J.; ALBERT, S. and SIMÚTH, J. (1994a) Molecular cloning of two cDNAs from the head of nurse honeybee colony (*Apis mellifera L.*), *J. Apic. Res.* **33**:105-111.
- KUBO, T.; SAKANI, M.; NAKAMURA, J.; SASAGAWA, H., OHASHI, H. T.; and NATORI, S. (1996) Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of

the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J. Biochem.*, **119**:291-295.

KUCHARSKI, R.; MALESKA, R.; HAYWARD, D. C. and BALL, E. E. (1998) A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honeybee brain. *Naturwissenschaften*, **85**:343-346.

LAEMMLI, U.K. and FAVRE, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, **80**:575-599.

LEUNG, R.; HO, A.; CHAN, J.; CHOY, D. and LAI, C. K. W. (1997) Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clin. Exp. All.*, **27**:333-336.

OKA, H.; YUTAKA, E.; NAOMI, K. and YOSHIRO, H. (2001) Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and improvement of Th1/Th2 cell responses. *International Immunopharmacology*, **1**:521-532.

NAKAJIN, S., OKIYAMA, K. e YAMASHITA, S., AKIYAMA, Y. and SHI-NODA, M. (1982). Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Yakugaku Zasshi*. **36**:65-69.

SIMÚTH, J. (2001) Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*. **(2)**:139-145.

SHIMODA, M., NAKAJIN, S., OIKAWA, T., SATO, K., KAMOGAWA, A., and AKIYAMA, Y., (1978) Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. *Yakugaku Zasshi* **(32)**:69-80.

SHMITZOVÁ, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; SCHRODER, W.; SHRECKENGOST, W.; HANES, J.; JÚDOVÁ, J. and SIMÚTH, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. L. Sci.*, **54**:1020-1030.

STUDIER, F. W. (1973) Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.*, **79**:237-248.

TANURA, T., FUJII, A. and KUBOYAMA, N. (1987). Antitumor effects of royal. *Folia Pharmacol Jpn.* **89**:73-80.

TOWNSEND, G. F., BROWN, W. H., FELAUER, E. E. and HAZLETT, B. (1961). Studies on the in vitro antitumor activity of acid IV. *Can. J. Biochem.* **39**:1765-1777.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T. and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **76**:4350-4354.

VITTECK, J. (1995) Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis. *Experientia* **51**: 927-935.

WATANABE, K., SHINMOTO, H., KOBORI, M., TSUSHIDA, T., SHINO-HARA, K., KANAEDA, J., and YONEKURA, M. (1998) Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein. *Cytotechnology* **26**: 23-27.